

ARTUR CIEMNIAK

## PORÓWNANIE ZAWARTOŚCI N-NITROZODIMETYLOAMINY W WYBRANYCH PRODUKTACH MIĘSNYCH

### A COMPARISON OF N-NITROSODIMETHYLAMINE CONTENTS IN SELECTED MEAT PRODUCTS

Katedra Toksykologii Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa  
Akademia Rolnicza w Szczecinie  
71-459 Szczecin, ul. papieża Pawła IV 3  
Kierownik Katedry: prof. dr hab. *M. Protasowicki*  
e-mail: arthur@tz.ar.szczecin.pl

*Przeprowadzono badania wybranych produktów mięsnych pod kątem zawartości w nich N-nitrozodimetyloaminy. Analizy wykonano techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Najwyższe zawartości N-nitrozodimetyloaminy stwierdzono w produktach peklowanych i wędzonych.*

**Słowa kluczowe:** N-nitrozoaminy, N-nitrozodimetyloamina, NDMA  
**Key words:** N-nitrosamines, N-nitrosodimethylamine, NDMA

#### WSTĘP

Epidemiolodzy oceniają, że około 30-40% nowotworów jest wywoływane przez kancerogeny występujące w diecie człowieka. To zjawisko dotyczy zwłaszcza nowotworów przewodu pokarmowego. Doświadczenia na zwierzętach wykazały, że związki nitrozowe i nitrozoaminy są jednymi z najaktywniejszych czynników rakotwórczych spotykanych w żywności [11].

Najsilniejsze działanie rakotwórcze wywiera N-nitrozodimetyloamina NDMA. Zazwyczaj dawka 30-100 µg tej nitrozoaminy na kilogram paszy wywołuje raka u zwierząt, a u myszy jest to zaledwie 10 µg/kg. N-nitrozopirolidyna ma 100-krotnie mniejsza aktywność. Stwierdzono, że nitrozoaminy znacznie zwiększają ryzyko wystąpienia raka u palaczy i osób żujących tytoń. Pierwsze obserwacje potwierdzające wysoką kancerogenność nitrozoamin pojawiły się w latach pięćdziesiątych 20 wieku, gdy *Magee i Barns* [12] stwierdzili, że N-nitrozodimetyloamina (NDMA), jest silną trucizną i wywołuje uszkodzenia wątroby oraz nowotwory u szczurów. W latach sześćdziesiątych natomiast, stwierdzono, że nitrozoaminy są przyczyną padania zwierząt karmionych paszą zawierającą mączkę rybną konserwowaną azotynem sodowym [5]. Wysłunięto wówczas hipotezę, że wyizolowane z paszy nitrozoaminy powstały z amin tworzących się w procesie psucia się białek i dodanego azotynu sodu.

Od tego czasu poddano badaniom ponad 300 związków nitrozopochodnych. Wykazano, że 85% nitrozoamin i 92% nitrozoamidów ma zdolność wywoływania nowotworów u rozmaitych gatunków ryb, gadów, ptaków i ssaków. Potwierdzono także, że związki nitrozowe wywołują schorzenia nowotworowe u ludzi np. nowotwory przełyku, płuc, trzustki, wątroby, nerek, oraz pęcherza moczowego. Współczesne badania wykazują ponadto, że związki te odgrywają ważną rolę, jako związki inicjujące zjawiska kancerogenezy u ludzi i zwierząt.

Właściwości rakotwórcze nitrozoamin oraz fakt, że ich prekursorami są związki powszechnie obecne w żywności, decydują o ciągłych badaniach mechanizmu tworzenia nitrozwiązków podczas procesów technologicznych i w czasie trawienia. Powstają ze związków charakteryzujących się obecnością grupy aminowej, ulegającej nitrozowaniu, oraz z azotanów i azotynów, które są źródłem trójtlenku azotu, spotykanego także wśród zanieczyszczeń powietrza. Nitrozoaminy są związkami trwałymi, powoli rozkładającymi się pod wpływem światła lub w kwaśnych roztworach wodnych. Mają zróżnicowaną budowę, a tym samym właściwości. Są to związki stałe lub ciekłe. Niektóre z nich mają konsystencję oleistą. Są lotne z parą wodną, co wykorzystuje się przy ich oznaczaniu.

