Utjecaj temperature pečenja na dvoploč nom žaru na tvorbu heterocikličkih aromatskih amina u svinje

Zahija, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:830631

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

Iva Zahija

643/PI

UTJECAJ TEMPERATURE PEČENJA NA DVOPLOČNOM ŽARU NA TVORBU HETEROCIKLIČKIH AROMATSKIH AMINA U SVINJETINI

Rad je izrađen na Katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete na Univerzi u Ljubljani pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Tomaža Polaka i u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe pod mentorstvom red. prof. dr. sc. Helge Medić te uz pomoć dr. sc. Mateje Lušnic Polak, dr. sc. Nives Marušić Radovčič i tehničke suradnice Mojce Malenšek.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju mesa i ribe
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ TEMPERATURE PEČENJA NA DVOPLOČNOM ŽARU NA TVORBU HETEROCIKLIČKIH AROMATSKIH AMINA U SVINJETINI

Iva Zahija 643/PI

Sažetak: *Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj 9 različitih temperatura pečenja: 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280 °C na dvoploč̌nom žaru na tvorbu heterocikličkih aromatskih amina (HCA) u leđnom mišiću svinjskog mesa (Longissimus dorsi). Uzorci leđnog mišića svinjskog mesa su sadržavali prosječno najviše 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin (PhIP) - 2,91 ng/g. Sadržaj ukupnih HCA raste (p < 0,001) s povišenjem temperature pečenja. Pri temperaturama 120 °C do 240 °C, razlike u sadržaju ukupnih HCA između temperatura nisu statistički značajne. Pri temperaturi od 260 °C tvori se 18,53 ng/g HCA, što je za 57 % više HCA, nego što ih se tvori prosječno pri temperaturi od 240 °C. Veći je udio ukupnih HCA zabilježen pri temperaturi od 280 °C (36,50 ng/g), što predstavlja 330 % povećanje u odnosu na temperaturu od 240 °C. Pri temperaturi od 180 °C, tvori se sumarno najmanje HCA, dok se očekivano pri najvišoj temperaturi tvori najviše HCA.*

Ključne riječi: heterociklički aromatski amini, svinjetina, temperatura pečenja
Rad sadrži: 52 stranice, 11 slika, 10 tablica, 68 literaturnih navoda, 1 prilog
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je tiskan i u elektroničkom (PDF format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.
Mentor: *red. prof. dr. sc Helga Medić*
Pomoć pri izradi: *doc. dr. sc. Tomaž Polak, viši asistent*, *dr. sc. Mateja Lušnic Polak, viši asistent, dr. sc. Nives Marušić Radovčić, viši asistent, Mojca Malenšek, tehnička suradnica*
Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu: 1. Dr. sc. *Nada Vahčić*, red. prof.
2. Dr. sc. *Helga Medić*, red. prof.
3. Dr. sc. *Sandra Balbino*, red. prof.
4. Dr. sc. *Ksenija Marković*, izv. prof. (zamjena)
Datum obrane: 18.7. 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Meat and Fish Technology
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

THE INFLUENCE OF GRILLING TEMPERATURE ON THE TWO-PLATED GRILL ON THE FORMATION OF HETEROCYCLIC AROMATIC AMINES IN PORK

Iva Zahija 643/PI

Abstract: *The aim of this study was to determine the effect of 9 different grilling temperatures: 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280 °C on two-plated grill on the formation of heterocyclic aromatic amines in pork back muscle (Longissimus dorsi). The samples of pork back muscle contained the highest number of PhIP (2.91 ng/g). The content of total HCA increases (p <0.001) with increasing temperature of grilling. For the temperatures between 120 °C and 240 °C, the total difference in amounts of HCA between them are not statistically significant. At a temperature of 260 °C, HCA content is 18.53 ng/g, which is 57% more HCA than at 240° C. The higher values in the content of total HCA is recorded at temperature of 280 °C (36.50 ng/g HCA) and this represents a 330% increase compared to temperatures up to 240 °C. At a temperature of 180 °C, the lowest amount of HCA is formed, while, as expected, the highest temperature constitutes the most HCA.*

Keyword: *heterocyclic aromatic amines, pork, temperature of grilling*

Thesis contains: 52 pages, 11 figures, 10 tables, 68 references, 1 supplement

Original in: Croatian

Thesis in printed and electronic (PDF format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Full Professor. Ph.D. Helga Medić*

Technical support and assistance: *Ph.D. Tomaž Polak, Assistant Professor,Ph.D. Mateja Lušnic Polak, Senior assistant, Ph.D. Nives Marušić Radovčič, Senior assistant, Mojca Malenšek, technical assistant*

Reviewers: 1. *Nada Vahčić*, Ph.D., Full professor

2. *Helga Medić*, Ph.D., Full professor

3. *Sandra Balbino*, Ph.D., Full professor

4. *Ksenija Marković*, Ph.D., Associate professor (substitute)

Thesis defended: 18 July 2016

Sadržaj

stranica

1. UVOD ... 1

2. TEORIJSKI DIO ... 3

2.1. Osnovne karakteristike svinjskog mesa ... 3

2.2. Heterociklički aromatski amini ... 3

2.2.1. Vrste i strukture HCA ... 4

2.3. Tvorba HCA u mesu ... 5

2.4. Čimbenici koji utječu na nastanak HCA u mesu ... 8

2.4.1. Utjecaj karakteristika mesa ... 9

2.4.2. Utjecaj uvjeta toplinske obrade ... 11

2.5. Mutagenost i karcinogenost HCA ... 13

2.6. Kreatin i kreatinin ... 15

3. EKSPERIMENTALNI DIO ... 17

3.1. Materijal ... 17

3.1.1.Uzorci svinjskog leđnog mišića (*longissimus dorsi*) ... 17

3.2. Aparatura i pribor ... 17

3.3. Metode rada ... 18

3.3.1. Određivanje udjela HCA ... 18

3.3.1.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) ... 18

3.3.1.2. Tekućinska kromatografijom s masenim spektrometrom (LC-MS) ... 19

3.3.2. Određivanje teksture ... 21

3.3.3. Određivanje kreatina i kreatinina ... 21

3.3.3.1. Priprema standarda kreatina i kreatinina ... 21

3.3.3.2. Priprema uzoraka svježeg mesa za analizu kreatina i kreatinina ... 23

3.3.3.3. LC-MS analiza ... 23

3.3.4. Statistička analiza ... 24

4. REZULTATI I RASPRAVA ... 26

4.1. Sadržaj pojedinih i ukupnih HCA ... 26

4.2. Sadržaj HCA s obzirom na temperaturu pečenja, nekorigirane vrijednosti ... 28

4.3. Sadržaj HCA s obzirom na temperaturu pečenja, korigirane vrijednosti ... 30

4.4. Sadržaj kreatina i kreatinina ... 35

4.5. Teksturni parametri ... 36

4.6. Iskorištenje prilikom pečenja ... 38

5. ZAKLJUČCI ... 39

6. LITERATURA ... 40

7. PRILOZI ... 46

7.1. Popis korištenih kratica ... 46

1. UVOD

Svinjetina je poznata kao namirnica kvalitetnih nutritivnih svojstava zbog visokog udjela proteina visoke biološke vrijednosti, bogatog sadržaja esencijalnih aminokiselina, vitamina B grupe, minerala, posebno željeza, elemenata u tragovima te ostalih biološki aktivnih spojeva. Valja znati da unos svinjetine također utječe i na unos masti, zasićenih masnih kiselina, kolesterola i ostalih tvari koje u neprimjerenim količinama mogu dovesti do negativnih fizioloških efekata (Toldra i Reig, 2011). Uravnotežena prehrana je prehrana koja sadržava hranjive tvari u količinama koje su potrebne za optimalno djelovanje čovjekova organizma. Takva prehrana ne bi smjela sadržavati štetne spojeve koji se nažalost tvore prilikom toplinske obrade mesa.

Među takve štetne spojeve za ljudski organizam pripadaju i heterociklički aromatski amini (HCA). Danas je izolirano 25 heterocikličkih aromatskih amina. Svi HCA su spojevi s visokim mutagenim i kancerogenim potencijalom. Pored toga imaju sposobnost da prouzroče oštećenja na DNA molekuli koja dovode do nastanka raka (Sugimura, 1997). Pečenje mesa je najčešći način toplinske obrade mesa kojim se može značajno reducirati broj mikroroganizama. Pečenje mesa na žaru je jedan od veoma čestih načina priprave mesa koji se radi u domaćinstvima prilikom kojeg se razvijaju veoma visoke temperature unutar mesa. Poznato je da HCA nastaju u proteinski bogatoj hrani prilikom uobičajenih postupaka toplinske obrade, kao što su prženje i pečenje. Nastaju kao rezultat Streckerovih reakcija razgradnje i Maillardovih reakcija.

