

RYSZARD RYWOTYCKI

Występowanie nitrozoamin w mięsie

Katedra Mikrobiologii AR, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Summary

The occurrence of nitrosamines in meat

The aim of the study was to examine the characteristics of the occurrence of nitrosamines in raw meat of various species of slaughter animals and the influence of the season on their concentration. The nitrosamines were extracted from raw material, distilled, concentrated under vacuum and characterized through gas chromatography using the Pancholy method. The greatest nitrosamine content (dimethyl nitrosamine DMNA, diethyl-nitrosamine DENA) was found in pork and beef. In mutton, goat meat and horse, meat, DMNA and DENA were present only in the meat of grazing animals.

Nitrozoaminy są to substancje chemiczne o silnym działaniu toksycznym, mutagennym, neuro- i nefrotoksycznym teratogennym i rakotwórczym, powstające głównie w środowiskach glebowych, ale także w paszach i żywności (12, 13, 17) z amin I, II i III-rzędowych oraz amidów a także z produktów biotransformacji niektórych pestycydów i innych prekursorów. W tab. 1 przedstawiono ważniejsze nitrozoaminy, występujące w środowiskach glebowych ekosystemów polowych i trawiastych oraz wodach powierzchniowych jak również i produktach rolnych (pasze).

Powstawanie prekursorów nitrozoamin i tworzenie się nitrozoamin w środowiskach glebowych jest uzależnione od wielu czynników fizykochemicznych środowiska glebowego, odczynu gleby, szaty ro-

ślinnej itp. (25-32). Niewątpliwie zakwaszenie środowiska glebowego ww. ekosystemów sprzyjać będzie powstawaniu nitrozoamin. Kinetyka reakcji nitrozacji była przedmiotem badań prowadzonych głównie przez Mirvisha (16-18) oraz Yamadę i wsp. (35). Mirvish dowiódł, że w przypadku amin II-rzędowych szybkość tworzenia się nitrozoamin przebiega według równania drugiego rzędu. Dla amin II- i III-rzędowych największą szybkość reakcji notuje się w środowisku kwaśnym tj. przy pH=3-3,4. Największą jednak wydajność uzyskuje się przy pH=4-5 (18, 19). Mechanizm powstawania nitrozoamin polega na elektrofilowym podstawieniu rodnika NO dowolnej pary elektronowej azotu aminowego.

Należy jeszcze dodać, że w powstawaniu niektórych nitrozoamin (tab. 1) uczestniczą także bakterie autotroficzne (chemoheterotroficzne, chemoautotroficzne i fotoautotroficzne) i heterotroficzne, czynne w biochemicznych procesach nitryfikacji i denitryfikacji oraz liczne bakterie z rodzaju *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Nocardia* i *Streptomyces*, a także grzyby glebowe z rodzaju *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Cryptococcus*, *Penicillium* i wiele innych (1, 2, 4, 9, 15, 19, 25, 26, 28, 30, 34).

Badania toksykologiczne ekosystemów polowych i trawiastych przeprowadzone w latach 1980-1994 w Szwecji (11), w Polsce (25-31), a także w USA (36) wykazały, że wraz z intensyfikacją rolnictwa (stosowanie wysokich dawek mineralnych nawozów azotowych i gnojowicy) pojawiły się w środowiskach glebowych agroekosystemów i ekosystemów

Tab. 1. Nitrozoaminy występujące w niektórych środowiskach glebowych agrosystemów, ekosystemów trawiastych i w wodach powierzchniowych oraz w warzywach i produktach rolnych (pasze)