Mechanizm powstawania nitrozoamin polega na elektrofilowym podstawieniu rodnika NO dowolnej pary elektronowej azotu aminowego [18]. Głównym ich źródłem są reakcje pomiędzy aminami drugo- i trzeciorzędowymi, a azotynami [11]. Reakcje te mogą zachodzić podczas ogrzewania żywności oraz w organizmie człowieka. Zwłaszcza w żołądku występują szczególnie sprzyjające warunki ich powstawania, wytworzone obecnością kwaśnego soku żołądkowego. Ich źródłem mogą być procesy przemian mikrobiologicznych i enzymatycznych w mięsie, rybach, serach, przetworach zbożowych, herbacie, soi, winie, piwie, kapuście kiszonej. W stanie naturalnym występują aminy w pieprzu, papryce, bananach i lekach [11, 14]. Prawie zawsze stwierdza się nitrozoaminy w żywności zawierającej azotany lub będącej w kontakcie z tlenkami azotu. *Rywotycki* [17], badając udział dodatków funkcjonalnych na zawartość NDMA w mięsie wieprzowym i wołowym stwierdził, że dodatek azotynu sodu znacznie zwiększa zawartość tych związków w produktach. Mięso wieprzowe surowe parzone zawierało 6,95  $\mu\text{g}/\text{kg}$  NDMA podczas gdy mięso peklowane 18,77  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Niepokojące jest to, że prekursorami N-nitrozoamin jest tak wiele substancji naturalnie występujących w żywności lub sztucznie do niej wprowadzanych. Z glicyny i waliny powstaje N-nitrozodimetyloamina i N-nitrozometyloetyloamina. piperydyna i piperolidyna powstają w wyniku bakteryjnego rozkładu białka z lizyny lub podczas ogrzewania z putrescyny i kadaweryny. Liczne pestycydy, np. pochodne kwasu karbaminowego, mocznika, tiomocznika, mogą z azotynami tworzyć odpowiednie nitrozwiązki. Szereg powszechnie stosowanych leków może ulec nitrozowaniu, stając się źródłem nitrozoamin [7].

Żywność konserwowana, zwłaszcza, kiedy jest ogrzewana może zawierać do 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  N-nitrozodimetyloaminy (NDMA). Najczęściej NDMA spotyka się na poziomie 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Jednym z jej głównych źródeł jest piwo. W niektórych piwach w Niemczech stwierdzano powyżej 70  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$  NDMA, (najczęściej 5-10  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ ). Są to ilości znaczące zwłaszcza dla osób spożywających duże ilości piwa [11]. W piwach dostępnych w Polsce stwierdzono m.in. N-nitrozodimetyloaminę na poziomie 0,71-1,67  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$  [3]. Powszechnie NDMA występuje w rybach, a osiągnięte stężenia ze względu na większą zawartość amin są dużo wyższe. W suszonym wątluszu stwierdzono np. NDMA w ilości 46,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Obróbka ter-

miczna powodowała wzrost zawartości NDMA w zakresie 53,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (podgrzewacz parowy) do 630,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (piec węglowy) [10]. Stosowanie podczas solankowania soli zawierającej zanieczyszczenia w postaci azotanów i azotynów może prowadzić do osiągnięcia skrajnie wysokich zawartości nitrozoamin, np. 1100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  NDMA w sardeli [6]. Sery ze względu na dużą zawartość amin oraz stosowanie saletry potasowej w produkcji serowarskiej mogą także stać się źródłem nitrozoamin w diecie człowieka. Najczęściej spotyka się w nich N-nitrozodimetyloaminę i N-nitrozodietylloaminę [4].

Duży wpływ na proces tworzenia się nitrozoamin ma proces wędzenia. Wynika to z możliwości nitrozowania amin w podwyższonej temperaturze pod wpływem tlenków azotu znajdujących się w dymie wędzarniczym [16]. Reakcje nitrozowania zależą nie tylko od obecności prekursorów, lecz także od ich ilości, temperatury i pH. Aminy silnie zasadowe reagują z azotynami powoli, aminy słabo zasadowe reagują łatwo w ilościach stechiometrycznych. Reakcje te przebiegają w środowisku kwaśnym, a na przyspieszenie tego procesu wpływa obecność niektórych jonów nieorganicznych [7] oraz podnoszenie się temperatury, szczególnie powyżej 100%. Nitrozoaminy mogą jednak tworzyć się nawet w temperaturze poniżej 0°C [20].

Celem niniejszej pracy było porównanie zawartości uważanej za najbardziej toksyczną N-nitrozodimetyloaminy w wybranych produktach mięsnych.