HCA možemo podijeliti u dvije skupine: polarni ili IQ tip te nepolarni ili ne-IQ tip. Za tvorbu polarnih HCA je obavezna prisutnost kreatina ili kreatinina dok za tvorbu nepolarnih HCA oni nisu potrebni (Murkovic, 2004). Prekursori HCA su: kreatin/kreatinin, slobodne aminokisline i šećer (Kizil i sur., 2011). Pri nižim temperaturama toplinske obrade HCA u mesu nastaju u manjim količinama (ng/g), dok pri višim temperaturama se njihova tvorba poveća. Nastajanje HCA je ovisno o navedenim čimbenicima: vrsta mesa, način i vrijeme toplinske obrade, temperature i posmeđivanja mesa (Murkovic, 2004).

Agencija za istraživanje raka tvrdi da je razlog za trećinu od svih oboljelih od raka usko povezan s načinom prehrane. Studije su pokazale, da dugoročno uživanje mesa koje sadržava HCA prouzročuje rak kod ljudi i životinja. HCA također induciraju rast tumora: debelog i tankog crijeva, prostate, pluća, kože, jetre, prsne i mliječne žlijezde (IARC, 1993).

Cilj ovog rada bio je odrediti temperaturu pečenja pri kojoj nastaje najviše HCA prilikom pečenja na žaru, te odrediti sadržaj prekursora (kreatin i kreatinina) HCA.

Postavljene su 3 radne hipoteze:

1) Povećanje temperature utjeće na povećanje nastanka HCA.
2) Porast sadržaja HCA s povećanjem temperature neće biti potpuno lineran.
3) Pri nižim temperaturama tvori se više 2-amino-3,8dimetilimidazo [4,5-f] kinoksalin (MeIQx) u odnosu na PhIP, dok se s povišenjem temperature taj odnos mijenja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE SVINJSKOG MESA

U svjetskoj industrijskoj proizvodnji, proizvodnja mesa zauzima važan segment. U 2013. godini, 37% proizvodnje mesa se odnosilo na proizvodnju svinjetine, a 34 % na proizvodnju peradi. Svinjetina je veoma važan izvor vitamina B skupine i minerala koji imaju visoku biološku dostupnost. Općenito, svinjsko meso sadrži nešto manje proteina i vode, a više masti, pa upravo zbog toga ima veću kalorijsku vrijednost od goveđeg mesa. Svinjsko meso u svojim proteinima sadrži više nekih esencijalnih aminokiselina nego goveđe i ovčje meso, kao i nekih vitamina iz B skupine.

Svinjsko meso u 100 g sadrži: 62 g vode, 17,43 g bjelančevina i 18,87 g masti. Energetska vrijednost iznosi 245 kcal / 1024 kJ na 100 g. Izvrstan je izvor fosfora, kojeg sadrži prosječno 199 mg i cinka, kojeg sadrži prosječno 1,93 mg. Kao i sve vrste mesa, svinjetina je bogata vitaminima B kompleksa. Izvrstan je izvor tiamina, kojeg sadrži u prosjeku 0,74 mg (67% preporučenog dnevnog unosa), niacina sadrži prosječno 4,6 mg (29% preporučenog dnevnog unosa), prosječan sadržaj vitamina B6 je 0,4 mg (24% preporučenog dnevnog unosa), vitamina B12 sadrži prosječno 0,7 μg (28% preporučenog dnevnog unosa). Ovo meso je i dobar izvor riboflavina, kojeg sadrži prosječno 0,2 mg (18% preporučenog dnevnog unosa) i pantotenske kiseline u prosječnoj količini od 0,7 mg (14% preporučenog dnevnog unosa). (Kulier, 1994).

2.2. HETEROCIKLIČKI AROMATSKI AMINI

Prva istraživanja povezana s tvorbom heterocikličkih aromatskih amina (HCA) i njihovog karcinogenog učinka počinju u prvoj polovici 20. stoljeća. Godine 1939. švedski znanstvenik Widmark iz zapečenoga konjskoga mesa je izolirao karcinogene tvari koje su inducirale razvoj tumora na koži miša. Sljedeći ključni događaj pri istraživanju HCA je postavio Sugimura sa suradnicima, koji su godine 1976. s pomoću Ames-testa odredili mutagenu aktivnost zapečene površinske kore govedine i ribe pečenih nad vatrom (Wakabayashi i sur., 1993; Sugimura, 1997; Skog i sur., 1998).

HCA su spojevi s visokim mutagenim i karcinogenim potencijalom koji nastaju pri pečenju i prženju različitih vrsta mesa i ribe (Murkovic, 2004; Alaejos i Afonso, 2011).

Neke epidemiološke studije su pokazale povezanost između čestog uživanja mesa i povećanih rizika za razvoj raka (Persson i sur., 2003). Dokazano je, da su HCA i njihovi metaboliti prisutni u tjelesnim tekućinama i tkivima čovjeka. HCA-DNA aduktori su dokazani u tkivima čovjeka (Vitaglione i Fogliano, 2004), što pokazuje da se HCA lako veže na DNA čak pri jako malim količinama (*ppb*), koje su obično prisutne u mesu toplinsko obrađenom do uobičajenih središnjih temperatura (Turesky, 2007).

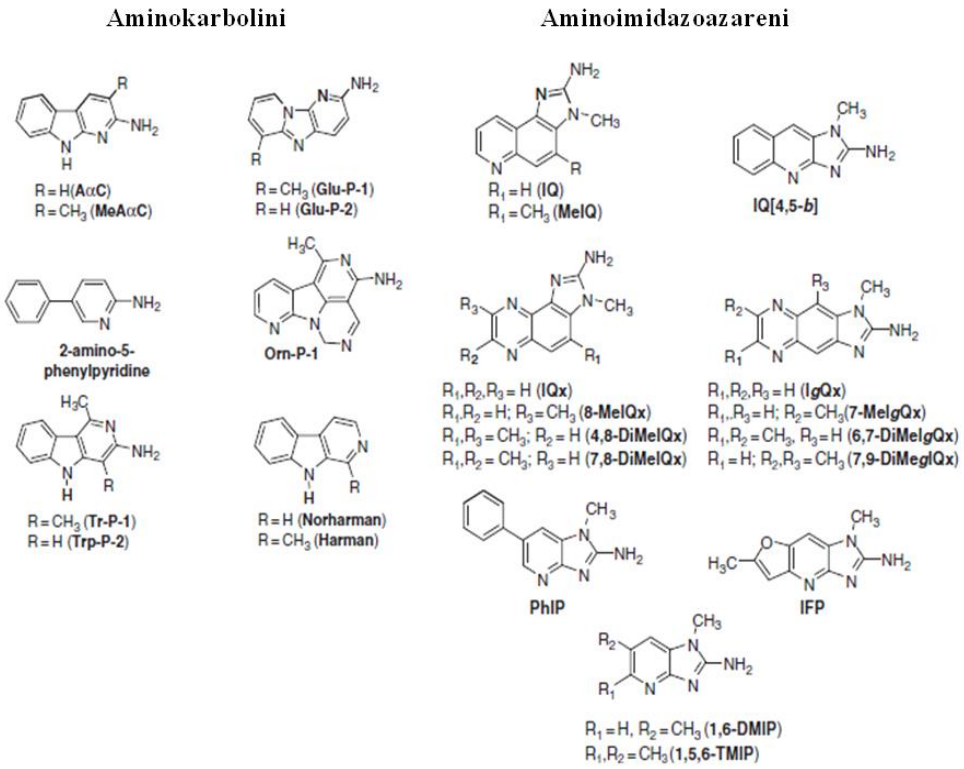
Ako mutagenost HCA uspoređujemo s ostalim mutagenim spojevima koji su nađeni u hrani, zanimljivo je da je njihova mutagenost 100 puta veća od aflatoksina B1 i više od 2000 puta veća od benzo-a-pirena (BaP) (Oz i Kaya, 2011).

2.2.1. Vrste i strukture HCA

HCA dijelimo s obzirom na polarnost u dvije skupine: polarni i nepolarni kao što je prikazano na slici 1.

Polarni HCA (aminoimidazoazareni (AIA) ili IQ tip) imaju imidazokinolinsku, imidazokinoksalinsku ili imidazopiridinsku strukturu. Za tvorbu polarnih, »termičkih« HCA (IQ-tip) nisu potrebne tako visoke temperature, iako se pri povišenim temperaturama tvore brže i u većim količinama.

Nepolarni HCA (aminokarbolini ili ne-IQ tip) imaju piridoindolnu ili dipiridoimidazolnu strukturu (Pais i Knize, 2000; Murkovic, 2004; Turesky, 2007). Njihova sinteza nije ovisna o prisustvu prekursora kreatina i kreatinina, zato ih nalazimo u hrani biljnoga izvora (Wakabayashi i sur., 1992; Sugimura, 1997; Alaejos i Afonso, 2011).