Nazwa nitrozoamin	Występowanie
Dimetylonitrozoamina (NDMA) (N-Nitrosodimethylamine)	gleby agroekosystemów, wody powierzchniowe, ekosystemy trawiaste, pasze-kiszonki, warzywa
Dietylonitrozoamina (NDEA) (N-Nitrosodiethylamine)	j.w.
Dibutylnitrozoamina (NDBA) (N-Nitrosodibuthylamine)	j.w.
Difenylnitrozoamina (N-Nitrosodiphenylamine)	j.w.
Dipropylnitrozoamina (NDPA) (N-Nitroso-di-N-propylamine)	j.w.
Nitrozoetylomocznik (N-Nitroso-N-ethylurea)	j.w.
Metylobutylnitrozoamina (N-Nitroso-N-methyl-butylamine)	j.w.
Metylofenylnitrozoamina (N-Nitroso-N-phenyl-methylamine)	j.w.
Nitrozopyrolidyna (NPYR) (N-Nitrosopyrrolidine)	j.w.
Nitrozopiperydyna (NPIP) (N-Nitrosopiperidine)	pasze, płody rolne, warzywa

w/g Hilla (9), Kofoeda i wsp. (11), Smyka (25) oraz Smyka i wsp. (30, 31).

trawiastych (użytki zielone: pastwiska i łąki) oraz w wodach powierzchniowych – nowe zagrożenia ekotoksykologiczne w postaci takich nitrozoamin, jak: dimetylonitrozoamina – NDMA, dietylonitrozoamina – NDEA, dibutylnitrozoamina – NDBA, dipropylonitrozoamina – NDPA, metylofenylnitrozoamina – NPMA, nitrozoetylomocznik – N-nitroso-N-etyluurea, nitrozopiperidyna – NPIP, nitrozopyrolidyna – NPYR i wiele innych o różnych stężeniach (0,75–25,0 ppm) w środowiskach glebowych i wodnych. Najsilniejszym działaniem toksycznym odznaczają się nitrozodimetyloamina (NDMA) i nitrozodietiloamina (NDEA). Prekursorem nitrozodimetyloaminy jest aminokwas glicyna, a nitrozodietiloaminy – alanina (21). Mogą się one także tworzyć z mono-, dwu- i trójmetyloamin oraz czwartorzędowych soli amoniowych (3).

Powyższe nitrozoaminy (przeważnie lotne) odznaczają się silnym działaniem fitotoksycznym, mutagennym, teratogennym i rakotwórczym w stosunku do mikro- i makroorganizmów (grzyby, rośliny, zwierzęta, ludzie). Zalegają one w glebach od 90 do 128 dni, natomiast w środowiskach wodnych (studnie wiejskie, jeziora, stawy rybne, rzeki) od 80–110 dni (7, 9–11, 20, 26–29, 32, 38).

Nawożenie gleb uprawnych i gleb użytków zielonych azotem mineralnym (zwłaszcza dawkami powyżej 120 kg N/ha/rok) sprzyja powstawaniu nitrozoamin w środowiskach glebowych, co doprowadza do eliminacji z badanych fitocenoz około 70% gatunków roślin motylkowych i traw (w porównaniu z obiektami kontrolnymi). Następuje więc dominacja roślin azotolubnych, które spasane przez zwierzęta na pastwisku, czy też w postaci kiszzonek i innych pasz objętościowych mogą dostawać się do organizmów zwierzęcych (bydło, świnie, owce, kozy, konie itd.), powodując bezpośrednie zagrożenie ich zdrowia, a pośrednio zdrowia konsumentów (4, 6, 8–10, 14, 29, 31).

Doceniając w pełni znaczenie zagrożenia zdrowia ludzkiego przez rakotwórcze nitrozoaminy, oznaczane coraz częściej w różnych produktach żywnościowych, płodach rolnych i paszach, podjęto badania nad występowaniem nitrozoamin w mięsie. Ich celem było stwierdzenie występowania nitrozoamin w surowym mięsie pochodzącym od gatunkowo zróżnicowanych zwierząt rzeźnych (świnie, bydło, w tym cielęta, owce, konie, kozy) oraz prześledzenie wpływu pór roku na ich ilość.

Materiał i metody

Zwierzęta rzeźne pochodziły z rejonu Małopolski. Próbkę mięsa wieprzowego (łoszki, wieprzki, maciory i knury), wołowego (wolce, jałowice, krowy), baraniego, cielęcego i koziego pobierane były z Zakładów Mięśnych w Krakowie, w Tarnowie i w Dębicy. Mięso końskie pobierano z GS „Samopomoc Chłopska” w Skawinie.

