

# Nitriti i nitriti kao prekursori N-nitrozamina u paštetama u konzervi

Pavlinić Prokurica, I.<sup>1</sup>, Bevardi, M.<sup>2</sup>, Marušić, N.<sup>3</sup>, Vidaček, S.<sup>3</sup>, Kolarić Kravar, S.<sup>4</sup>, Medić, H.<sup>3</sup>

Znanstveni rad

## Summary

Nitriti i nitriti se koriste u proizvodnji mesnih prerađevina i imaju važnu ulogu ne samo kao konzervansi već i u formiranju karakteristične crvene boje i specifičnog okusa proizvoda od mesa te inhibiraju rast i razvoj patogene bakterije *Clostridium botulinum*. Nitrozamini su kancerogeni i toksični spojevi koji mogu nastati u mesu i mesnim proizvodima kao produkt reakcije nitrita s proteinima mesa nakon što se mesu ili mesnim proizvodima dodaju nitriti, odnosno nitriti kao konzervansi. Štetnost nitrozamina dokazana je u mnogim objavljenim znanstvenim radovima tijekom zadnjih 30.-ak godina te je stoga potrebna stalna sustavna kontrola na prisutnost N-nitrozamina, jer meso i mesni proizvodi kao glavni izvor proteina čine veliki udio u prehrani kako odrasle populacije tako i djece. U Republici Hrvatskoj se takva kontrola ne provodi, a isto tako u dosadašnjoj legislativi nisu propisane najviše dopuštene količine za te spojeve (NDK). Identifikacija i kvantifikacija natri-nitrita i natrij-nitrata rađena je kromatografskom tehnikom visokoučinkovite tekućinske kromatografije (engl. High Performance Liquid Chromatography-HPLC) s DAD detektorom serija 1200 (Agilent), dok su N-nitrozamini određeni praćenjem karakterističnih iona u vezanom sustavu plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS-SIM). Dobiveni rezultati kretali su se u rasponu od 0.0001 mg/kg - 0.0099 mg/kg.

**Ključne riječi:** nitrit, nitrat, N-nitrozamini, pašteta u konzervi

## Uvod

U prehrani suvremenog čovjeka dominiraju ne samo meso već i kobasičarski proizvodi, proizvodi od sušenog i dimljenog mesa, pašteta, konzerve, te razni mesni specijaliteti. Prilikom procesiranja mesa ili mesnih prerađevina dolazi do reakcije između dodanih nitrita s proteinima mesa, te kao produkt reakcije nitrozacije mogu nastati štetni i kancerogeni spojevi **N-nitrozamini** (Hui, 1992; Pearson i Dutson, 1990; Bošnjir i sur.,2003) Toksičnost i kancerogenost nitrozamina dokazana je i opisana u mnogim do sad objavljenim

znanstvenim radovima tijekom zadnjih 30.-ak godina (Jakszyn i sur., 2006). Reakcija nitrozacije, prilikom koje nastaju nitrozamini, direktno je ovisna o količini amina, količini dodanih nitrita, pH, temperaturi, redoks potencijalu, te prisutnosti drugih kemijskih spojeva ili agensa. Osim kao konzervansi, nitriti mogu nastati i enzimskom redukcijom iz nitrata (prisutnih uglavnom u namirnicama biljnog podrijetla) tijekom procesiranja ili dodatkom nitrata namirnicama, što predstavlja indirektnu opasnost od nastanka štetnih spojeva nitrozamina.

Nitriti, za razliku od nitrita, imaju manju reaktivnost i nemaju direktan utjecaj na meso i mesne prerađevine kad se dodaju kao konzervansi već predstavljaju zalihu nitrita, a samim tim i opasnost od nastanka nitrozamina (Hui, 1992; Pearson i Dutson, 1990).

Zbog toga je sve veći pritisak na proizvođače hrane, odnosno mesnu industriju da se reducira količina dodanih nitrita i nitrata kako bi se smanjila izloženost ljudi N-nitrozo spojevima što je bio zaključak Američke nacionalne akademije za znanost još

<sup>1</sup> dr. sc. Iva Pavlinić Prokurica, Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Hondlova 2/11, 10 000 Zagreb

<sup>2</sup> M. Bevardi, Zavod za javno zdravstvo Andrija Štampar, Mirogojska 16, 10 000 Zagreb

<sup>3</sup> dr. sc. Helga Medić, dr.sc. Sanja Vidaček, Nives Marušić, dipl. ing., Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb

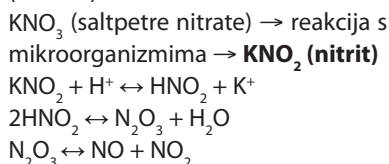
<sup>4</sup> Sanja Kolarić Kravar, dipl. ing., Državni inspektorat, Petračićeva 4, 10 000 Zagreb

1981. godine.

Meso nije samo važan izvor energije za naš organizam, već je i prava riznica proteina, vitamina, posebno A i B grupe, minerala, fosfora, magnezija i kalija, te elemenata u tragovima, kao što su željezo, cink i selen. Proteini iz mesa sudjeluju u izgradnji naših stanica i tkiva (živci, mišići i krv) (Mandić, 2007). Meso sadrži punovrijedne proteine i masti koje su našem organizmu neophodne za normalno funkcioniranje. Masnoće koje sadrži meso važan su izvor energije za ekstremne napore i nosači su vitamina topivih u mastima: A, D, E i K. Prema tvrdnjama većine nutricionista, važno je da uravnotežena prehrana sadrži umjerenu količinu mesa, zajedno sa složenim ugljikohidratima (uključujući cjelovito zrnje), voćem, povrćem i umjerenim količinama mlijeka i mliječnih proizvoda. Učinci mesa na zdravlje ovise i o načinu konzumiranja mesa, veličini porcija i o samoj vrsti mesa. Na stav potrošača prema mesu utječu brojni čimbenici poput cijene i dostupnosti, no glavne razlike u količini i tipu mesa koje se konzumira u različitim zemljama pripisuju se razlikama u kulturi i tradicionalnom načinu prehrane. Meso i mesni proizvodi svrstani su prema postojećem Pravilniku u sedam skupina unutar kojih postoje detaljnije podjele, odnosno podskupine i to: Proizvodi od svježeg mesa; Kobasice; Suhomesnati proizvodi; Polugotova i gotova jela od mesa; Konzerve; Slanina; Ostali proizvodi od mesa.

Uporaba aditiva u tehnologiji proizvodnje mesnih proizvoda postaje sve češća, a poznata je dugi niz godina. Fosfati i polifosfati su tako najčešće korišteni funkcionalni aditivi u mesnoj industriji. Kao takvi zaslužni su za vezanje vode, poboljšanje teksture proizvoda i stabilizaciju proizvoda (Branen, Davidson i Salminen, 2002). Isto tako, koriste se sol (NaCl), šećer, **nitriti/nitriti**, askorbinska kiselina i dr. Postavlja se pitanje

mogućnosti kontrole s obzirom na količinu dodanih aditiva u gotovim proizvodima. Da je kontrola dodanih aditiva neophodna govori nam činjenica, da se među dozvoljenim aditivima nalaze i supstance, koje u povećanoj količini mogu biti toksične ili čak kancerogene. Kao primjer se navodi dodatak natrijeva i kalijeve nitrita, čija je primjena našim Pravilnikom dozvoljena u salamurenim mesnim proizvodima. O toksičnosti nitrita ima u literaturi mnogo podataka. Ipak je najvažnije upozoriti na opasnost koja nastaje neminovnim i stalno prisutnim procesom redukcije nitrita u kancerogene *nitrozamine*. Proces redukcije nitrita u nitrozamine odvija se već u samoj sirovini, ali i u gotovim proizvodima, te kasnije u probavnom traktu konzumenta uz sudjelovanje crijevnih bakterija. S druge strane jedini su učinkoviti konzervansi koji sprječavaju rast bakterije *Clostridium botulinum*, bakterije čiju su toksini paralizirajući za živčani sustav (Issenberg, 1976). *Konzervansi* se dodaju radi stabiliziranja proizvoda, produljenja njegove održivosti i sprječavanja kvarenja, odnosno mikrobiološke kontaminacije. Na taj način se produžuje trajnost namirnice i omogućuje transport lako pokvarljive robe na veće udaljenosti (Walker, 1990). Sam proces prerade, odnosno proizvodnje mesnih proizvoda uključuje stvaranje karakteristične crvene boje, te specifičan okus i teksturu prerađenih mesnih proizvoda koji se upravo po tome razlikuju od svježeg mesa. Kemija prerade mesa uključuje mnoge kemijske reakcije (Reinik, 2007). Istraživanjima je potvrđeno da su nitriti zaslužni za crvenu boju mesa i njenu toplinsku stabilnost. Hoagland je još 1910 godine predložio slijedeći niz kemijskih reakcija tijekom prerade (dorade) mesa:



NO + mioglobin → **NO-mioglobin**

Sredinom 20. stoljeća postao je sasvim jasan mehanizam nastanka karakteristične crvene boje prerađenog mesa. Upotreba nitrita prilikom prerade mesa u količini od 156 ppm daje željenu boju, a dodatak natrij-nitrita u toj količini je službeno dopuštena u Sjedinjenim Američkim Državama još početkom 20. stoljeća, dok se kasnije postepeno počinje koristiti u proizvodnji i preradi mesa i mesnih proizvoda i u mnogim drugim zemljama (Girard, 1996). Godine 1940. prvi put je provedeno istraživanje koje je dokazalo utjecaj nitrita na nastajanje specifičnog okusa prerađenih (suhomesnatih) mesnih proizvoda. Nakon toga, iste godine, otkrivene su tri glavne uloge nitrita: utjecaj na boju, okus i njegova antibakterijska svojstva, ali mehanizam djelovanja još uvijek nije bio poznat. Ubrzo nakon toga, otkriveno je, da je kod mesa i mesnih proizvoda najveća količina nitrita tijekom samog procesa proizvodnje. Ta je spoznaja potakla istraživanja o sudbini nitrita u mesu i mesnim proizvodima, njihovom toksičnom djelovanju i uvjetima nastanka toksičnih produkata (Watson, 2002; Cammack i sur., 2002). Prilikom procesiranja mesa i mesnih proizvoda količina nitrita u rasponu od 1-5% izgubi se prilikom stvaranja dušikovog oksida (NO) ili se veže na lipide mesa. Od 1-10% se oksidira do nitrata, 5-10% ostaju kao slobodni nitriti dok 5-15% reagira sa sulfhidridnim spojevima ili mioglobinom, a 20-30% ostaje vezano na proteine (Hui, 1992). Tijekom procesiranja i skladištenja mesa dolazi do gubitka nitrita, što ga čini nesigurnim aditivom. Napredak u definiranju uloge nitrita u prerađenim mesnim proizvodima uključivao je potvrdu o međudjelovanju mnogih faktora i razjašnjenju mehanizma inhibitorynog učinka nitrita, a tijekom 1970-ih i 1980-ih godina slučajno otkriće toksičnih i kancerogenih spojeva **N-nitrozamina** postaje od

velikog značaja (Jakszyn i sur., 2006).

Osim za postizanje i očuvanje karakteristične boje, okusa i teksture, nitriti/nitrati se dodaju prilikom prerađivanja i proizvodnje mesa i mesnih proizvoda i u kombinaciji s drugim faktorima kako bi smanjili ili spriječili rast i razvoj patogenih bakterija kao npr. *Clostridium botulinum* (Anonimno, 2003). Spore *Clostridium botulinum* se nalaze svugdje u tlu i na taj način predstavljaju potencijalnu opasnost za životinje i prehrambeni lanac. Otporne su na mnoge tretmane zagrijavanja koji se koriste prilikom proizvodnje hrane, te se zato mogu naći u mnogim vrstama hrane. Konzumacijom takve hrane u kojoj se razmnožava *C. botulinum*, te proizvodi neurotoksine (proteini koji nastaju prilikom razmnožavanja i tvorbe vegetativnih stanica), toksin se absorbira u probavnom traktu i nepovratno veže na periferni živac, te inhibira otpuštanje neurotransmitora. Simptomi botulinske infekcije uključuju mučninu, povraćanje, umor, nesvjesticu, paralizu mišića i poteškoće disanja, a razvijaju se unutar 12-72 sata nakon konzumacije kontaminirane hrane. Ukoliko ne nastupi smrt, oporavak traje nekoliko mjeseci, a stupanj smrtnosti danas iznosi 10%. U mnogim zemljama upravo je konzumacija mesnih proizvoda glavni uzrok pojave botulizma jer je upravo meso idealan medij za rast i razvoj, te proizvodnju toksina *Clostridium botulinum* (Cassens i sur., 1978; Perez Rodriguez, 1998; Pegg i Shahidi, 2004). Spoznaja da je dodatak određene količine nitrata potreban za spriječavanje rasta i razvoja *Clostridium botulinum* kod kratkotrajnih, konzerviranih i prerađenih mesnih proizvoda dokazana je 70-ih godina prošlog stoljeća. Ta je količina različita i potrebno ju je odrediti za svaki pojedini proizvod. Također se pretpostavlja da je rast *C. botulinum* ovisan o tzv. „rezidualnoj“ količini dodanih nitrata, a važnom se smatra i razina željeza prisutna u mesu, iako se to ne može sa sigurnošću tvrditi, dok je sasvim jasno da suzbina nitrata dodanih mesu ovisi o nekoliko faktora: pH, vrsti mesnih proizvoda, temperaturi skladištenja, eventualnom tretiranju zagrijavanjem, te prisutnosti drugih tvari (npr. limunske kis.). Smatra se i da dušikov-oksidi inaktiviraju željezo-sulfat koji je prisutan u mesu i to je vjerojatni mehanizam inhibicije rasta i razvoja *Clostridium botulinum* dodatkom nitrata suhomesnatim i prerađenim mesnim proizvodima (Roberts, 1995). Mnogi su pokusi do sada rađeni kako bi se utvrdila minimalna količina nitrata koja osigurava inhibični učinak na klijanje i rast spora *C. botulinum* prilikom proizvodnje i konzerviranja mesnih proizvoda zbog opasnosti od nastanka kancerogenih nitrozamina. Znanstveni odbor za hranu (Scientific Committee on Food) utvrdio je 1990. godine da je **50-100 mg** nitrata kao  $\text{NaNO}_2/\text{kg}$  mesnih proizvoda dovoljno za većinu proizvoda, dok je za proizvode s duljim rokom trajanja i malom količinom soli potrebno dodati **50-150 mg** nitrata/kg kako bi se inhibirao rast *Clostridium botulinum* (Anonimno, 2006). Nitriti i nitrati dozvoljeni su za upotrebu u zemljama Europske unije kao kalij-nitrit i natrij-nitrit (E 249 i E 250) i kalij-nitrat i natrij-nitrat (E 251 i E 252). Njihova uporaba propisana je direktivom Europske unije i sve više se teži smanjivanju količina nitrata i nitrata potrebnih za očuvanje mikrobiološke sigurnosti hrane (Anonimno, 2005). Nitrati su, osim kao dodaci hrani (prehrambeni aditivi), u prirodi prisutni kao dio dušičnog ciklusa. Imaju važnu ulogu u prehrani, te rastu i razvoju bilja. Povrće tako sadrži znatan udio nitrata, a značajan udio sadrže i uljarice i gomoljasto bilje. Lisnato povrće kao npr. salata ili špinat sadrže najveće koncentracije nitrata. Unos nitrata kod ljudi uglavnom se odvija egzogeno konzumacijom povrća i ostalih proizvoda koji sadrže nitrata, te putem pitke vode dok nitriti uglavnom nastaju konverzijom iz nitrata, dok se

neki nitriti konzumiraju kao dodaci hrani. Voće i povrće uz meso i mesne prerađevine predstavlja značajan segment u prehrani ljudi, a njihovom konzumacijom unosi se u organizam od 11-41% dnevnog unosa nitrata (Anonimno, 2008b).