Slika 1. Strukturne formule glavnih aminokarbolina i aminoimidazoazarena (Turesky, 2010; Alaejos i Afonso, 2011)

U toplinski obrađenom mesu, ribama i njihovim proizvodima je do danas izolirano i identificirano 25 različith mutagenih i/ili karcinogenih HCA (Alaejos i sur., 2008). Većina do sada izoliranih i identificiranih HCA je prikazana na slici 1. HCA nisu utvrđeni u sirovom mesu, a u pečenoj govedini, svinjetini, ribama i peradi u najvećem se opsegu tvore MeIQx i PhIP u odnosu na ostale HCA. Njihov sadržaj varira u rasponu od 0,1 do 100 ng/g toplinski obrađenoga mesa (Knize i sur., 1994; Skog i sur., 1998; Nagao, 1999).

2.3. TVORBA HCA U MESU

HCA koji nastaju u mesu, možemo podijeliti u dvije skupine s aspekta temperature pri kojoj nastaju.

Za tvorbu polarnih, t.j. »termičkih« HCA (IQ-tip ili AIA) nisu potrebne tako visoke temperature, iako se pri povišenim temperaturama tvore brže i u većim količinama. Polarni HCA nastaju u sustavu kompleksnih reakcija između aminokiselina (AK), ugljikohidrata i kreatina (kreatinina), koji je je nužno potreban za tvorbu polarnih HCA (Skog i sur., 1998; Murkovic, 2004).

AIA se tvore već pri temperaturama klasičnih postupaka toplinske obrade mesa, tj. pri temperaturama 150–250 °C (Sugimura i Adamson, 2000; Murkovic, 2004).

Glavni put pri tvorbi AIA predstavljaju Maillardove reakcije s uključenom Streckerovom razgradnjom. Kao produkti serije kompleksnih reakcija između slobodnih AK i reducirajućih šećera nastaju metilirani piridini i pirazini tj. Streckerovi aldehidi, koji su prekursori pri tvorbi AIA (slika 2) (Johansson i sur., 1995; Skog i sur., 1998; Murkovic, 2004; Knize i Felton, 2005).

Svi AIA sadrže amino-imidazolni dio molekule, koji nastaje iz kreatina. Toplinskom obradom pri temperaturama iznad 100 °C teče spontana reakcija, pri kojoj dolazi do ciklizacije i odcijepljenja vode iz kreatina (slika 4). Pri tom nastane kreatinin, koji kod molekula AIA predstavlja amino-imidazolni dio, koji je odgovoran za mutagenost. Na primjer, da molekula AIA ne sadrži taj dio, posebno, ako ne sadrži amino skupine, njena mutagenost bi postala zanemariva (Skog i sur., 1998; Sugimura i Adamson, 2000; Kizil i sur., 2011).

Postoje dvije hipoteze za tvorbu AIA: (1) piridin ili pirazin najprije reagira s aldehidom, a zatim s kreatininom, (2) kreatinin najprije reagira s aldehidom (aldolna kondenzacija), pri čemu nastane intermedijer kreatinin-aldehid, koji se potom poveže s piridinom ili pirazinom te se tvori imidazo-kino(ksa)lin spoj (Skog i sur., 1999; Murkovic, 2004).

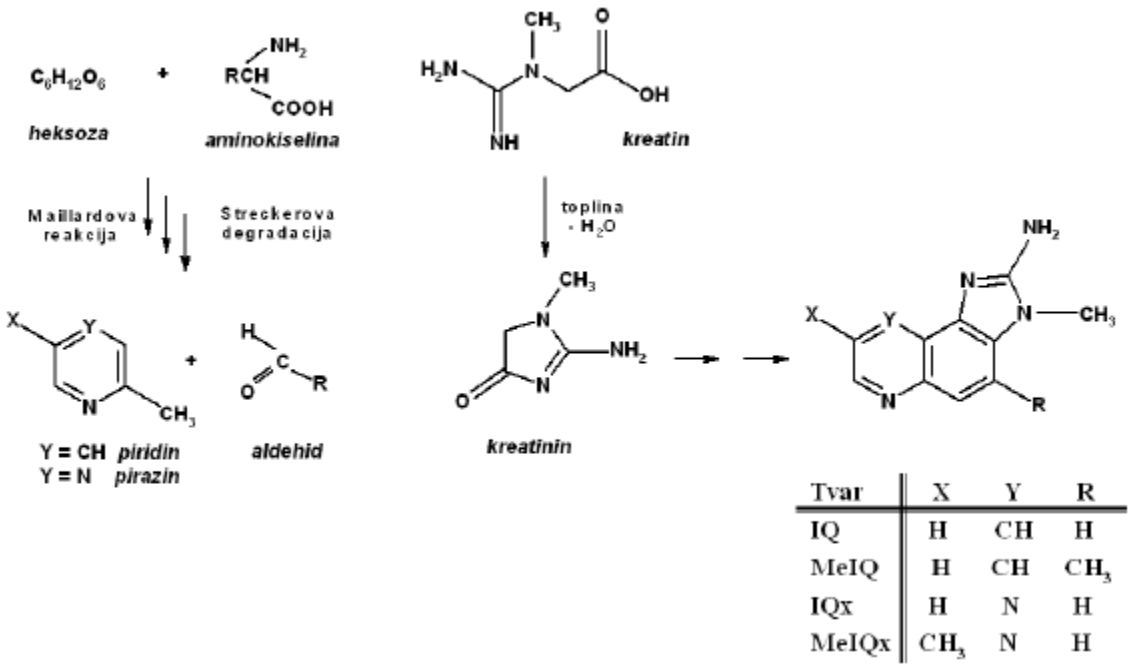
Nepolarni HCA (ne-IQ tip), zovemo ih još i »pirolitički« HCA, su derivati karbolina i nastaju pirolizom aminokiselina i proteina pri jako visokim temperaturama (>300 °C). Najveća mogućnost njihovog nastanka je iz produkata Maillardove reakcije (piridini i pirazini) te iz kreatinina. HCA ne nastaju iz nemišićnih dijelova namirnica ili bezkralježnjaka, uključivši izvore bogate proteinima (rakovi, sir, tofu, grah).

Aminokarbolini se tvore pri visokim temperaturama – oko 300 °C pirolizom AK i proteina. U procesu pirolize se kroz seriju reakcija slobodnih radikala tvore brojni reaktivni fragmenti, koji se kondenziraju i tvore nove heterociklične strukture – aminokarboline. Njihova sinteza nije ovisna o prisustvu prekursora kreatina i kreatinina (Wakabayashi i sur., 1992; Sugimura, 1997; Alaejos i Afonso, 2011).

Nepolarni HCA se tvore pri zagrijavanju samo jedne AK (Murkovic, 2004) ili pirolizom više aminokiselina i proteina pri visokim temperaturama (Sugimura i Adamson, 2000; Alaejos i Afonso, 2011). Aminokarbolini se pri uobičajenom pečenju mesa pojavljaju u jako malim koncentracijama (Cheng i sur., 2006).

Harman (9-metil-9-(4'-amino-fenil)-9-H-pirido [3,4-b] indol) i Norharman (9-(4'-amino-fenil)-9-H-pirido [3,4-b] indol) se od ostalih HCA strukturno razlikuju po tome, da

nemaju na prstenu vezane amino skupine i ne pokazuju mutageni potencijal, ali njihova pristnost povećava genotoksičnost mutagenih HCA (Alaejos i Afonso, 2011).