Badania prowadzono w okresie wiosennym, letnim, jesiennym i zimowym. Doświadczenie realizowane było w trzech seriach a w każdej serii wykonywano siedem powtórzeń.

Pobrane z zakładów mięśnych próbki mięsa w ilości 1 kg zostały przewiezione do laboratorium Katedry Mikrobiologii AR w Krakowie, pozbawione okrywy tłuszczowej i tłuszczu międzymięśniowego oraz poddane wstępnemu rozdrobnieniu. Uzyskany w powyższy sposób materiał został następnie rozdrobniony w wilku przez siatkę o średnicy oczek 2 mm i zhomogenizowany.

Zawartość nitrozoamin (dimetylonitrozoaminy – DMNA i dietylonitrozoaminy – DENA) w mięsie i przetworach mięśnych oznaczano zmodyfikowaną metodą Pancholy'ego (22). W oznaczeniach analitycznych stosowano roztwory przyrządzane wg Scanlana (23) i Scanlana i Ryesa (24). Oznaczenia DMNA i DENA wykonywano w następujący sposób:

Do kolby o pojemności 250 cm³ wlewano 80 cm³ wodnego roztworu NaCl i K₂CO₃ i wprowadzano reprezentatywną 50 g próbkę mięsa. Następnie do kolby o pojemności 125 cm³ dodawano przedestylowany chlorek metylenu cz.d.a. w ilości 50 cm³. Obydwie kolby podłączano do aparatu Pancholy'ego i ogrzewano w łaźni wodnej w temp. 60°C przez 3 godz. w celu przeprowadzenia destylacji i ekstrakcji nitrozoamin z badanego materiału. Otrzymany ekstrakt odprowadzano do kolby o pojemności 50 cm³ i następnie zagęszczano w wyparce do objętości 1 cm³.

Zawartość nitrozoamin w ekstrakcie oznaczano na chromatografii gazowej firmy Perkin-Elmer, F-21, który był wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID), kolumnę metalową o długości 2 m i przekroju wewnętrznym 4 mm, wypełnioną 5% Carbowax'em 1500 na chromosorbie G 60/80 mesh. Analizowano próbki materiału o zawartości 5 µg zagęszczonego destylatu w następujących temperaturach: kolumny 110°C i komory wtryskowej 250°C. Gazem nośnym był azot o przepływie 40 ml/minutę.

Ilościową i jakościową interpretację chromatogramów dokonywano przez porównanie z chromatogramami roztworów wzorcowych dimetylonitrozoaminy (DMNA) i dietylonitrozoaminy (DENA), produkcji SIGMA, Chemical Comp., St. Louis, Mo., USA.

Oznaczenia chromatograficzne zostały wykonane w pracowni chromatografii preparatywnej w Środowiskowym Laboratorium Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Wyniki i omówienie

Z przeprowadzonych badań mięsa surowego, pochodzącego od gatunkowo zróżnicowanych zwierząt gospodarskich (mięso wieprzowe, mięso wieprzowe z maciory, mięso wieprzowe z knura, mięso wołowe z byczka, mięso wołowe z jałowicy, mięso wołowe z krowy oraz mięso: baranie, końskie i kozie) i w różnych porach roku wynika, że oceniane mięso wieprzowe i wołowe, zawierało dość znaczne ilości nitrozoamin (DMNA i DENA). Uzyskane wyniki przedstawione zostały w tabeli 2.