Znanstveni odbor za hranu (Scientific Committee on Food-SCF) je 2002. godine utvrdio prihvatljiv dnevni unos (ADI) za nitrata, a iznosi 0-3.7 mg/kg, tj. tež./dan, što je ekvivalentno unosu od 222 mg nitrata/dan za odraslu osobu od 60 kg, dok ADI za nitrite iznosi 0-0.07 mg/kg, tj. tež./dan. Odrasla osoba prosječno konzumira dnevno 400g različitog povrća pa je tako prosječan unos nitrata 157 mg/kg. Uzevši u obzir i konzumaciju voća koje sadrži manje nitrata ukupan unos nitrata kreće se od 81-106 mg/dan za većinu EU populacije što je unutar ADI vrijednosti. Problem predstavlja manji dio populacije koji konzumira samo lisnato povrće u velikim količinama i tada dolazi do prekoračenja ADI vrijednosti (Anonimno, 2006). Nitrati se kod ljudi nakon unosa brzo apsorbiraju iz gastrointestinalnog trakta u krvnu plazmu uz pomoć crijevne mikroflora. Oko 25% nitrata iz plazme prolazi kroz žlijezde slinovnice koncentrirano se i izlučuje kroz slinu. U ustima, bakterijskom redukcijom nastaje oko 20% nitrata iz nitrata. U kiselom mediju želuca iz nitrata nastaje dušikov oksid i drugi metaboliti. Većina apsorbiranih nitrata se odmah izlučuje urinom. Toksikološkim istraživanjima na eksperimentalnim životinjama utvrđeno je da je natrij-nitrit oko 10 puta toksičniji od natrij-nitrata (Gray i Randall, 1979).

Kao što je već ranije spomenuto, istraživanja o pojavi kancerogenih spojeva **N-nitrozamina** i njihovoj etiologiji u proteklih 50-ak godina započela su otkrićem dviju važnih spoznaja. Prva seže u 1956. godinu kada su britanski znanstvenici izvijestili o pronalasku kancerogenog

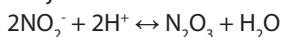
N-nitrosodimethylamine (NDMA) kod eksperimentalnih životinja. Nadalje, u Norveškoj je ranih 1960.-ih potvrđeno da je NDMA bio glavni uzročnik smrti stoke koja je hranjena ribljim obrocima kojima su dodani nitriti. Nitriti su reagirali sa aminima ribljeg obroka i proizveli letalnu dozu NDMA (Preussmann i Stewart, 1984).

N-nitrozamini se mogu podijeliti u 2 grupe na osnovi njihovih fizikalnih svojstava:

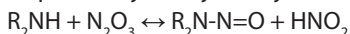
- *Hlapivi* N-nitrozamini (nitrozirani dialkil amini i ciklički spojevi manje molekulske mase);
- *Ne hlapivi* N-nitrozamini (hidroksilirani amini ili polifunkcionalne tvari) (Walker, 1990)

N-nitrozamini nastaju kemijskom reakcijom nitrozacijskog agensa i sekundarnih ili tercijarnih amina. Oksidi dušika ( $\text{NO}_x$ ) u oksidacijskom stanju +3 ili +4 služe kao nitrozacijski agensi, a najviše istraživan nitrozacijski agens koji sudjeluje u stvaranju nitrozamina koji nastaju u hrani je nitratni anhidrid ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ).

Nitratni anhidrid brzo nastaje u kiselu vodenoj otopini i to u slijedećoj reakciji:



Dalje se  $\text{N}_2\text{O}_3$  spaja sa slobodnim parom elektrona neprotoniranih sekundarnih amina reakcijom nukleofilne supstitucije i nastaju N-nitrozamini prema slijedećoj reakciji:



*Stupanj nitrozacije* je ovisan o pH i uvjetovan je koncentracijama nitrita i amina:

$$\text{Rate} = k [\text{amine}] \times [\text{nitrite}]^2$$

S obzirom da nitratni anhidrid reagira s neprotoniranim aminima, brzina (stupanj) nitrozacije sekundarnih amina je obrnuto proporcionalna lužnatosti amina.

Optimalan pH za nitrozaciju ve-

ćinu sekundarnih amina je između 2.5-3.5. Radi se o dovoljno kiselom mediju kao što je i u ljudskom želucu, a koji pogoduje stvaranju nitrozamina iz prisutnih amina i nitratnog anhidrida (Hui, 1992; Walker, 1990; Sen, Seaman i McPherson, 1980). N-nitrozamini često su prisutni u suhomesnatim i prerađenim mesnim proizvodima, jer im se prilikom procesiranja, kao što je već ranije naglašeno, dodaju konzervansi u obliku nitrita ili nitrata. Nitriti se pomoću enzima nitrat-reduktaze (prisutnog kod mnogih bakterija) reduciraju u nitrite i tako stupaju u daljnje kemijske reakcije sa aminima tijekom procesa proizvodnje, skladištenja ili kuhanja, te tako nastaju nitrozamini (Girard, 1996; Walker, 1990).

Najvažniji inhibitori reakcija nitrozacije u hrani su tvari s redoks potencijalom kao što su: askorbati (askorbinska kiselina-vitamin C), vitamin E, selen i dr. Askorbinska kiselina inhibira stvaranje nitrozamina mehanizmom kompeticije nitrostabilnih prekursora (amini) sa nitrozacijskim agensom. Kompletna inhibicija jedina je učinkovita i to u prisustvu veće količine askorbinske kiseline i/ili u anaerobnim uvjetima. Produkt koji nastaje reakcijom između nitrita i askorbinske kiseline je vjerojatno odgovoran ne samo za nitrozacijske reakcije već i za gubitak nitrita za vrijeme sušenja (prženja) mesa (Chow i Hong, 2002; Lu i sur., 1986). Vitamin E je zaslužan za smanjenu produkciju reakcijskog produkta  $\text{NO}^+$ , dok selen smanjuje produkciju reaktivnog  $\text{ONOO}^-$  produkta. U zadnje vrijeme zahtjeva se smanjenje upotrebe nitrata i nitrita prilikom konzerviranja i procesiranja mesnih proizvoda tj. upotreba minimalnih količina koje će osigurati inhibiciju bakterijskog rasta. U svrhu prevencije stvaranja N-nitrozo spojeva u Sjedinjenim Američkim Državama i nekim drugim zemljama predlaže se i dodatak od 500 mg/kg natrij-askorbata (Cassens, 1990; Schuddeboom, 1993).

## Materijali i metode

U ovom radu ispitivani su uzorci konzervnih mesnih proizvoda - jetrene paštete od 3 različita proizvođača. Uzorci jetrene paštete kupljeni su u nekoliko hrvatskih trgovina i jednom austrijskom supermarketu tijekom 2008. godine, te su dopremljeni u prostorije Laboratorija za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane, Odjela za analize hrane i predmeta opće uporabe, Službe za zdravstvenu ekologiju, Zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ u Zagrebu, za daljnju analizu.

Uzorci jetrene paštete odabrani su metodom slučajnog odabira i za potrebe analize podijeljeni su u nekoliko grupa.

*Deklarirani sastav jetrenih pašteta korištenih za analizu:*

- Proizvođač 1 (Hrvatska): svinjsko mesno tkivo, voda, svinjska jetra 15%, svinjsko meso, bjelanjčevine mlijeka, začini, kuhinjska sol, pojačivač okusa (E621), konzervans (E250), sadrži mlijeko;
- Proizvođač 2 (Hrvatska): svinjsko mesno tkivo, voda, svinjska jetra 15%, svinjsko meso, emulgator (bjelanjčevine soje, lecitin, karagenan, ksantan guma), kuhinjska sol, začini, konzervans (E250). Može sadržavati žitarice, jaja, mlijeko, celer i gorušicu u tragovima;
- Proizvođač 3 (Austrija): svinjsko meso 36%, slanina, svinjska jetra 25%, voda, kuhinjska sol, začini, dekstroza, saharoza, emulgator E471, E472c, pojačivač okusa: E261, konzervans: E250, kuhano.

Uzorci jetrene paštete su pripremljeni i analizirani neposredno nakon dopremanja u Laboratorij.