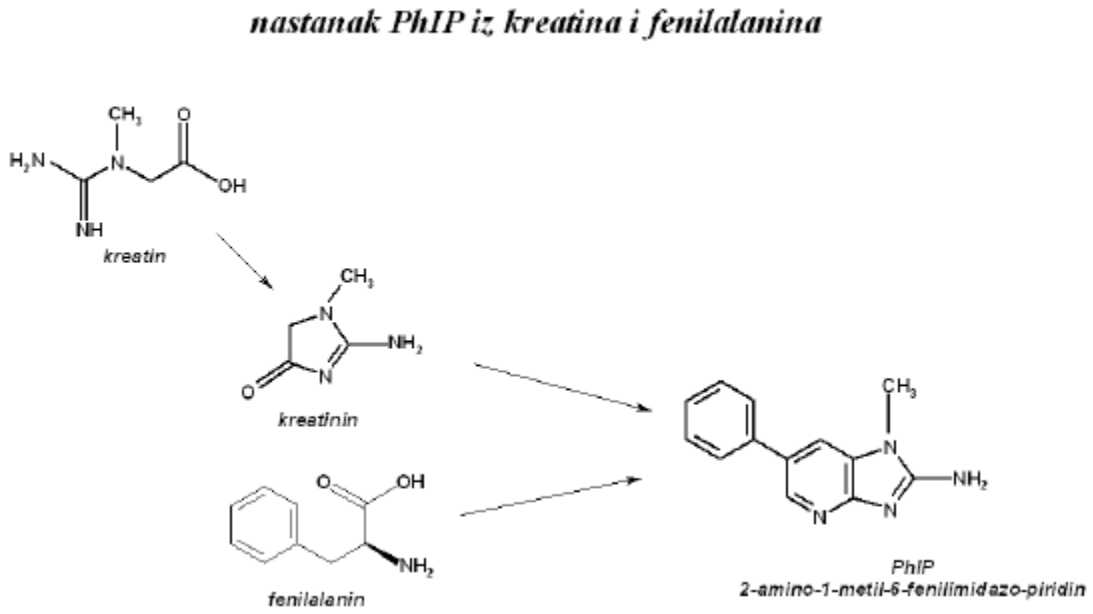
Tvar	X	Y	R
IQ	H	CH	H
MeIQ	H	CH	CH_3
IQx	H	N	H
MeIQx	CH_3	N	H

Slika 2. Prikaz tvorbe HCA iz prekursora (Turesky, 2008)

Prekursori HCA u mesu i ribi su kreatin(in), heksoze, slobodne amino kiseline i neki dipeptidi, svi uobičajeni spojevi mišićnog tkiva. Prikaz nastanka HCA iz prekursora prikazan je na slici 2. Zagrijavanjem smjese kreatinina, glukoze, karnozina i mješavine amino kiselina, u sličnim omjerima nađenim u goveđem mesu, nađeni su polarni HCA: 2-amino-3metilimidazo[4,5-f]kinoksalin (IQx), 8-MeIQx, 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo [4,5-f] kinoksalin (4,8-DiMeIQx), 7,8-DiMeIQx i PhIP te apolarni harman i norharman (Arvidsson i sur., 1997). Prikaz nastanka PhIP prikazan je na slici 3. 8-MeIQx se tvori iz 17 različitih amino kiselina u modelnom sustavu, tako da je veoma težak zadatak formirati put njegovog nastanka (Johansson i sur., 1995). Formiranje HCA i degradacija istih događa se istovremeno (Ahn i Grun, 2005).

Metoda pripreme uzorka igra važnu ulogu u formiranju HCA; prženje i roštiljanje posebno pojačavaju njihovu tvorbu (Keating i Bogen, 2004). Najutjecajniji faktori, kod svake preparativne metode su temperatura zagrijavanja i vrijeme (Ahn i Gruen, 2005; Arvidsson i

sur.,1999; Skog i sur., 1998). Za tvorbu HCA očekuje se da prati jednadžbu prvog reda reakcije s konstantom brzine po Arrhenius-ovoj jednadžbi (Arvidsson i sur., 1999).



Slika 3. Nastanak PhIP iz kreatina i fenilalanina (Turesky, 2008)

2.4. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA NASTANAK HCA U MESU

Za proučavanje utjecaja čimbenika na tvorbu HCA se uobičajeno upotrebljavaju kemijski modelni sustavi koji sadržavaju osnovne prekursore (AK, šećer i kreatin), koji imaju ključnu ulogu pri tvorbi HCA. Na taj način isključuje se utjecaj drugih spojeva i kompleksnih reakcija, koje su prisutne u mesu. Posljedično, uporaba modelnih sustava omogućava izradu studije utjecaja prekursora te fizikalnih i kemijskih parametara na tvorbu HCA s namjenom razvijanja metode i dodataka za smanjenje tvorbe mutagenih i karcinogenih HCA u hrani (Pais i sur., 1999; Messner i Murkovic, 2004; Murkovic, 2004; Knize i Felton, 2005). Neki HCA koji su prvotno identificirani u modelnim sustavima su bili kasnije nađeni i u mesu (Murkovic, 2004).

2.4.1. Utjecaj karakteristika mesa

Vrsta mesa, tip mišića i kvaliteta mesa su karakteristike mesa koje sigurno utječu na endogenu koncentraciju prekursora i posljedično na tvorbu HCA u toplinski obrađenom mesu.

Pri jednakom stupnju toplinske obrade postoje razlike u tvorbi pojedinih HCA gledano na vrstu mesa kao što je prikazano u tablici 1. Različite vrste mesa imaju različite količine prekursora koji su potrebni za nastanak HCA. Toplinski obrađena govedina sadrži obično do 20 ng/g HCA, među kojima prevladavaju PhIP i MeIQx. U govedini se pojavljuju još dva, 4,8-DiMeIQx i IQ, ali u puno manjim koncentracijama. Vrlo slično je kod svinjskog mesa, gdje se pod sličnim uvjetima pojavljuju slične koncentracije istih HCA. U peradi se obično tvori više HCA, posebno PhIP, čije koncentracije mogu dosezati i do 100 ng/g. Ostali, MeIQx, 4,8-DiMeIQx i IQ, su u sličnim koncentracijama kao kod govedine i svinjetine. Veća količina slobodnih AK kod toplinski obrađenog mesa je vjerojatno razlog za povećani sadržaj PhIP. Perad sadržava više slobodnog fenilalanina, tirozina i izoleucina, koji su prekursori PhIP. Sadržaj PhIP je kod svih vrsta toplinski obrađenoga mesa najveći (0-500 ng/g, u prosjeku nekih 10 ng/g), slijedi MeIQx u nižim koncentracijama. Ostali HCA, kao npr. IQ, IQx, 4,8-DiMeIQx i MeIQ su često ispod granica detekcije i u mesu se pojavljuju u manjim koncentracijama (do 10 ng/g) (Jägerstad i sur., 1998).

Literaturni podaci o sadržaju HCA u ostalim vrstama mesa su jako različiti, razloga za to ima više. Istraživači često: (1) manjkavo opišu postupke toplinske obrade, (2) upotrebljavaju metode određivanja HCA, koje među sobom nisu usporedive i (3) namjerno toplinski obrade meso pri višim temperaturama i dužem vremenu tako da nastane veća količina HCA. Velika varijabilnost podatka o sadržaju HCA ovisi o metodi toplinske obrade, stupnju pečenja, kvaliteti, sastavu i geometriji mesa. Posljedično, sadržaj HCA može se razlikovati i do 100 puta.

Na tvorbu HCA u mesu utječu i zrenje i kvaliteta mišića. U procesu zrenja mesa dolazi do cjepanja proteina na kraće peptide i slobodne AK. Polak i suradnici (2008) su pokazali, da se s dužim vremenom zrenja povećava količina HCA (MeIQx i PhIP) u toplinski obrađenoj govedini. To je posljedica povećanja udjela kreatinina, slobodnih AK i glukoze u govedini tijekom zrenja. Glavni uzrok za veću tvorbu HCA u toplinski obrađenim dozrelim uzorcima govedine bio bi u posebno većem sadržaju slobodnih AK. Slično su Polak i surardnici (2009) utvrdili na primjeru svinjetine, gdje su proučavali utjecaj kvalitete mišića. Ustanovili su pozitivnu korelaciju između povećane tvorbe HCA i BMV (blijedo, meko, vodeno) svinjetine. BMV mišić u usporedbi s normalnom kvalitetom ima manju vrijednost pH, što pospješuje

denaturaciju proteina i posljedično tvorbu veće količine HCA. Pokazali su, da je sadržaj MeIQx u pečenoj svinjetini BMV kvalitete za 22 % u odnosu na svinjetinu normalne kvalitete.