## MATERIAŁ I METODY

Do badań zostały wybrane powszechnie dostępne w handlu detalicznym w Szczecinie produkty (Tab I.). Badania zostały przeprowadzone na mięsie surowym i jego przetworach. Analizę zawartości NDMA w badanym asortymencie wykonano w oparciu o metodę zaproponowaną przez *Raoul'a* [15]. Próbkę żywności wstępnie zhomogenizowano, następnie pobrano z nich po dwie naważki ok. 6 g. Do każdej z nich dodano po 6  $\text{cm}^3$  0,1 molowego roztworu NaOH i ponownie homogenizowano. Próbkę następnie dokładnie mieszano z 8 g sorbentu (Extrelut), a następnie umieszczano w szklanych kolumnach (1,5  $\text{cm} \times 17$  cm). Frakcje zawierającą nitrozoaminy eluowano z kolumny 40  $\text{cm}^3$  mieszaniny heksan:dichlorometan w stosunku objętościowym 3:2. Przesącz zbierano do kolb stożkowych o pojemności 100  $\text{cm}^3$  i zatężano w temp 40°C do objętości ok. 2  $\text{cm}^3$ . Ekstrakt następnie наносono na kolumny wypełnione 1 g florisilu (wcześniej kondycjonowanych 6  $\text{cm}^3$  heksanu). Złoże przemywano 10  $\text{cm}^3$  heksanu usuwając z próbki nadmiar tłuszczów. Zaadsorbowane nitrozoaminy wymywano ze złoża za pomocą 8  $\text{cm}^3$  mieszaniny dichlorometan:metanol: 95:5. Próbkę zatężano do objętości 0,5  $\text{cm}^3$  w strumieniu gazu obojętnego ( $\text{N}_2$ ).

Rozdział analityczny badanych próbek wykonano techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas GC-MS (HP6899/5973). Oznaczenie analizowanych związków wykonano w trybie monitorowania pojedynczych jonów SIM (*selective ion monitoring*). Poszczególne analizy wykonano w dwu powtórzeniach, a uzyskane wyniki uśredniono.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Z przeprowadzonych badań wynika, że N-nitrozodimetyloamina występuje we wszystkich badanych próbkach. Poziom NDMA w mięsie i jego przetworach jest zróżnicowany, zależnie od stosowanych procesów przetwórczych. Wyraźnie zaznacza się wzrost zawartości NDMA podczas peklowania mięsa (Tab I). *Rywotycki* [18] przeprowadzając analizy m.in. na mięsie wieprzowym surowym stwierdził NDMA na poziomie 0,92-3,01  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , zależnie od pory roku natomiast w mięsie peklowanym 10,54  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . *Beatriz* [1] natomiast

wykrył NDMA w wieprzowinie na poziomie 0,4–0,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Z badań wpływu czasu i temperatury pasteryzacji oraz dodatku azotynu sodu przeprowadzonych przez *Szumilak* i *Gudaszewskiego* [19] na konserwach z mięsa owczego wynika, że zawartość nitrozoamin jest tym większa im więcej użyto azotynu sodu do peklowania mięsa. Ponadto zawartość nitrozoamin zwiększa się wraz ze wzrostem czasu i temperatury pasteryzacji. Przy czym większy wpływ ma temperatura pasteryzacji.

Tabela I. Zawartości N-nitrozodimetyloaminy [ $\text{mg}/\text{kg}$ ] w analizowanych produktach mięsnych  
Contents of N-nitrosodimethylamine [ $\text{mg}/\text{kg}$ ] in the analysed meat products

Lp	Nazwa produktu	Zawartość NDMA [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
1	Łopatka bez kości (mięso nie peklowane)	2,47
2	Łopatka bez kości (mięso peklowane)	9,075
3	Boczek parzony	5,6
4	Wędzonka chłopska	4,32
5	Szynka konserwowa	2,015
6	Polędwica wędzona	10,9
7	Blok śniadaniowy	0,049
8	Szynka gotowana	1,75
9	Kielbasa polska wędzona	16,46
10	Salami polskie	0,47
11	Kielbasa jarmarczna	1,53
12	Polędwica z kurcząt	5,06
13	Krakowska sucha	2,17