Tablica 1. Parametri validacije primijenjene metode

Table 1 Validation parameters of the used method

Parametar Parameter	Dobiveni kriterij prihvatljivosti Achieved acceptability criterion
Rasipanje rezultata Dispersion of results	3.71%
Iskorištenje Usability	99.2 ± 5%
Ponovljivost mjerenja Measurement repeatedness	0.11%
Ponovljivost pripreme uzorka Sample preparation repeatedness	2.71%
Linearnost Linearity	K≥0.999
Intermedijarna preciznost Intermediate precision	3.33%
Granica kvantifikacije Quantification limit	1 mg/kg

### Određivanje nitrita i nitrata

Nakon vaganja i obrade uzoraka paštete, slijedila je izolacija pomoću ekstrakcije toplom vodom, te su zatim uzorci paštete podvrgnuti postupku filtracije kako bi se pročistili prije kvantifikacije, a sve prema akreditiranoj metodi. Identifikacija i kvantifikacija natri-nitrita i natri-nitrata rađena je kromatografskom tehnikom visokoučinkovite tekućinske kromatografije (engl. High Performance Liquid Chromatography-HPLC) s DAD detektorom serija 1200 (Agilent)

Kolona: C18

Mobilna faza: 10% 0.01 M oktalamin 90% 5 mM tetrabutil amonij hidrogensulfat pH=6,5

Valna duljina: 214 nm

Temperatura pećnice: 30°C

Protok: 1 mL/min (84).

### Parametri validacije metode

#### Priprema uzoraka

Nakon vaganja točno određene količine uzorka jetrene paštete (25 ± 0,01 grama), uzorak je usitnjen i prebačen u tikvicu za destilaciju uz dodatak natrij-klorida (NaCl). Nakon toga uzorak se destilirao postupkom klasične destilacije vodenom parom

i sakupljala se određena količina destilata. Nakon završene destilacije prikupljenom destilatu se dodala 6N sulfatna kiselina (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i bezvodni natrij-sulfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), te se tijekom postupka redestilacije sakupljala određena količina redestilata kojem se na kraju postupka dodao kalij-hidroksid (KOH) i natrij-klorid (NaCl). Tako pripremljeni redestilat se dalje ekstrahirao organskim otapalom diklormetanom u lijevku za odjeljivanje, a prikupljena količina ekstrahiranog odjeljenog uzorka se uparila do suhog na rotavaporu, nakon čega je uslijedilo pročišćavanje, identifikacija i kvantifikacija N-nitrozamina metodom vezanog sustava plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (Crosby i sur., 1972).

### Određivanje N-nitrozamina

Nakon obrade uzoraka, identifikacija i kvantifikacija N-nitrozamina je provedena vezanim sustavom plinske kromatografije i spektrometrije masa (engl. Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS).

### Identifikacija i kvantifikacija N-nitrozamina

Nakon izolacije N-nitrozamina ekstrakcijom pogodnim organskim otapalom-diklormetanom, proči-

šćavanja uzoraka pomoću SPE kolona, kvantifikacija pojedinih spojeva N-nitrozamina napravljena je analizom pripremljenog uzorka pomoću vezanog sustava plinskog kromatografa i masenog detektora (GC-MS, Shimadzu). Primijenjena je tzv. SIM tehnika analize zbog identifikacije odabranih i poznatih analita.

Aparat: plinski kromatograf s masenim detektorom (Shimadzu)

Kolona: DB-5

Početna temperatura kolone: 10°C

Početno vrijeme: 2.55 min

Brzina zagrijavanja: 5 min

Konačna temperatura kolone: 280°C

Temperatura injektora: 45°C

Temperatura detektora: 225°C

Detektor: detektor za masenu spektrometriju (MSD)

MSD Mode: SIM

Rang: 10°C-280°C

Plin nosioc: helij

Inlet Mode: Split

Split flow: 1.5 ml/min

Injektiranje uzorka: ručno

Volumen injektiranja: 1 µl

Vrijeme analize: 20 min

### Parametri validacije metode

Za analizu uzoraka korištena je metoda za određivanje hlapivih N-nitrozamina, ali je navedena metoda unaprijeđena i poboljšana u tome što je za identifikaciju traženih spojeva N-nitrozamina korišten sofisticiraniji uređaj (vezani sustav plinskog kromatografa i masenog detektora) zbog sigurne identifikacije spojeva i selektivnosti, osjetljivosti i preciznosti analize, a uzorci su prethodno pročišćeni pomoću tzv. SPE kolona (Crosby i sur., 1972; Groenen i sur., 1976; Grebel, Young i Suffet, 2006). Stoga su provedeni osnovni parametri validacije koji uključuju: linearnost, preciznost, točnost, selektivnost, granica detekcije i granica kvantifikacije (Anonimno, 1996).

### Rezultati i rasprava

Tablica 2. Parametri validacije primijenjene metode

Table 1 Validation parameters of the used method

Parametar Parameter	Dobiveni kriterij prihvatljivosti Achieved acceptability criterion
Selektivnost Selectivity	Prema informaciji According to information
Preciznost Precision	RSD ≤ 5.3%
Iskorištenje Usability	92 ± 5%
Ponovljivost mjerenja Measurement repeatedness	0.19%
Linearnost Linearity	K ≥ 0.0997
Granica detekcije Detection limit	0.1 µ/kg
Granica kvantifikacije Quantification limit	0.3 µ/kg

Tablica 3. Količine nitrita i nitrata u uzorcima jetrene paštete izražene u mg/kg

Table 3 Nitrite and nitrate concentrations in canned liver patties

Podrijetlo proizvoda Product origin	Uzorak Sample		X	Raspon	±SD
				Range	
Proizvođač 1 Manufacturer 1	Grupa 1 Group 1 n=15	NaNO <sub>2</sub>	2,95	2,73-3,22	0,25
		NaNO <sub>3</sub>	61,20	58,7-65,1	3,42
	Grupa 2 Group 2 n=15	NaNO <sub>2</sub>	3,12	3,00-3,19	0,11
		NaNO <sub>3</sub>	69,3	63,9-72,1	4,68
Proizvođač 2 Manufacturer 2	Grupa 1 Group 1 n=15	NaNO <sub>2</sub>	4,59	4,21-4,79	0,33
		NaNO <sub>3</sub>	25,63	24,4-27,5	1,64
	Grupa 2 Group 2 n=15	NaNO <sub>2</sub>	5,25	4,90-5,45	0,30
		NaNO <sub>3</sub>	25,93	23,8-27,6	1,94
Proizvođač 3 Manufacturer 3	Grupa 1 Group 1 n=15	NaNO <sub>2</sub>	36,9	36,5-37,2	0,36
		NaNO <sub>3</sub>	52,87	52,2-54,1	1,07
	Grupa 2 Group 2 n=15	NaNO <sub>2</sub>	37,43	36,7-38,4	0,87
		NaNO <sub>3</sub>	53,07	52,7-53,4	0,35