Tablica 1. Sadržaj pojedinih HCA (ng/g) u toplinski obrađenom mesu i ribama (Pais i Knize, 2000)

Vrsta HCA	**govedina**	**svinjetina**	**perad**	**ribe**
IQ	n.d.-21	n.d.-10,5	n.d.-5	n.d.-4,9
MeIQx	n.d.-16,4 (max 80)	n.d.-3,5 (max 45)	n.d.-3,2 (max 270)	n.d.-8,3
4,8-DiMeIQx	n.d.-15	n.d.-12	n.d.-4	n.d.-7
PhIP	n.d.-18,4 (max 182)	n.d.-7,4 (max 106)	n.d.-37,5 (max 480)	n.d.-3 (max 69)
DMIP	n.d.-7,2	n.d.-37	n.d.-5,9	–
IFP	n.d.-7,6	n.d.-2,5	0,9-7	–
AαC	n.d.-21	n.d.-tragovi	n.d.-2 (max>100)	n.d.-2,3 (max 109)
Trp-P-1	n.d.-0,5	n.d.-5,3	n.d.-1,6	n.d.-13,3
Trp-P-2	n.d.-1,7	n.d.-7,4	n.d.-0,14	n.d.-13,1
harman	0,31-28,6	n.d.-2,5 (max 200)	-	2-130
norharman	0,96-30	n.d.-10,6	-	2-184

*n.d. – ispod granice detekcije

Sadržaj vode u mesu jako utječe na tvorbu HCA, jer omogućava transport u vodi topljivih prekursora HCA iz unutrašnjosti na površinu mesa gdje se prilikom toplinske obrade tvore HCA. Prilikom pečenja i prženja povećana je tvorba PhIP, a prilikom kuhanja IQ i IQx tipa HCA. Messner i Murkovic (2004) su s pomoću modelnog sustava kod pečenja dokazali povećanu tvorbu PhIP koja je posljedica velikog gubitka vode koja pogoduje tvorbi PhIP. S dodatkom tvari, koje poboljšavaju sposobnost vezanja vode (sol, sojini proteini, škrob), učinkovito se smanjuje tvorba HCA u mesu jer je time ograničen transport prekursora iz unutrašnjosti na površinu mesa gdje se HCA tvore (Knize i Felton, 2005). Dodatak tih tvari je posebno važan kod proizvoda od mljevenoga mesa gdje je zbog narušene strukture gubitak vode dodatno povećan (Skog i sur., 1998). Persson i suradnici (2003) su pokazali, da dodatak NaCl i Na-polifosfata poboljšava vezanje vode i smanjuje sadržaj ukupnih HCA u pečenim goveđim pljeskavicama za 38 % u usporedbi s kontrolom. Sličan učinak je bio također u primjeru dodatka škroba ili vlakana. Ako se smanji gubitak vode, poboljšaju se teksturne karakteristike, kao što su sočnost i mekoća, te aroma i okus mesnih proizvoda.

U mesu se nalaze masti, koje utječu na količinu HCA u mesu nakon toplinske obrade. Utjecaj masti na tvorbu HCA nije još do kraja razjašnjen, jer u nekim primjerima mast pospješuje tvorbu HCA, a u nekim inhibira njihov nastanak. Inhibitorni učinak masti lako se objašnjava činjenicom da se s većim udjelom masti u mesu, smanjuje udio ostalih komponenti, koje djeluju kao prekursori HCA (Hwang i Ngadi, 2002) a to je posljedica svojstva, da je mast učinkovitiji medij za prijenos topline što utječe na kraće vrijeme toplinske obrade i posljedično smanjenu tvorbu HCA (Alaejos i Afonso, 2011). S druge strane, masti pospješuju tvorbu HCA jer prilikom toplinske obrade djelomično hidroliziraju i tvore slobodne radikale, koji utječu na tijek Maillardovih reakcija i djeluju kao nekakvi katalizatori nastanka HCA. Moguće je, da velik sadržaj masti u mesu inhibira toplinsku razgradnju nastalih HCA (Skog i sur., 1998; Hwang i Ngadi, 2002).

2.4.2. Utjecaj uvjeta toplinske obrade

Temperatura, vrijeme i način toplinske obrade su glavni čimbenici, koji utječu na tvorbu HCA u mesu (Johansson i sur., 1995; Skog i sur., 1998; Solyakov i Skog, 2002; Bordas i sur., 2004; Messner i Murkovic, 2004; Knie i Felton, 2005; Turesky, 2007; Polak i sur., 2009).

Arvidsson i suradnici (1997) su pomoću modelnog sustava pokazali kako je tvorba HCA funkcijski ovisna o temperaturi i vremenu toplinske obrade. Pri temperaturi od 200 °C količina HCA jako brzo raste, a u vremenu od 5-10 min toplinske obrada doseže maksimum. S povišenjem temperature u jednakom vremenu toplinske obrade se tvori više HCA i u određenom vremenu doseže svoj maksimum. U primjeru produžavanja vremena toplinske obrade pri temperaturi 225 °C je došlo do smanjenja sadržaja HCA. To je posljedica razgradnje nekih HCA, koji su potvrdili još drugi pokusi na modelnim sustavima (Bordas i sur., 2004). Toplinski najmanje stabilan je PhIP, pri 225 °C se počne raspadati. Slijede 7,8-DiMeQIx, 4,8-DiMeQIx i IQx, koji je najstabilniji (Arvidsson i sur., 1997; Messner i Murkovic, 2004). Polak i suradnici (2009) su suprotno ustanovili, da je najviše termolabilan MeIQx, čiji sadržaj se pri temperaturi u središtu mesa od 80 °C smanji za 60 %.

Produženo vrijeme pečenja povećava sadržaj MeIQx, koji naraste s 2 ng/g -15 min na 35 ng/g - 35 min pečenja. Slično se događa s ostalim HCA, međutim njihovo povećanje nije tako veliko (Murkovic i sur., 1998). Do sličnih rezultata su došli također i Knize i suradnici (1994) te Skog i suradnici (1998).

Tijekom prženja i pečenja na žaru se tvori puno veća količina HCA nego pri pečenju u pećnici (Knize i sur., 1994). Tijekom prženja i pečenja na pločnom žaru, meso i prekursori HCA su u neposrednem kontaktu s grijajućom pločom. Pri takvim uvjetima se sadržaj vode na površini mesa smanjuje, dok se povećava koncentracija kreatina, glukoze i slobodnih AK. Posljedica toga je, da se većina HCA nalazi na površini toplinski obrađene hrane bogate proteinima (Jägerstad i sur., 1998). Veći je gubitak mase kod toplinske obrade, veća je mutagena aktivnost uzorka, jer se poveća prijenos u vodi topljivih prekursora na površinu mesa, gdje se tvore HCA. Ako se prilikom toplinske obrade mesa relativna vlažnost poveća (dodatkom pare), izgubi se masa i smanji mutagena aktivnost (Skog i sur., 2003).

Pri pečenju u pećnici nastaje manje HCA u odnosu na masu proizvoda, jer je površina na volumen relativno manja u odnosu na pečenje na žaru (Skog i sur., 1997).

Utjecaj metode toplinske obrade na tvorbu HCA je bio dokazan s brojnim pokusima na različitim vrstama mesa. Shin (2005) je pokazao, da se pri različitim načinima toplinske obrade pljeskavica iz svinjskoga mesa, najviše HCA tvori pri pečenju na žaru (17,2 ng/g), puno manje pri pečenju u pećnici (5 ng/g) i kuhanju (1 ng/g). Do sličnih rezultata su došli i Liao i suradnici (2010), koji su ustanovili, da se najviše HCA pri jednakim temperaturama toplinske obrade (180 °C) pilećih prsa tvori pri pečenju na drvenom ugljenu (>112 ng/g), manje pri pečenju na žaru (27,4 ng/g) i najmanje pri pečenju u pećnici (4 ng/g). Slično su ustanovili također Gašperlin i suradnici (2009), koji su pored utjecja načina toplinske obrade, dokazali i zaštitni učinak pečenja mesa s kožom pri tvorbi HCA, jer su pileća prsa s kožom pri jednakoj metodi toplinske obrade sadržavala manje HCA.

Oz i suradnici (2010) su pored utjecaja metode toplinske obrade proučavali i utjecaj različitog stupnja pečenosti pilećih prsa i pastrvi. U primjeru pilećih prsa su najviši sadržaj HCA dobili pri pečenju u tavi i na žaru i to na najvišoj razini pečenosti. U primjeru pastrvi se najviše HCA tvorilo pri pečenju u tavi, pečenju u pećnici na žaru, također pri najvećem stupnju pečenosti.

Mikrovalovi su se pokazali kao dobar način za prethodnu toplinsku obradu prije drugih postupaka pečenja, jer pridonose smanjenju tvorbe MeIQx i PhIP, zbog gubitka prekursora HCA, vode i masti (Felton i sur., 1994). U studiji, koju su napravili Jinap i suradnici (2013), su s prethodno obrađenog pilećeg mesa s mikrovalovima uspjeli smanjiti koncentraciju nastalih HCA. Uporaba mikrovalova 30 sekundi i potom prženje u palminom ulju su se pokazali kao učinkovit način priprave pilećega mesa, pri tome se tvorila puno manja količina MeIQx (3,44 ng/g).

Sličan rezultat su dobili Knize i Felton (2005), koji su pokazali, da kombinacija uporabe mikrovalova i potom pečenja goveđih pljeskavica pri 250 °C smanjuje količina svih HCA devet puta u usporedbi s kontrolom.