Tab. 2. Średnie zawartości nitrozoamin ($\mu\text{g}/\text{kg}$) w mięsie gatunkowo zróżnicowanych zwierząt w zależności od pory roku

Mięso	Pora roku	Nitrozoamina	X_{oc}	S	Z	
1	2	3	4	5	6	
Loszek i wieprzków	zima	DMNA	4,41	4,34	98,4	
		DENA	0,86	1,26	146,5	
	wiosna	DMNA	3,08	4,47	145,2	
		DENA	5,29	5,50	104,0	
	lato	DMNA	0,66	1,16	175,9	
		DENA	0,19	0,56	294,7	
	jesień	DMNA	1,21	1,76	145,4	
		DENA	8,00	3,47	43,3	
	Macior	zima	DMNA	1,83	2,11	115,2
			DENA	0,05	0,07	148,0
		wiosna	DMNA	0,28	0,60	215,0
			DENA	1,56	2,40	153,8
lato		DMNA	3,92	5,09	127,9	
		DENA	-	-	-	
jesień		DMNA	1,37	1,77	129,0	
		DENA	4,73	3,17	67,0	
Knurów		zima	DMNA	0,08	0,13	166,5
			DENA	0,03	0,07	246,7
		wiosna	DMNA	2,63	2,71	103,0
			DENA	1,23	1,96	159,1
	lato	DMNA	4,46	4,08	91,6	
		DENA	1,46	2,49	170,8	
	jesień	DMNA	0,18	0,39	215,0	
		DENA	1,41	1,88	133,3	
	Wolców	zima	DMNA	3,66	4,97	135,7
			DENA	0,10	0,10	100,0
		wiosna	DMNA	-	-	-
			DENA	2,57	2,97	115,4
lato		DMNA	-	-	-	
		DENA	-	-	-	
jesień		DMNA	1,94	2,37	122,4	
		DENA	7,64	1,45	190,0	
Jałowic		zima	DMNA	1,77	3,58	202,2
			DENA	0,23	0,60	261,7
		wiosna	DMNA	-	-	-
			DENA	3,74	2,24	59,8
	lato	DMNA	-	-	-	
		DENA	-	-	-	
	jesień	DMNA	1,29	1,26	97,7	
		DENA	5,67	4,00	70,6	

cd. tab. 2.

1	2	3	4	5	6	
Krów	zima	DMNA	0,02	0,06	296,0	
		DENA	0,70	1,19	169,5	
	wiosna	DMNA	-	-	-	
		DENA	0,52	0,52	100,0	
	lato	DMNA	0,13	0,33	256,2	
		DENA	-	-	-	
	jesień	DMNA	3,35	2,71	80,9	
		DENA	2,90	3,38	116,6	
	Cieląt	zima	DMNA	0,02	0,06	296,0
			DENA	-	-	-
		wiosna	DMNA	0,92	1,50	163,6
			DENA	0,78	1,25	159,9
lato		DMNA	-	-	-	
		DENA	-	-	-	
jesień		DMNA	-	-	-	
		DENA	-	-	-	
Baranie		zima	DMNA	-	-	-
			DENA	-	-	-
		wiosna	DMNA	1,10	2,36	215,0
			DENA	2,79	3,65	131,0
	lato	DMNA	8,29	6,15	74,20	
		DENA	-	-	-	
	jesień	DMNA	-	-	-	
		DENA	-	-	-	
	Końskie	zima	DMNA	-	-	-
			DENA	0,04	0,06	140,0
		wiosna	DMNA	-	-	-
			DENA	5,59	1,72	30,8
lato		DMNA	0,18	0,39	215,0	
		DENA	0,12	0,27	225,0	
jesień		DMNA	1,84	2,36	128,3	
		DENA	0,58	1,00	172,4	
Kozie		zima	DMNA	-	-	-
			DENA	-	-	-
		wiosna	DMNA	3,36	4,56	135,6
			DENA	0,09	0,19	2,15
	lato	DMNA	2,02	3,61	178,8	
		DENA	1,46	2,49	170,8	
	jesień	DMNA	-	-	-	
		DENA	0,02	0,05	2,50	

Objaśnienia: X_{oc} - wartość średnia; Z - współczynnik zmienności; S - odchylenie standardowe; - oznacza, że nie wykryto nitrozoamin; każdy wynik w tabeli jest średnią z 21 powtórzeń.

Ogólnie można przyjąć, że tylko żywienie pastwiskowe wywierało istotny wpływ na ilościowe i jakościowe występowanie nitrozoamin w badanych próbach mięsa. W niektórych przypadkach oznaczono dość wysokie ilości ww. nitrozoamin.