Mnoge do sada objavljene studije pokazale su da se i mali udio nitrita dodanih mesu kao konzervans, javlja kasnije u obliku hlapivih N-nitrozamina, pa su stoga uzorci paštete sva tri navedena proizvođača analizirani na udio prisutnih natrij-nitrita (NaNO<sub>2</sub>) i natrij-nitrata (NaNO<sub>3</sub>), kako bi se dokazala veza s nastankom hlapivih N-nitrozamina. Poznato je da nitrit nakon dodatka određenom supstratu vrlo brzo stupa u kemijske reakcije jer može djelovati kao oksidacijski, redukcijski ili nitrozacijski

agens, pa se tako pretvara u različite oblike kao što su nitrat, nitratna kiselina, dušikov oksid, dušik(II)-oksid, a kao dokaz te reaktivnosti su promjene u boji, okusu i trajnosti mesnih proizvoda, dok određen udio dodanog nitrita nestaje ovisno o formulaciji proizvoda, pH, temperaturi, te duljini trajanja tijekom prerade i skladištenja. Tako npr. nakon proizvodnje nekog suhomesnatog proizvoda manje od 50% dodanog

nitrita može se dokazati kemijskom analizom. Zbunjujuća je činjenica da dodatkom različite količine nitrita u dva uzorka, nakon prerade, nalazimo iste količine zaostalog (rezidualnog) nitrita u oba uzorka. Znanstvene studije su pokazale da nitrit može stupiti u reakciju s proteinima, lipidima, pigmentima i drugim sastojcima mesa, a udio koji ostaje a da nije stupio u kemijsku reakciju ostaje u slobodnom obliku (kao NO<sub>2</sub><sup>-</sup> i HNO<sub>2</sub>) i naziva se slobodni ili rezidualni nitrit, dok se nitrit koji stupa u kemijsku reakciju sa sastojcima mesa naziva vezani nitrit. Analitičkim metodama se može detektirati samo slobodni (rezidualni) nitrit. Količina slobodnog (rezidualnog) nitrita ovisi raznim faktorima kao što su: pH, temperatura procesiranja i skladištenja. Gubitak nitrita je pak funkcija vremena i temperature. Tijekom skladištenja dolazi do smanjenja koncentracije nitrita, pa tako mesni proizvodi na tržištu sadrže u prosjeku 5 – 30 mg/kg slobodnih nitrita (Sharat, D. i Gangolli, 1995; Pegg i Shahidi, 2004).

U Tablici 3 prikazane su količine slobodnih natrij-nitrita (NaNO<sub>2</sub>) i nastalih natrij-nitrata (NaNO<sub>3</sub>) koji su nakon obrade uzoraka detektirani metodom visoko tlačne tekućinske kromatografije (HPLC). Naime, na deklaraciji kako hrvatskih tako i austrijskih pašteta navedena je prisutnost konzervansa oznake E-250 što potvrđuje prisutnost natrij-nitrita. Rezultati pokazuju razlike u količinama prisutnih Na-nitrita kao i nastalih Na-nitrata ovisno o vrstama analiziranih proizvoda, odnosno proizvođaču. Razlike u količinama su direktno povezane sa količinama korištenog NaNO<sub>2</sub> tijekom procesa proizvodnje, mada postoje i neka odstupanja, a što je najvjerojatnije razlika u samom procesu proizvodnje, kvalitete sirovine ili kvalitete samog aditiva. Poznato je da se nitriti mogu naći samo u onim mesnim proizvodima kojima su prethodno dodani nitriti; otprilike 20% dodanih

Tablica 4. **Količine N-nitrozamina u uzorcima jetrene paštete (µg/kg)**  
 Table 4 **N-nitrosamines concentrations in canned liver patties (µg/kg)**

PODRIJETLO PROIZVODA Product origin			
Proizvođač 1 Manufacturer 1 (n=30)	0 DANA / 0 days		
	X	Raspon/ Range	±SD
EtMet	3,7	0,5-5,8	1,1
diEt	ND	-	-
morfolin	1,0	0,4-2,8	0,6
diProp	2,2	0,8-4,9	1,5
piperidin	1,4	0,6-8,2	1,6
diBut	ND	-	-
UKUPNO / Total	8,3	ND-21,7	1,2
Proizvođač 2 Manufacturer 2 (n=30)			
EtMet	1,1	0,5-2,0	0,4
diEt	0,6	0,3-0,8	0,2
morfolin	0,7	0,4-1,4	0,2
diProp	0,6	0,3-0,8	0,1
piperidin	0,6	0,3-1,3	0,2
diBut	ND	-	-
UKUPNO / Total	3,6	ND-6,3	0,2
Proizvođač 3 Manufacturer 3 (n=30)			
EtMet	1,6	0,8-3,9	1,0
diEt	ND	-	-
morfolin	0,2	0,1-0,9	0,2
diProp	ND	-	-
piperidin	0,2	0,1-0,3	0,1
diBut	3,0	0,8-9,9	2,8
UKUPNO / Total	5,0	ND-15	1,0

**EtMet** – N-etilmetilnitrozoamin; **diEt** – N-dietilnitrozoamin; **morfolin** – N-nitrozomorfolin; **diProp** – N-dipropilnitrozoamin; **piperidin** – N-nitrozopiperidin; **diBut** – N-dibutilnitrozoamin  
**EtMet**-N-nitroso-N-methylethylamine; **diEt** – N-nitrosodiethylamine; **morfolin** – N-nitrosomorfoline;  
**diProp** – N-nitrosodi-N-propylamine; **piperidin** – N-nitrosopiperidine; **diBut** – N-nitrosodi-N-butylamine

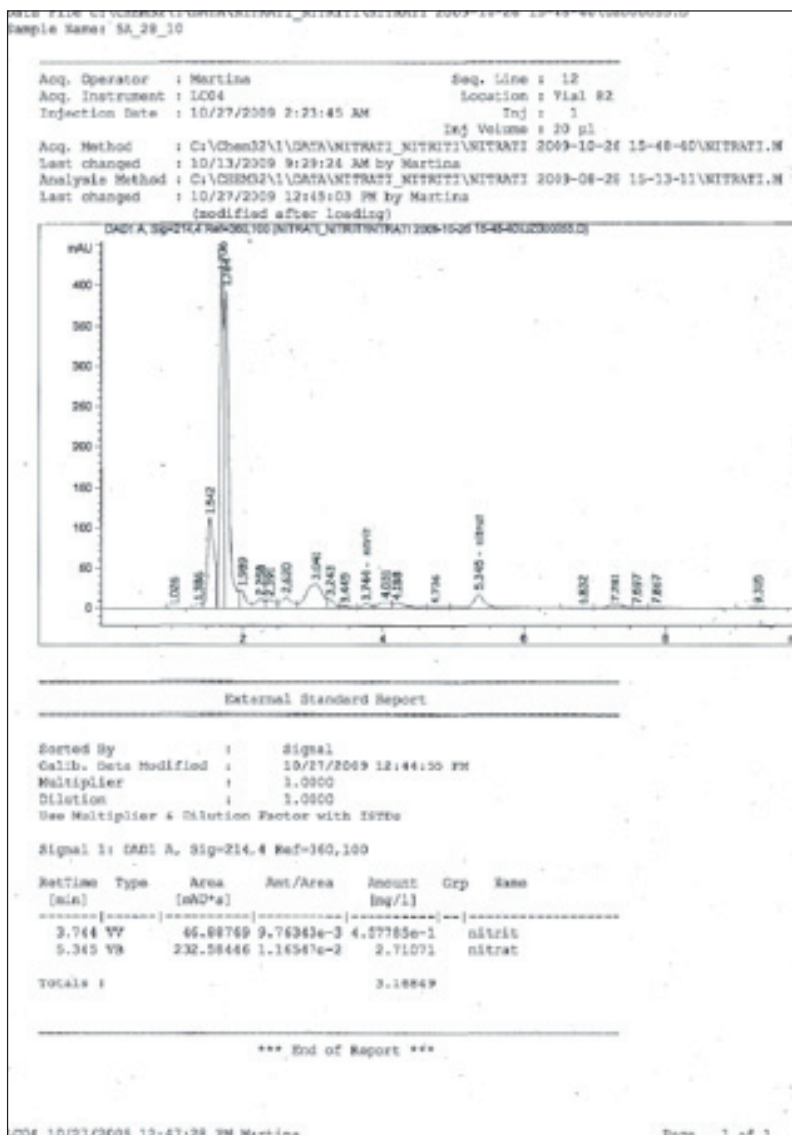
nitrita reakcijom oksidacije prelazi u nitrate dva sata nakon procesiranja, a nastavlja se tijekom skladištenja. Ključnu ulogu u konverziji nitrita u nitrate kod suhomesnatih mesnih proizvoda ima dodatak askorbata ili njegovog izomera eritorbata dodatkom natrij-askorbata kao konzervansa, no nitrati nastaju i bez njegovog dodatka ali u manjoj količini kod ostalih mesnih proizvoda (Pegg i Shahidi, 2004; Schuddeboom, 1993).