2.5. MUTAGENOST I KARCINOGENOST HCA

HCA su promutageni ili prokarcinogeni, koji u aktivnom obliku lako tvore veze s DNA. HCA pripadaju u skupinu indirektnih mutagena, kojima je za postizanje mutagenih svojstava potrebna metabolička aktivacija (Yamazoe i sur., 1988, Turesky i sur., 1991), koja se odvija u 2 faze. U prvoj fazi se odvija N-hidroksilacija inducirana pomoću enzima iz skupine citokrom P450. Pri tome nastaju N-hidroksi HCA metaboliti, koji lako direktno reagiraju s DNA i tvore HCA-DNA adukte. Potom slijedi druga faza metaboličke aktivacije, gdje se odvija esterifikacija N-hidroksilamina do reaktivnih N-hidroksi estera, koji su N-acetoksi, N-sulfoniloksi, N-proliloksi i N-fosfatil esteri. Ti reaktivni metaboliti nastaju najviše u jetri i potom se prenose preko krvnoga sustava do drugih tkiva, gdje se preko kovaletnih veza vežu na DNA, RNA i proteine (Schut i Snyderwine, 1999; Le Marchand i sur., 2002; Turesky i Vouros, 2004; Turesky, 2007). Takve veze su nađene u skoro svim tkivima testiranih glodavaca (miševi, štakori) i nečovjekovih primata (majmuni) (Skog, 2004).

Bioaktivacijom HCA postanu jako mutageni spojevi, što su dokazali s brojnim *in vitro* i *in vivo* pokusima (Toribio i sur., 2000). Mutagenost HCA je ovisna o kemijskoj strukturi i njihovoj mogućnosti tvorbe hipotetičnoga reaktivnoga nitrenium (R2N+) iona (Turesky, 2007).

Za procjenu mutagene aktivnosti spojeva se upotrebljava Amesov test, koji je tako također pogodan za određivanje mutagene aktivnosti različito toplinski obrađene hrane. MeIQx se koristi kao pozitivna kontrola (Skog i sur., 2003). U Amesovom testu se kao testni mikroorganizmi najviše koriste dva soja bakterije *Salmonella typhimurium*, TA98 i TA100. Soj TA98 je osjetljiviji na određivanje mutacija tipa strukturnih promjena, dok je soj TA100 pogodniji za određivanje mutacija zamjene baznih parova. Soj TA100 se ne koristi za testiranje HCA. U Amesovom testu sa *Salmonellom* TA98 svi AIA, razni PhIP, pokazuju visoku mutagenost (Wakabayashi i Sugimura, 1998).

Mnogi AIA pokazuju linearnu korelaciju između DNA povezanosti i mutagenosti. Stupanj mutagenosti se određuje s obzirom na broj HCA-DNA veza. Ako nastane više veza između HCA i bakterijske DNA, veća je mutagenost HCA (Schut i Snyderwine, 1999). Na broj mutacija, koje nastanu zbog djelovanja HCA, utječu različiti egzogeni i endogeni metabolički aktivacijski sustavi, različite sposobnosti popravljanja DNA, različite ciljne sekvence baznih

parova i utjecaj susjednih baza HCA-DNA adukta. Zbog raznolikosti tih čimbenika dolazi do razlika između bioloških utjecaja HCA u različitim in vitro testnim sustavima (Turesky, 2007).

Često se dogodi da HCA, koji pokažu mutagenost u bakterijskim stanicama, pokažu mutagenost također i u životinjskim i ljudskim stanicama, ili se promijeni njihov stupanj mutagenosti. Utjecaj pojedinih HCA na mutacije kod čovjeka i testnih životinja je različit. Također utjecaj životinja ili čovjeka nije zanemariv. Na razvoj raka kod ljudi utječe i genetska predispozicija pojedinca (Nagao, 2000; Alaejos i sur., 2008).

Brojni HCA, koji su testirani *in vivo* s dodatkom u prehranu miša i štakora, pokazuju kancerogena svojstva (Sugimura, 1997; Toribio i sur., 2000; Sugimura i sur., 2004). Ako su izloženi na duži vremenski period, oni induciraju nastanak tumora na više mjesta u različitim organima: u usnoj šupljni, jetri, želucu, plućima, mjehuru, debelom crijevu, prostati i mliječnim žlijezdama. IQ je moćan jetreni karcinogen kod čovjeku sličnih majmuna. Do nastanka tumora obično dolazi nakon nekoliko godina izloženosti (Turesky, 2007). Ferk i suradnici (2010) su *in vitro* pokusom na štakorima pokazali, da određene prirodne tvari, kao ksantohumol, koji je kao flavonoid prisutan u hmelju, učinkovito štite DNA od oštećenja, koje prouzroče mutageni (IQ). Sličan zaštitni učinak ksantohumola su pokazali također Viegas i suradnici (2012) na modelima stanica humanoga hepatoma HepG2, koje su bile izložene MeIQx i PhIP. S Amesovom testom su na bakterijama *Salmonella typhimurium* TA98 su istovremeno potvrdili, da ksantohumol nije mutagen.

Mednarodna agencija za istraživanje raka (IARC, International Agency for Research on Cancer) označila je MeIQ, MeIQx, PhIP, AαC, MeAαC, Trp-P-1, Trp-P-2 i Glu-P-2 kao potencijalno karcinogene, IQ je vjerojatno karcinogen za ljude (Liao i sur., 2010).

Količine HCA, koje induciraju razvoj raka kod pokusnih životinja, mogu biti dovoljne za ravoj raka kod ljudi, ali ne nužno. Za razvoj raka su potrebne mnoge genetske promjene, obično više od deset (Sugimura, 1997).

Adukti HCA i DNA su potvrđeni u brojnim različitim ljudskim tkivima (debelo cijevo, prsa, bubreg), što dokazuje, da oni nastaju i u nejetrenim tkivima, koji prouzroče oštećenja daljnjeg materijala (Turesky, 2007).

Količina dnevno unesenih HCA je ovisna o: sadržaju HCA u konzumiranoj hrani, količini porcije i učestalosti uživanja te hrane. Rezultat dnevno unesenih HCA je za pojedine osobe jako različit i kreće se od 0 do 15 μg/osobi/dan (Skog, 2002).

Znanstvenici bilježe, da osobito česta konzumacija većih količina toplinski obrađenih mesnih jela, koja sadrže HCA i veće količine masti, predstavlja rizik za razvoj raka kod ljudi.

Neke epidemiološke studije kažu, da postoji poveznica između količine dnevno unesenih HCA i rizika za nastanak raka na debelom crijevu, želucu, prostati, mjehuru, bubrezima, plućima, prsima, dok druge studije ne potvrđuju ovu povezanost. Posebno zbog kompleksnosti utjecaja različitih čimbenika na tom području vlada znatna konfuzija (Sugimura, 1997; Wakabayashi i Sugimura, 1998; Warzecha i sur., 2004; Salmon i sur., 2006). Za kompleksnu procjenu utjecaja HCA na karcinogenezi kod čovjeka su potrebna još brojna istraživanja: o tvorbi i sadržaju HCA u hrani, o unosu HCA u tijelo i njihovoj bioraspoloživosti u tijelu, o biotransformacijima HCA u organizmu i o učincima HCA u biološkim sustavima (Toribio i sur., 2000).

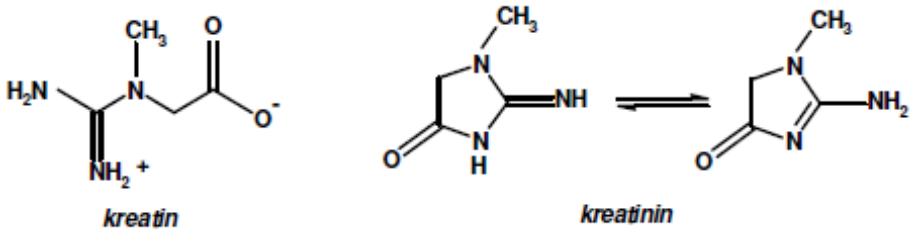
2.6. KREATIN I KREATININ

Mišićni proteini sadrže oko 16 % cjelokupnog dušika (Keeton i Eddy, 2004). Oko 95 % mišićnoga dušika potječe iz proteina, a preostalih 5 % iz drugih dušikovih spojeva, koji nisu dio proteina. Neproteinski dušik sadrži: slobodne aminokiseline, kratke (di)peptide (karnozin, anserin…), kreatin, kreatin fosfat, kreatinin, neki vitamini, nukleozidi, nukleotidi, urea (Olsson, 2004; Bruas-Reignier i Brun-Bellut, 1996).

Kreatin i kreatinin su pored reducirajućih šećera i slobodnih AK važni prekursori za tvorbu HCA. Ključna je njihova uloga posebno pri tvorbi »termičkih« HCA i AIA, koji se ne tvore bez kreatinina. Prisutnost kreatina/kreatinina posebno utječe na mutagenost HCA, jer se s većim sadržajem kreatina/kreatinina dokazano povećava mutagenost. Da dodatak kreatinina povećava količinu HCA koji imaju strukturu β-karbolina dokazali su Jägerstad i suradnici 1998.godine. Ako kreatin nije prisutan, ne tvore se IQ i IQx tip HCA (Murkovic, 2004).