W mięsie wieprzowym stwierdzana zawartość dimetylonitrozoaminy wahała się w granicach 0,0-4,46 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) i dietylonitrozoaminy w granicach 0,0-8,0 ($\mu\text{g}/\text{kg}$). Z kolei w mięsie wołowym stwierdzane ilości DMNA wahały się w granicach 0,0-3,66 ($\mu\text{g}/\text{kg}$), podczas gdy DENA w granicach 0,0-7,64 ($\mu\text{g}/\text{kg}$), bez względu na porę roku. W mięsie baranin zawartość DMNA wahała się w granicach 0,0-8,29 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) a DENA 0,0-2,79 ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Z nielicznych i wycinkowych badań autorów zagranicznych (6, 7) nad występowaniem nitrozoamin w mięsie surowym (mięso wieprzowe, wołowe i baranie) wynika natomiast, że oznaczano podobne stężenia ww. nitrozoamin (m.in. NDMA=5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i NDEA=5-20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), jak w mięsie pochodzącym od zwierząt z regionu Małopolski. Powyższe stężenia nitrozoamin w mięsie wołowym i wieprzowym stanowić mogą zagrożenia zdrowia ludzkiego (9, 14). Należy jeszcze wspomnieć, że w mięsie cielęcym (za wyjątkiem pory wiosennej) stwierdzano zaledwie śladowe ilości badanych nitrozoamin.

Na tle powyższych wyników odnoszących się do mięsa cielęcego (dotyczy to także i innych rodzajów mięsa) należałoby przeprowadzić badania żywieniowe nad wyjaśnieniem pochodzenia, czy też powstawania nitrozoamin u zwierząt hodowlanych w zależności od składu chemicznego pasz i żywienia zwierząt.

W mięsie kozim stwierdzono występowanie DMNA i DENA w okresie wiosennym i letnim, sporadycznie w okresie jesiennym. Wskazywałyby to na wpływ żywienia pastwiskowego na występowanie nitrozoamin w mięsie.

W mięsie końskim – DENA stwierdzono we wszystkich porach roku, w różnych ilościach, w tym śladowych, natomiast DMNA tylko w okresie letnim i jesiennym w przedziale 0,18-1,84 ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

W dostępnej literaturze krajowej i zagranicznej brak jest danych związanych z występowaniem nitrozoamin w surowym mięsie końskim i kozim. Można więc założyć, że nie prowadzono badań nad występowaniem nitrozoamin w mięsie ww. gatunków zwierząt.

Na tle powyższych danych wynikających z badań własnych, jak i dostępnej literatury światowej – można by przyjąć, że głównie mięso wieprzowe i wołowe może być nośnikiem rakotwórczych nitrozoamin. W mięsie wieprzowym stwierdzono: dimetylonitrozoaminy od 0,08 do 4,46 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mięsa. Mięso wołowe zawierało: dimetylonitrozoaminy od 0,0 do 3,66 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i dietyloaminy od 0,0 do 7,64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mięsa. W mięsie końskim, baranin i kozim stwierdzono występowanie ww. nitrozoamin głównie w okresie żywienia pastwiskowego.

Ze względu na spożywanie przez klientów głównie mięsa wieprzowego i wołowego, nie jest to oczywiście obojętne z punktu widzenia potencjalnego zagrożenia dla zdrowia konsumentów.