Kasnih 60-ih godina prošlog stoljeća upotreba nitrita u mesnim pro-

izvodima došla je u pitanje, čak je Američka vlada razmatrala mogućnost zabrane tog konzervansa zbog znanstveno dokazane povezanosti s nastankom N-nitrozamina usprkos povoljnom djelovanju zbog čega se i koristi. Kao što je već spomenuto, nitriti reagiraju u određenim uvjetima s aminima ili aminokiselinama mesa prilikom toplinske obrade. Pri tome najčešće nastaju spojevi N-dimetilaminnitrozoamin (NDMA) i N-pirolidinnitrozoamin (NPYR) koji su pokusima na eksperimentalnim životinjama dokazano kancerogeni,

mutageni i teratogeni. Više od 90% spojeva od poznatih 300-tinjak spojeva N-nitrozamina je do sada testirano na životinjama, te je dokazano da uzrokuju različite vrste tumora, međutim, ne postoji neki čvrsti dokaz između pojave tumora kod ljudi i izloženosti N-nitroso spojevima. Zbog mnogih indirektnih dokaza o posebnoj povezanosti s pojavom tumora kod ljudi, može se nedvojbeno ustvrditi da se radi o mogućem etiološkom uzročniku uzevši u obzir činjenicu da je 35% svih tumora u ljudi uzrokovano konzumacijom određene hrane. U Sjedinjenim Američkim Državama nitrit je 1998. godine proglašen kao razvojni i reproduktivan toksikant (Honikel, 2008; Nabrzyski i Gajewska, 1994).

Utjecaj različitih uvjeta skladištenja na djelovanje nitrita i nitrata, te njihov utjecaj na nastajanje N-nitrozamina u 3 različita mesna proizvoda od iznutrica koji se u Poljskoj redovito konzumiraju, analizirali su Domanska-Blicharz i sur. (2004). Što se pak vrijednosti N-nitrozamina tiče, svježi uzorci sporadično sadržavali su male količine N-nitrozodimetilamina (**NDMA**), dok su u svim uzorcima čuvanim 72 sata na +4 do +8°C bili prisutni spojevi **NDMA**, a prosječne vrijednosti iznosile su 2.6 µg/kg, 2.8 µg/kg i 3.0 µg/kg. Prosječne vrijednosti N-nitrozopiperidina (**NPIP**) bile su 4.1 µg/kg, 1.9 µg/kg i 6.6 µg/kg (ovisno o vrsti proizvoda). U nekim proizvodima pronađeni su i spojevi N-nitrozodibutilamin (**NDBA**) i N-nitrozomorfolin (**NMOR**). Rezultati poljskih znanstvenika potvrdili su da na promjene količina nitrita i nitrata kao i na nastanak N-nitrozamina u različitim mesnim proizvodima uvelike utječu uvjeti skladištenja. Naime, više temperature pogoduju razvoju bakterija tako da dolazi do naglog smanjenja količina nitrita pri sobnoj i višim temperaturama i to zbog bakterijske aktivnosti, dok se vrijednosti nitrata djelovanjem bakterija smanjuju ali ne u značajnoj mjeri.



Slika 1. **Kromatogram uzorka – određivanje nitrata i nitrita**  
 Figure 1 **Chromatograms obtained by HPLC analysis of nitrates and nitrites**

Količine nitrita smanjuju se i zbog reakcija nitrita sa sirovinama mesnih proizvoda iz kojih su proizvedeni, a to uključuje i način proizvodnje, dužinu skladištenja, dodatne sastojke koji se koriste, a važna je činjenica da li se nitriti dodaju odjednom ili postepeno. Iz rezultata oba istraživanja vidljiva je korelacija između razine nitrita i nitrata i sadržaja N-nitrozamina. Stvaranje N-nitrozamina je jedan opsežan i još uvijek nedovoljno razjašnjen proces koji rezultira različitim interakcijama između nitrozačkih aktivatora i/ili inhibitora, a po-

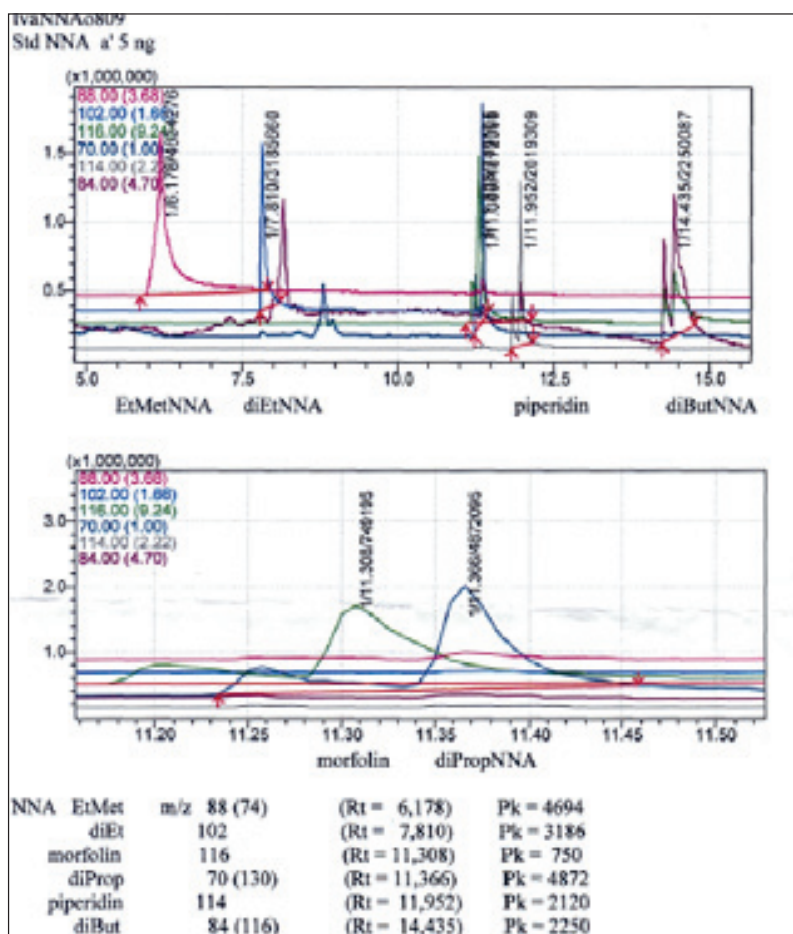
stoji i niz drugih faktora koji utječu na pojavu N-nitrozamina. Rezultati ovih dvaju istraživanja nedvojbeno dokazuju da su za nastanak N-nitrozamina „odgovorni“ nitriti, nitriti, primarni ili sekundarni amini ili amidi, proteini, peptidi ili aminokiseline koji se nalaze ili nastaju u navedenim mesnim proizvodima i koji pod utjecajem mikrobiološke aktivnosti postaju prekursori iz kojih dalje kao rezultat kemijskih reakcija nastaju N-nitrozamini (Pegg i Shahidi, 2004; Mirvish, 1995; Tannenbaum, 1985; Epley, Addis i Warthesen, 2009).

U dostupnoj znanstvenoj literaturi postoje još mnoga istraživanja koja ukazuju na opasnost od povećane izloženosti štetnim N-nitrozaminima putem konzumacije različitih prehrambenih proizvoda, a osobito putem povrća, te mesa i mesnih proizvoda. Naime, u većini Europskih zemalja postoje bolje ili lošije studije vezane uz način prehrane pučanstava, a provodi se i sustavna kontrola hrane (monitoring), kako na prisutnost N-nitrozamina, tako i na prisutnost ostalih kontaminanata u svrhu procjene mogućeg štetnog utjecaja na osobe koje ih konzumiraju, a s ciljem zaštite zdravlja pučanstva.

Znanstvenici u Finskoj pratili su utjecaj između unosa nitrita, nitrata i N-dimetilaminonitrozamina (NDMA), te rizika od pojave tumora gastrointestinalnog trakta. Dobiveni rezultati pokazali su da nema značajne veze između unosa nitrita i nitrata i pojave tumora gastrointestinalnog trakta, te unosa NDMA i pojave tumora želuca. Zaključak te studije bio je da N-nitrozo spojevi mogu inducirati pojavu tumora probavnog trakta. Isto tako još je od 70.-tih godina prošlog stoljeća poznato da se N-nitrozo spojevi u organizmu sintetiziraju in vivo tijekom probave u kiselom mediju želuca ili bakterijskom aktivnošću tijekom prolaska kroz probavni sustav (Penttilä, Räsänen i Kimppa, 1990).