Najwyższą zawartość NDMA stwierdzono w produktach wędzonych (polędwica –10,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , kielbasa polska wędzona –16,46  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Podyktowane jest to tym, że w procesie wytórczym tych produktów występuje peklowanie i wędzenie, a jak stwierdzono oba te procesy przyczyniają się do wysokiego wzrostu zawartości nitrozoamin w produkcie finalnym. *Rywotycki* [16] badając udział dodatków funkcjonalnych i procesów, tj. pasteryzacja, peklowanie oraz wędzenie stwierdził w szynkach wieprzowych peklowanych i następnie wędzonych 24  $\mu\text{g}/\text{kg}$  NDMA podczas gdy mięso surowe wędzone zawierało 11,95  $\mu\text{g}/\text{kg}$  NDMA. Poddane podobnym procesom (tj. peklowanie i wędzenie) mięso wołowe zawierało 23,54  $\mu\text{g}/\text{kg}$  NDMA, w mięsie wołowym parzonym stwierdzono natomiast NDMA na poziomie 6,95  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Podwyższone zawartości NDMA stwierdzono w produktach wędzonych parzonych (boczek parzony – 5,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , wędzonka chłopska – 4,32  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Stosunkowo niskie zawartości NDMA stwierdzono w produktach podanych pasteryzacji: od 0,049  $\mu\text{g}/\text{kg}$  w bloku śniadaniowym do 2,015  $\mu\text{g}/\text{kg}$  w szynce konserwowej. Szynka gotowana zawierała NDMA w ilości 1,75  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Polędwica drobiowa zawierała natomiast 5,06  $\mu\text{g}/\text{kg}$  NDMA, co jest niewątpliwie wynikiem stosowania azotynów w procesie wytórczym. Podobne wyniki stwierdził *Jurtchenko* [8] – 1,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  NDMA w szynce, natomiast wg *Rywotyckiego* [17] zawartość tego kancerogenu w szynce pasteryzowanej wołowej wynosiła 10,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a w szynce wieprzowej 5,16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Niskie zawartości NDMA

stwierdzono w kielbasach parzonych, np. 1,53  $\mu\text{g}/\text{kg}$  w kielbasie jarmarcznej. W podobnym badaniu Komarow [9] stwierdził NDMA w zakresie 0,2-0,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , natomiast Raoul [15] w kielbasach stwierdził NDMA w zakresie 0,3-0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Mitacek [13] w badaniach przeprowadzonych w Tajlandii stwierdził w kielbasach NDMA na poziomie 1,2-1,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

W badaniach własnych niską zawartość NDMA stwierdzono w salami (Tab I), podczas gdy Buyn [2] zależnie od rodzaju zastosowanego opakowania (powietrze, próżnia) oraz dawki napromieniowania stosowanego do sterylizacji stwierdzili NDMA w salami w zakresie 3,2-8,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Nitrozoaminy występujące w żywności nadal stanowią realne zagrożenie dla zdrowia, nawet pomimo tego, że ich poziom w żywności uległ obniżeniu w ciągu ostatnich 30 lat. Jest to związane przede wszystkim ze zmniejszeniem ilości stosowanych azotanów w przetwórstwie żywności. Zawartość nitrozoamin w żywności jest często śladowa, nie można jednak tego ignorować. Są to związki o bardzo wysokim potencjale kancerogennym, ponadto przypuszcza się, że człowiek jest prawdopodobnie dużo bardziej wrażliwy na te związki niż zwierzęta doświadczalne.

## WNIOSKI

1. N-nitrozodimetyloaminę (NDMA) wykryto we wszystkich badanych próbkach produktów mięsnych

2. Najwyższą zawartość NDMA stwierdzono w produktach poddanych peklowaniu, a następnie wędzeniu, wynosiła ona 10,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  w polędwicy wędzonej i 16,46  $\mu\text{g}/\text{kg}$  w kielbasie polskiej wędzonej.

### A. Ciemniak

#### A COMPARISON OF N-NITROSODIMETHYLAMINE CONTENTS IN SELECTED MEAT PRODUCTS

##### Summary

Nitrosamines are known as the most potent group of carcinogens. Approximately 300 of these compounds have been tested, and about 90% of them have been found to be carcinogenic in laboratory animals. N-nitrosodimethylamine causes liver cancer, whereas some of tobacco specific nitrosamines causes lung cancer. Volatile N-nitrosamines induce tumors in a variety of human organs, including the tongue, esophagus, lung, pancreas, liver, kidney and bladder. They are formed during reaction of secondary or tertiary amino compounds and nitrite or nitrogen oxides. Nitrosamines occurs as contaminants in many foodstuff including food and beverages: beers, cheeses, sausages, smoked and pickled foods. They are formed during frying, smoking and food preserved with pickling salt. These compounds can also be produced in man and other mammals under the acidic conditions in the stomach.