Za tvorbu imidazokvinolina i imidazokvinoksalina od produkata Maillard-ove reakcije (npr. 2-metil-piridin, 2,5-dimetil-pirazin) s acetaldehidom potreban je kreatinin (Milic, Djilas, i Canadanovic -Brunet, 1993).

Kreatinin nastaje spontanom tvorbom cikličkog derivata iz kreatina u mišićnom tkivu pri temperaturama iznad 100 °C u reakciji koja je prikazana na slici 4.



Slika 4. Strukture kreatina i kreatinina (Turesky, 2008)

HCA u mesu nastaju u procesu kompleksnih reakcija, koje se toplinskom obradom pri visokim temperaturama događaju između slobodnih aminokiselina, kreatina/kreatinina i ugljikohidrata, tj. tvari, koje su prirodno prisutne u mesu (Zöchling i Murkovic, 2002).

Wyss i Kaddurah-Daouk (2000) tvrde, da su kreatin i/ili kreatinin ključni prekursori AIA. Dokazana je povezanost između mutagenosti i sadržaja kreatina i/ili kreatinina, budući da je dodatak kreatina ili kreatin-fosfata u uzorak mesa prije toplinske obrade doveo do povećanja mutagenosti 40 puta te do povećanja količine AIA za 9 puta.

In vitro reverzibilna, neenzimska pretvorba kreatina u kreatinin je ovisna o vrijednosti pH i temperature. Pri višim vrijednostima pH i nižim temperaturama se tvori više kreatina, dok se pri nižim vrijednostima pH i višim temperaturama tvori više kreatinina. Kreatin fosfat je u kiselom nestabilan, zato hidrolizira u kreatin ili kreatinin i anorganski fosfat (Wyss i Kaddurah-Daouk, 2000). Toplinskom obradom se pretvori 20 % do 65 % kreatina u kreatinin (Harris i sur., 1997). Količina kreatina se u kiselom mediju toplinskom obradom smanjuje, pri čemu se sadržaj kreatinina povećava (Campo i sur., 1998).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1.Uzorci svinjskog leđnog mišića (*longissimus dorsi*)

Za izradu ovog rada korišteno je svinjsko meso leđnog mišića (*longissimus dorsi)* kupljeno u trgovini. Kupljeni su veliki odresci iz kojih su potom pripravljeni kvadratni komadi debljine približno 2,5 cm. Zatim su iz tih komada po šabloni napravljenoj od plastike napravljeni odresci približno iste veličine 6 cm x 5 cm. Zbog velike količine mesa korištenog za izradu ovog rada nije bilo moguće sve ispeći u istom razdoblju. Zato je bilo potrebno odmah zamrznuti neke komade mesa. Odresci su vakuumirani i potom čuvani u zamrzivaču do pečenja. Meso je pečeno na dvoploč̌nom žaru pri 9 različitih temperatura – 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280 °C i mjereno je vrijeme potrebno dok temperatura u središtu ne dostigne 72˚C. Odreske je prije pečenja bilo potrebno držati u hladnjaku tako da bi im prije pečenja temperatura u središtu bila oko 4°C. Odresci su pečeni na žaru, a ostatak svježeg mesa je vakuumiran i stavljen u hladnjak temperature -20°C – to zamrznuto meso je služilo za analize kreatina i kreatinina (prekursore nastanka heterocikličkih amina). Mjerena je masa odrescima prije pečenja te 4 minute nakon pečenja vaganjem na vagi Bosch (Njemačka), te je izračunato kalo te iskorištenje. Odresci su zamotani u aluminijsku foliju kako bi izgubili što manje vode, stavljena je sonda (ubodni termometar Testo 177 T4, Njemačka) za mjerenje temperature u sredinu odreska, stavljen je odrezak u dvoploč̌ni žar i započelo mjerenje vremena na odabranoj temperaturi sve dok temperatura u središtu ne dostigne 72 °C.

3.2. APARATURA I PRIBOR

Za pečenje svinjskih odrezaka koristio se dvoploč̌ni žar (Silex, Njemačka), temperatura je mjerena pomoću ubodnog termometra Testo 177 T4, Njemačka.

3.3. METODE RADA

3.3.1. Određivanje udjela HCA

Heterociklični aromatski amini (HCA) su ekstrahirani ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE) te određivani tekućinskom kromatografijom s masenim spektrometrom (LC-MS). Dobiveni kromatogrami su obrađeni računalnim programom MassLynx™ V4.1 (MassLynx™ Version 4.1 SP4, 2004). Za određivanje sadržaja HCA upotrebljena je modificirana metoda po Messner i Murkovic (2004) te Sentellas i suradnici (2004).

3.3.1.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE)

U 100 ml čaše odvagano je 1,000 ili 3,000 g homogeniziranog uzorka pečenog mesa i dodano 100 ml otopine internoga standarda (c = 2 mg/L) TriMeIQx (TRC, A630000) u metanolu i potom 12 ml 1 M otopine NaOH (Merck, 1.06498). Čaše su pokrivene s parafilmom i ostavljene kroz 12 h na magnetnoj mješalici (Variomac Electronicrüher MULTIPOINT HP1S, Njemačka). U alkalni homogenat dodano je 12 g dijatomejske zemlje – Extrelut® NT (Merck, 1.15092) i sve dobro promiješano staklenim štapićem. HCA su ekstrahirani s 70 ml ekstrakcijskoga otapala etilacetata (Sigma-Aldrich, 34858-252), sadržaj je prenijet u stakleni lijevak na kojem je bio filter papir (Sartorius 391) te je sakupljan filtrat u Erlenmeyerovu tikvicu. Slijedilo je čišćenje eluata s metodom ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE, iz engl. solid phase extraction). Uporabljene su kolone (engl. Cartridge) Oasis MCX 3cc 60 mg (iz engl. Mixed Mode Cation Exchanger) (LP Extraction Cartridges, cat: 186000253, Waters, Ireland). Sav eluat je nanijet na MCX sorbent koji je prethodno kondicioniran s 2 ml metanola (Merck, 1.06007) i ekvilibriran s 2 ml otopine etilacetata (Sigma-Aldrich, 34858-252). Čiščenje je počelo s 2 ml 0,1 M otopine HCl (Merck, 1.09060) i s 2 ml metanola (Merck, 1.06007). Potom su kolone sušene na zraku pa pod vakuumom. Na MCX sorbent nanijeti polarni i nepolarni HCA su eluirani s 2 ml smjese otopine metanola (Merck, 1.06007) i 25 % amonijaka (NH_3; Merck, 1.05432), koja je napravljena u omjeru 19:1 (v/v). Dobiveni uzorci su potom do suhoga odpareni na vakuum centrifugi, a konačni ekstrakt prije analize na LC-MS sustavuu rastopljen u 200 μl metanola (Merck, 1.06007).

3.3.1.2. Tekućinska kromatografijom s masenim spektrometrom (LC-MS)

Analiza uzoraka je bila napravljena na sustavu Agilent 1100 koji se sastoji od:

- vakuum rasplinivača: G1379A,
- binarne pumpe: G1312A,
- automatskog injektora uzorka: G1330B,
- termostata kolone: G1316A,
- DAD detektora: G1315B.

Kromatografski uvjeti:

- način kromatografije: RP (reverzna faza),
- kromatografska kolona Kinetex Biphenyl (2,6 μm × 2,1 × 100 mm) (Phenomenex, Torrance, ZDA,),
- mobilna faza A: 30 mM amonijev formijat ($HCOOHNH_4$; Fluka, 09739; pH 3,2),
- mobilna faza B: acetonitril (AcN; Merck, 1.00030),
- volumen injektiranja: 1 μl,
- temperatura uzoraka: 8 °C,
- temperatura kolone: 30 °C.

U tablici 2 prikazani su kromatografski uvjeti (gradijenti mobilne faze A i B) koji su upotrebljeni prilikom određivanja HCA.

Tablica 2. Kromatografski uvjeti (gradijenti mobilne faze) pri određivanju HCA

Vrijeme (min)	**mobilna faza A (%)**	**mobilna faza B (%)**	**protok (ml/min)**
0,00	95	5	0,350
14,00	40	60	0,350
14,50	0	100	0,350
17,00	0	100	0,350
20,00	95	5	0,350
26,00	95	5	0,350

Svi HCA su bili određeni na osnovi retencijskih vremena im/z HCA standarda (TRC: harman, H105000; norharman, N700000; IQ, H785000; MeIQ, A605200; IQx, A616900; MeIQx, A606600; 4,8-DiMeIQx, A631000; 7,8-DiMeIQx, A869500; 4,7,8-TriMeIQx, A630000; PhIP, A617000, AαC, A629002; Glu-P-2, N493810; Trp-P-1, N493780; Trp-P-2, N493985).