U jednom od novijih istraživanja iz 2007. godine Sabranek i Bacus pokušali su ukazati na mogućnost proizvodnje tzv. prirodnih odnosno organskih mesnih proizvoda bez direktnog dodatka nitrita ili nitrata koristeći kao nadomjestak prirodne dodatke kao što su: vinski ocat, limunov sok, prah od višnje, prah od celera, ružmarin i dr. Rok trajanja prerađenih mesnih proizvoda s dodanim nitritima dokazano je duži nego kod onih kojima su dodani prirodni izvori nitrata, ali je isto tako dokazano da dodatkom praha cele-





Slika 2. Kromatogram analiziranog uzorka pašete u konzervi

Figure 2 Chromatograms obtained by GC MS analysis of canned liver patty samples

ra sa ili bez 0.28% višnjinog praha dolazi do 50%-tnog smanjenja količine rezidualnih nitrita. Sigurnost mesnih proizvoda kojima se dodaju samo prirodni dodaci su vrlo upitna iz dva razloga, s jedne strane nitrit je vrlo učinkovit aditiv u suzbijanju *C. botulinum*, dok je koncentracija rezidualnih (slobodnih) nitrita je dobro poznati rizičan faktor pri nastanku N-nitrozamina. U oba slučaja, ulazna i rezidualna količina nitrita, mora se strogo kontrolirati kako bi se osigurala sigurnost proizvoda što je u slučaju proizvoda s prirodnim izvorom nitrata vrlo teško. Razlog tome je što u nekim proizvodima nastaje veća, a u nekima manja količina rezidualnih nitrita tijekom skladištenja, a važan parametar predstavlja, odnosno veza između vremena čuvanja pro-

izvoda i temperature iz razloga što utječe na redukciju nitrata u nitrite uz pomoć starter kultura zbog čega je koncentracija nitrita promjenjiva.

### Zaključak

Iz svega navedenog može se zaključiti da je bez dodatka nitrita vrlo teško osigurati mikrobiološki ispravne mesne proizvode, međutim, kao posljedica dodavanja nitrita nastaje potencijalna opasnost od nastanka toksičnih N-nitrozamina zbog reakcija slobodnih-rezidualnih nitrita koji ostaju slobodni tijekom prerade mesa. Stoga je, važno naći onu „idealnu“ količinu koja će inhibirati rast i razvoj *C. botulinum*, te osigurati mikrobiološku sigurnost i prihvatljive senzorske karakteristike proizvoda, a istovremeno neće ostati previše

slobodnih (rezidualnih) nitrita koji dalje ovisno o pH, dodatku tzv. reduktanata kao što su askorbati ili eritrobati, dodatku soli, fosfata, termalnim uvjetima procesiranja, stupaju u razne neželjene reakcije. Još uvijek nije sasvim jasno u kojoj mjeri N-nitrozamini utječu na nastanak različitih vrsta tumora kod ljudi, iako je njihova toksičnost i kancerogenost nedvojbeno dokazana pokusima na eksperimentalnim životinjama. Stoga je važno provoditi stalnu i sustavnu kontrolu mesa i mesnih proizvoda na prisutnost slobodnih nitrita i nitrata, te na eventualnu prisutnost svakako štetnih N-nitrozamina. Isto tako, potrebno je zakonski propisati maksimalno dozvoljene količine istih kao što je to slučaj u EU zakonodavstvu. Kako bi se pak mogla utvrditi kolika je stvarna izloženost i opasnost od navedenih spojeva potrebno je imati podatke o konzumaciji i prehranbenim navikama pučanstva, što u Republici Hrvatskoj još uvijek ne postoji. Potrebno je analizirati i ostale vrste mesnih proizvoda, poglavito one u konzervama, jer su to proizvodi koji se dulje skladište, pa stoga postoji opravdana opasnost od nastanka N-nitrozamina

Svakako se mora istaknuti da je primjena visokospecifične tehnike za identifikaciju i kvantifikaciju N-nitrozamina, te specifični način ekstrakcije i pročišćavanja uzoraka uporabom posebnih kolona ključne u ovom radu i predstavljaju proizvod novijeg doba i značajan napredak u analitičkim procesima.

### Zusammenfassung

### Literatura

**Anonimno** (1996): Validation of analytical procedures. ICH harmonised tripartite guideline.

**Anonimno** (2003): The effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products. The EFSA Journal, Parma.

**Anonimno** (2005): EC Directive 95/2, Annex III, dio C, EC Directive 2005/69.

**Anonimno** (2006): Guidance of the Scien-

## Nitrites and nitrates as precursors of N-nitrosamines in canned liver patties

### Summary

Nitrites and nitrates are used as curing agents in meat products and they are very important not only as preservatives, but also for color and flavor formation. They are growth inhibitors of *Clostridium botulinum*. N-nitrosamines are carcinogenic and toxic compounds that can occur in meat and meat products as the reaction product of nitrite with proteins of meat after the meat or meat products were added nitrites, and nitrates as preservatives. N-nitrosamines' harm has been proved in many scientific papers published over the last 30-odd years, and therefore requires a constant systematic control of the presence of N-nitrosamines since meat and meat products as the main source of proteins form a large share of food to the adult population and children. In the Republic of Croatia, such control is not implemented, as well as in the previous legislation there was not prescribed a maximum allowable concentration (MAC). Identification and quantification of sodium nitrites and nitrates were done by High Performance Liquid Chromatography-HPLC with DAD detector series 1200 (Agilent). The presence of N-nitrosamines was determined by gas chromatography and mass spectrometry system (GC-MS-SIM). The obtained results were ranging from 0.0001 mg/kg to 0.0099 mg/kg.

**Key words:** nitrite, nitrate, N-nitrosamines, canned liver patty

tific Committee on a request from EFSA. EFSA Journal, Parma.

**Anonimno** (2007): Pravilnik o proizvodima od mesa (2007), Narodne novine broj 01, (N.N. 01/07).

**Anonimno** (2008a): Pravilnik o prehrabnim aditivima (2008), Narodne novine broj 81, (N.N. 81/08).

**Anonimno** (2008b): Nitrate in vegetables. The EFSA Journal, Parma.

**Bošnjir, J., Z. Šmit, D. Puntarić, T. Horvat, M. Klarić, S. Šimić** (2003): Presence of N-nitrosamines in canned liver patty. Coll. Anthropology 27, 67-70.

**Branen, A. L., P. M. Davidson, S. Salmi-nen** (2002): Food Additives, Marcel Dekker, Inc. New York.

**Cammack, R., C.L. Joannou, X.Y. Cui, C. Torres Martinez, S.R. Maraj, M.N. Hughes** (2002): Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. Toxicology 180, 195-207.

**Cassens, A. R. G., T. Ito, M. Lee, D. Buege** (1978): The use of nitrite in meat. BioScience 28, 633-637.

**Cassens, R. G.** (1990): Nitrite-cured meat: A food safety issue in perspective. CT, Food and Nutrition Press, USA.

**Chow, C. K., C. B. Hong** (2002): Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. Toxicology 180, 195-207.

**Crosby, N.T., J.K. Foreman, J.F. Palfra-man, R. Sawyer** (1972): Estimation of steam volatile N-nitrosamines in foods at the 1 µg/kg level. Nature 238, 342-343.

**Domanska-Blicharz, K., M. Michalski, B. Kowalski** (2004): Effect of different storage conditions on nitrates and nitrites in Polish edible offals processed meat products. Influence on N-nitrosamine content. Bull. Vet. Inst. Pulway 48, 63-68.