Piśmiennictwo

1. Archer M. C., Tannenbaum S. R., Wisnook J. S.: Sci., 174, 1341, 1971.
2. Ayanaba A., Alexander M.: Appl. Microb. 5, 862, 1973.
3. Bharucha K. R., Cross C. K., Rubin L. J.: J. Agric. Food Chem. 27, 63, 1979.
4. Bogardi J., Kuzelka R. D., Ennenga W. G.: Nitrate contamination. Exposure, Consequences and Control. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 1991.
5. Cassens R. G., Woolford G., Lee S. H., Gontefongea R.: Fate of nitrite in meat. II Int. Symp. on Nitrite in Meat Products, 1977, s. 95-100.
6. Crosby N. T.: Residue Rev., 64, 77, 1976.
7. Developments in Animal Veterinary Sciences: Safety and Quality in Food. Proceedings of a DSA Symposia, Brussels, March 1984, Elsevier Science Publishers in Amsterdam, 1984.
8. Fromberger R.: Ernährung-Umschau, 32, 47, 1985.
9. Hill M. J.: Nitrosamines – toxicology and microbiology. Ellis Horwood, Int. Publ. in Science and Technology, New York, Basel, Weinheim, Chichester, Cambridge, 1988.
10. Kluczek J. P.: Nitrozoaminy w aspekcie ochrony środowiska. Byd. Tow. Nauk., Prace Wydz. Nauk Przyrod., Ser. B., 41, 1994.
11. Kofoid A. D., Nemming O., Brunfeldt K., Nebelin R., Thomson J.: Acta Agric. Scandinavica, 31, 40, 1981.
12. Lijinsky W., Epstein S.: Nature, 225, 21, 1970.
13. Low H.: Arch. Environment., Hlth, 29, 5, 1974.
14. Magee P. N.: The relevance of N-nitroso compounds to human cancer exposure and mechanisms. IARC Sci. Publ. No 84, Inter. Agency for Research on Cancer, Lyon, 1987.
15. Massey R. C., Mc Weeny D. J.: J. Sci. Food Agric., 33, 294, 1982.
16. Mirvish S. S.: Topics in chemical carcinogenesis. Univ. of Tokyo Press, 279, 1972.
17. Mirvish S. S.: Toxicol. Applied Pharmacol. 31, 325, 1975.
18. Mirvish S. S.: Cancer, 58, 1842, 1986.
19. Mc Weeny D. J.: Food Add. Contam. 1, 245, 1984.
20. Mirna A., Spiegelalder B., Eisenbrand G.: Fleischwirtschaft 59, 553, 1979.
21. Nikonorow M., Urbanek-Kartowska B.: Toksykologia żywności. PZWL, W-wa 1987.
22. Pancholy S. K.: Soil Biol. Biochemistry, 8, 75, 1976.
23. Scanlan R. A.: CRC Crit. Rev. in Food Technol., 5, 357, 1973.
24. Scanlan R. A., Ryes F. G.: Food Technology 30, 95, 1.
25. Smyk B.: Sem. n.t. Mikrobiologiczne przemiany związków azotowych w różnych warunkach ekologicznych. PAN, IUNG, PTG, Puławy, 1981, s. 93.
26. Smyk B., Barabasz W., Różycka E., Marska B., Stibral J.: Sem. n.t.: Mikrobiologiczne przemiany związków azotowych w różnych warunkach ekologicznych. PAN, IUNG, PTG, Puławy, 1981, s. 107.
27. Smyk B., Barabasz W., Różycki E.: III Int. Symposium on Microbial Ecology, Michigan State Univ., East Lansing, Q-6,70, ICOME, IUMS, IV BS and ASM, Michigan 1983.
28. Smyk B., Barabasz W., Czachor M., Różycki E.: IV Intern. Symposium on Microb. Ecology. C.39-1, ICOME Conference, Ljubljana 1986, s. 86.
29. Smyk B., Barabasz W., Różycki E., Dobrowolski J.: I nt. of Environm. Health, Toxicol. and Oncology, 11, 351, 1992.
30. Smyk B., Różycki E., Barabasz W.: Geodesy and Environment, PAN, 35, 131, 1990.
31. Smyk B., Różycki E., Dobrowolski J.: J. Environm. Pathology, Toxicology and Oncology, 12, 55, 1993.
32. Smyk B., Rywotycki R.: AURA, 5, 12, 1984.
33. Steinka I., Przybyłowski P.: Roczn. PZH, 42, 239, 1992.
34. Stumphius H.: AURA, 10, 11, 1978.
35. Yamada T., Yamato M., Tanimura A.: J. Food Hyg. Soc. Japan, 15, (3), 6, 1974; 17, (2), 3, 1976.
36. Yorby J. R., Alexander M.: Appl. and Environmental Microb., 39, 559, 1980.