The present study was carried out to determine level of N-nitrosodimethylamine in selected 13 meat products. The extraction procedure was based on Raoul's method, i.e. on two consecutive extraction-concentration step using extrelut and florisisil columns.

The level of N-nitrosodimethylamine was varied from 0,049 mg/kg to 16,47 mg/kg. The highest level of NDMA was found in smoked sausage.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Beatriz M., Gloria A., Barbour J., F., Scanlan R., A.*: Volatile nitrosamines in fried bacon., *Food Chem.* 1997, 45, 1816-1818.
2. *Buyn Myung-Woo, Ahn Hyun-Joo, Kim-Jae-Hyun, Lee Yu-Woon, Yook Hong-Sun, Han Sang-Bae.*: Determination of volatile n-nitrosamine in irradiated fermented sausage by gas chromatography coupled to thermal energy analyser. *J. Chromatography A*, 2004, 1054, 403-407.
3. *Ciemiak A.*: Oznaczanie zawartości N-nitrozodimetyloaminy w piwach. XXXVI Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności Polskiej Akademii Nauk, Szczecin 13-14 września 2005; 127.
4. *Dellisanti A., Cerutti G., Airoidi L.*: Volatile N-Nitrosoamines in selected Italian cheses. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1996; 57: 16-21.
5. *Ender N., Favre D., Helgebostad A., Koppang., Madsen L.*: Isolation and identification of hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring. *Naturwissenschaften* 51, 1964, 637-638
6. *Fong Y., Y., Chan W., C.*: Dimethylamine in chinese marine salt fish. *Food Cosmetics and Toxicology*, 1973, 11, 841-845.
7. *Gerting H.*: Żywność a zdrowie. PZWL, 1996, 361-367.
8. *Jurtchenko S., Tenno T., Mölder U., Reinik M.*: Determination of volatile N-nitrosamine by gas chromatography-mass spectrometry with positive-ion chemical ionization. *Proc Estonian Acad. Sci. Chem.*, 2002, 51, 3, 169-184.
9. *Komarow N., V., Velikanow A., A.*: determination of volatile N-nitrosamines in food by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Anal. Chem.* 2001, 56, 4, 359-363.
10. *Lee S., J., Shin J., H., Sung N., J., Hotchkiss J. H.*: Effect of cooking on the formation of n-nitrosodimethylamine in Korean dried seafood products. *Food Additives and Contaminants*, 2003, 20, 1, 31-36.
11. *Lijinsky W.*: N-nitroso compounds in the diet. *Mutation research* 443, 1999, 129-138.
12. *Magee P.N., Barnes P. P.*: The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethyloamine. *Br. J. Cancer* 10, 1956, 114-122.
13. *Mitacek E.J., Brunnemann K.D., Suttajit M., Martin M., Limsila T., Ohsima H., Caplan L. S.*: Exposure to n-nitrosocompounds in population of high liver cancer regions in Thailand: volatile nitrosamine (VNA) levels in Thai food. *Food Chem Toxicol.* 1999, 37, 297-305.
14. *Murkovic M., Pfannhauser W.*: Analisis of the cancerogenic heterocyclic aromatic amines in fried meat. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2000, 366, 375-378.
15. *Raoul S., Gremaud E., Biaudet H., Turesky R.*: Rapid solid-phase extraction for detection of volatile nitrosamines in food. *J., Food Chem.* 1997, 45, 4706-4713.
16. *Rywotycy R.*: Wpływ udziału różnych zestawów dodatków funkcjonalnych i procesów: peklowania, pasteryzacji oraz wędzenia i pasteryzacji na ilość nitrozoamin w szynce wołowej. *Medycyna Weterynaryjna* 1999, 55(8) 550-555.
17. *Rywotycy R.*: Wpływ wędzenia i wybranych dodatków funkcjonalnych na zawartość nitrozoamin w mięsie wieprzowym, *Medycyna Weterynaryjna* 1999, 55(3) 199-203.
18. *Rywotycy R.*: Występowanie nitrozoamin w mięsie. *Med. Wet.* 53 (120), 1997, 726-729.
19. *Szumilak K., Gudaszewski T.*: Lotne N-nitrozoaminy w przetworach mięsnych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1985, 17, 21-24.
20. *Szumilak K.*: Mechanizm tworzenia się nitrozoamin. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1983, 19 (01), 27-31.