**Epley, R. J., P. B. Addis, J. J. Warthesen** (2009): Nitrite in Meat. University of Minnesota.

**Girard, P. J.** (1996) Technology of meat and meat products, Ellis Horwood, London.

**Gray, J. I., C. J. Randall** (1979): The nitrite/N-nitrosamine problem in meats: an update. J. Food Prot. 42, 168-179.

**Grebel, J. E., C.C. Young, I.H. Suffet** (2006): Solid-phase microextraction of N-nitrosamines. Chromatography A. 117, 11-18.

**Groenen, P.J., R.J. Jonk, C. van Ingen, M.C.Noever de Brauw** (1976): Determination of eight volatile nitrosamines in thirty cured meat products with capillary gas chromatography-high-resolution mass spectrometry: the presence of nitrosodiethylamine and the absence of nitrosopyridine. IARC Sci. Publ. 14, 321-331.

**Honikel, K. O.** (2008) The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. Meat Sci. 78, 68-76.

**Hui, H. Y.** (1992): Encyclopaedia of Food Science and Technology, John Wiley & Sons, Inc., New York.

**Issenberg, P.** (1976): Nitrite, Nitrosamines and cancer. Federation Proceedings 35, 1322-1326.

**Jakszyn, P., A. Agundo, A. Berernguer, R. Ibáñez, P. Amiano, G. Pera, E. Ardanaz, A. Barricarte, M.D. Chirlaque, M. Dorronsoro, N. Larrañaga, C. Martinez, C. Navarro, J.R. Quirós, M.J. Sánchez, M.J. Tomo, C.A. González** (2006): Intake of food sources of nitrites and N-nitrosodimethylamine in Spain. World Journal of gastroenterology 12, 4296-4303.

**Lu S.H., H. Ohshima, H.M. Fu, Y. Tian, F.M. Li, M. Blettner, J. Wahrendorf, H. Bartsch** (1986): Urinary excretion of N-nitrosamine acids by inhabitants of high and low

risks areas for esophageal cancer in North China endogenous formation of N-nitrosoproline and its inhibition by vitamin C. Canc. Resear. 46, 1485-1491.

**Mandić, M. L.** (2007): Znanost o prehrani: hrana i prehrana u čuvanju zdravlja, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Prehrabeno tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

**Mirvish, S. S.** (1995): Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. Canc. Lett. 93, 17-48.

**Nabrzyński, M., R. Gajewska** (1994): The content of nitrates and nitrites in fruits, vegetables and other foodstuffs. Roczn. PZH 45, 167-180.

**Pearson, M. A., R. T. Dutson** (1990): Meat and Health, Advances in meat research, Elsevier Applied Science, London/New York.

**Pavlinić Prokurica, I.** (2010): Praćenje nastanka N-nitrozamia u hrani životinjskog podrijetla. Doktorska rasprava. PBF, Zagreb.

**Pegg, R. B., F. Shahidi** (2004): Nitrite Curing of Meat: The N-Nitrosamine Problem and Nitrite Alternatives. Food & Nutrition Press, USA.

**Penttilä, P. L., L. Räsänen, S. Kimppa** (1990) Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in Finnish foods and the estimation of the dietary intakes. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 190, 336-340.

**Perez Rodriguez, M. L.** (1998): Effect of adding smoke flavouring to frankfurters on nitrite and nitrate levels. Food Research International 31, 581-585.

**Preussmann, R., B. W. Stewart** (1984): N-nitroso carcinogens, Chemical Carcinogens. ACS Monograph 2, Washington.

## Nitrite und Nitrate als Präkursore von N-Nitrosamin in Pasteten und Dosen

### Zusammenfassung

#### Zusammenfassung

Nitrite und Nitrate werden in der Herstellung von Fleischerzeugnissen benutzt. Sie spielen eine wichtige Rolle nicht nur als Konservanse sondern auch bei der Formierung der charakteristischen roten Farbe und des charakteristischen Geschmacks des Fleischerzeugnisses. Sie inhibieren den Wuchs der pathogenen Bakterien Clostridium botulinum. Nitrosamine sind kanzerogene und toxische Verbindungen, die im Fleisch und in den Fleischerzeugnissen entstehen können, u.zw. als Produkt der Reaktion von Nitriten mit Fleischproteinen, nachdem dem Fleisch und den Fleischerzeugnissen Nitrite, bzw. Nitrite entwickelt als Konservanse, zugefügt werden. Die Schädlichkeit von Nitrosamin ist in vielen veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten in den letzten 30 Jahren bewiesen, so dass eine ständige und systematische Kontrolle auf Anwesenheit des N-Nitrosamins nötig ist, weil Fleisch und Fleischerzeugnisse die Hauptquelle von Proteinen einen großen Teil in der Ernährung, sowohl der Erwachsenen als auch der Kinder, darstellen. In der Republik Kroatien wird diese Kontrolle nicht durchgeführt. Außerdem sind in der bisherigen Legislative die höchsten genehmigten Mengen dieser Verbindungen (NDK) nicht vorgeschrieben. Identifikation und Quantifikation der Natri-Nitrite und Natrium-Nitrate wurden mit Hilfe der chromatographischen Technik einer hochwirksamen flüssigen Chromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography – HPLC) mit DAD Detektor Serie 1200 (Agilent) durchgeführt. Die N-Nitrosamine wurden durch das Beobachten der charakteristischen Ione im gebundenen System der Gaschromatographie und Massenspektrometrie des Fleisches (GC-MS-SIM) bestimmt. Die bekommenen Resultate bewegten sich in der Spanne von 0.0001 mg/kg bis 0.0099 mg/kg.

**Schlüsselwörter:** Nitrit, Nitrat, N-Nitrosamin, Pastete in Dosen

## Nitrites and nitrates as precursors of N-nitrosamines in canned liver patties

### Summary

Nitrites and nitrates are used as curing agents in meat products and they are very important not only as preservatives, but also for color and flavor formation. They are growth inhibitors of Clostridium botulinum. N-nitrosamines are carcinogenic and toxic compounds that can occur in meat and meat products as the reaction product of nitrite with proteins of meat after the meat or meat products were added nitrites, and nitrates as preservatives. N-nitrosamines' harm has been proved in many scientific papers published over the last 30-odd years, and therefore requires a constant systematic control of the presence of N-nitrosamines since meat and meat products as the main source of proteins form a large share of food to the adult population and children. In the Republic of Croatia, such control is not implemented, as well as in the previous legislation there was not prescribed a maximum allowable concentration (MAC). Identification and quantification of sodium nitrites and nitrates were done by High Performance Liquid Chromatography-HPLC with DAD detector series 1200 (Agilent). The presence of N-nitrosamines was determined by gas chromatography and mass spectrometry system (GC-MS-SIM). The obtained results were ranging from 0.0001 mg/kg to 0.0099 mg/kg.

**Key words:** nitrite, nitrate, N-nitrosamines, canned liver patty

**Reinik, M.** (2007): Nitrates, nitrites, N-nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons in food: analytical methods, occurrence and dietary intake. Dissertation, University of Tartu.

**Roberts, T. A.** (1995): The microbiological role of nitrite and nitrate. J. Sci. Food Agric. 26, 1755-1760.

**Sabranek, G. J., N. J. Bacus** (2007): Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite, what are the issues?. Meat Sci. 77, 136-147.

**Schuddeboom, L. J.** (1993): Nitrates and nitrites in foodstuffs. Council of Europe Press, Publishing and Documentation Service, ISBN 92-871-2424-8.

**Sen, N. P., S. Seaman, M. McPherson** (1980): Further studies on the occurrence of volatile and non-volatile nitrosamines in foods. IARC Sci. Publ. 31, 457-465.

**Sharat, D., Gangolli, I.** (1995) Nitrate, nitri-

te and N-nitroso compounds. *Developments in Food Science* 37, 685-704.

**Tannenbaum, S. R.** (1985): Diet and exposure to N-nitroso compound. Princess Takamatsu Symp. 16, 67-75.

**Walker, R.** (1990): Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds: a review of the occurrence in food and diet and toxicological implications. Food Addit. Contam. 7, 717-768.

**Watson, D. H.** (2002): Food chemical safety: Additives, CRC Press, Florida.

Dostavljeno: 4. listopada 2010.

Prihvaćeno: 28. listopada 2010.