Uvjeti detekcije:

Za detekciju HCA upotrebljen je maseni detektor Micromass Quattro micro® API (Waters, ZDA) s elektrosprej ionizacijom (Electrospray Ionization – ESI) pri slijedećim uvjetima:

- napetost kapilare 3,5 kV u pozitivnom načinu ionizacije (ESI+),
- napetost ulazne leće: 40 V,
- ekstraktor: 2 V,
- temperatura ulazne leće: 120 °C,
- temperatura razpršivajućeg N_2: 350 °C,
- protok N_2 ulazne leće: 50 l/h,
- protok razpršenog N_2: 350 l/h,
- način detekcije: SIR način.

Detekcija na masnom spektrometru je provedena u SIR načinu pri uvjetima koji su navedeni u tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti detekcije na masenom spektrometru u SIR načinu

HCA	**m/z (ESI+)**	**Napetost leće (V)**
IQ	199,20	40
IQx	200,20	40
MeIQ	213,20	40
MeIQx	214,20	40
4,8-DiMeIQx	228,20	40
7,8-DiMeIQx	228,20	40
Glu-P-2	185,20	40
Trp-P-1	221,20	40
Trp-P-2	198,20	40
AαC	184,20	40
harman	183,28	40
norhrman	169,26	40
PhIP	225,20	40
TriMeIQx	242,26	40

Rezultati su bili obrađeni s funkcijom Quantify u računalnom programu MassLynxTM V4.1 (Micromass, 2004).

3.3.2. Određivanje teksture

Tekstura leđnog mišića svinjskog mesa određena je na teksturometru TA-XT Plus (Stable Micro Systems), nastavak Warner-Bratzler Blade. Nakon pečenja mesa na žaru, meso je ohlađeno u aluminijskoj foliji i odrezan je komadić širine 1 cm s kraja ispečenog mesa te je mjerena tekstura. Mjeren je potreban rad i sila za rezanje komadića mesa. Na svakom uzorku rađena su 3 paralelna mjerenja.

3.3.3. Određivanje kreatina i kreatinina

3.3.3.1. Priprema standarda kreatina i kreatinina

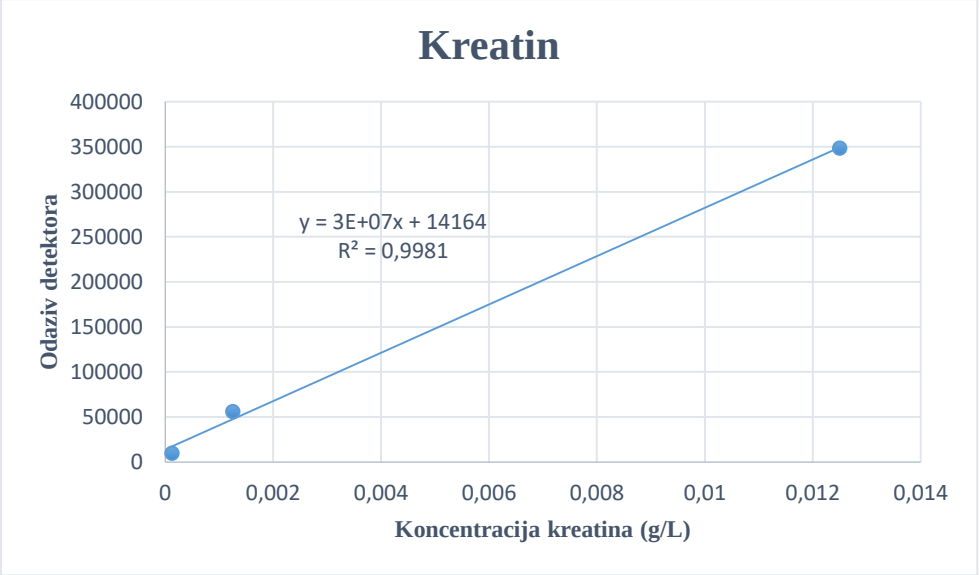
U 50 ml tikvicu odvagano je 25 mg standarda kreatina (c = 0.5 g/L) i dobivena je originalna otopina. Potom su pripremljene sljedeće otopine u vialama :

- KS1 : 1 mL originala, c = 0.5 g/L
- KS2 : 500 µL KS1 + 500 µL vode, c = 0.25 g/L
- KS3 : 500 µL KS2 + 500 µL vode, c = 0.125 g/L
- KS4 : 100 µL KS3 + 900 µL vode, c = 0.0125 g/L
- KS5 : 100 µL KS4 + 900 µL vode, c = 0.00125 g/L
- KS6 : 100 µL KS5 + 900 µL vode, c = 0.000125 g/L

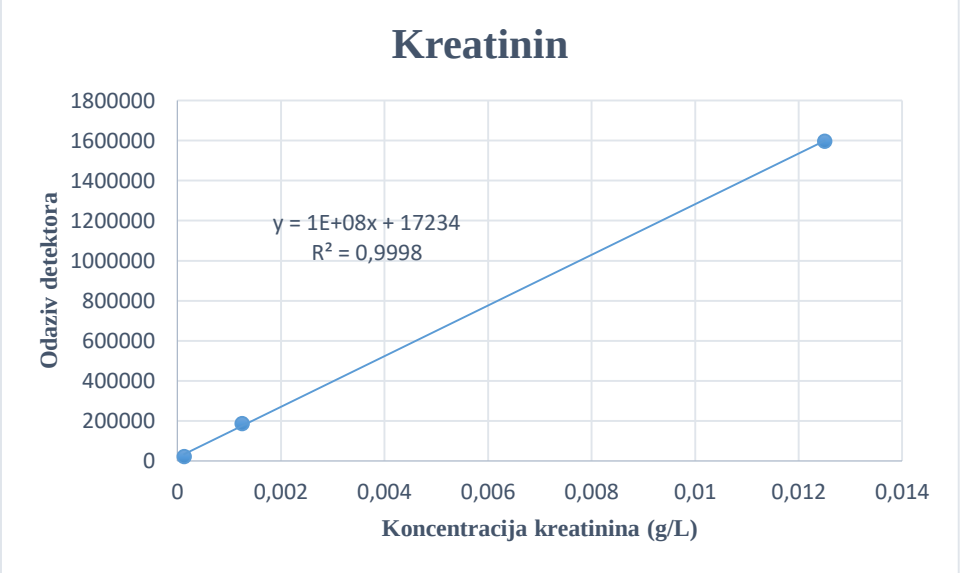
U 50 ml tikvicu odvagano je 25 mg standarda kreatinina (c = 0.5 g/L), i dobivena je originalna otopina. Potom su pripremljene sljedeće otopine u vialama :

- KS1 : 1 mL originala, c = 0.5 g/L
- KS2 : 500 µL KS1 + 500 µL vode, c = 0.25 g/L
- KS3 : 500 µL KS2 + 500 µL vode, c = 0.125 g/L
- KS4 : 100 µL KS3 + 900 µL vode, c = 0.0125 g/L
- KS5 : 100 µL KS4 + 900 µL vode, c = 0.00125 g/L
- KS6 : 100 µL KS5 + 900 µL vode, c = 0.000125 g/L

Baždarni dijagram za određivanje koncentracije kreatina (slika 5) i kreatinina (slika 6) rađen je s otopinama različitih koncentracija kreatina, odnosno kreatinina te je mjeren odaziv kako bi se kasnije moglo odrediti koncentraciju kratina/kreatinina u uzorcima svježeg mesa. Dobro područje linearnosti dobiveno je samo za najmanje 3 koncentracije standarda kreatina/kreatinina (0.0125, 0.00125 i 0.000125 g/L). Iz dobivenih jednadžbi pravca izračunate su tražene koncentracije kreatina i kreatinina u mesu.



Slika 5. Baždarni dijagram za standard kreatin



Slika 6. Baždarni dijagram za standard kreatinin

3.3.3.2. Priprema uzoraka svježeg mesa za analizu kreatina i kreatinina

Sadržaj kreatina/kreatinina određivan je u uzorcima svježeg mesa kako bi se utvrdili da li je meso uniformno. Rezultate su izraženi u mM/kg.

U 50 ml falconicu (Saerstedt, 62.548.004) odvagano je 3,000 g homogeniziranoga svježega uzorka i dodano 30 ml destilirane vode. Uzorak je potom još 2 min dodatno homogeniziran s homogenizatorom (Ultra-turax 25, nastavak S25N-18G; IKA, Njemačka) pri 1100 okretaja/min. Potom su uzorci temeljito promiješani na vorteksu (MS2 Minishaker, IKA) i potom stavljeni u centrifugu (Tehtnica LC 320) na 10 minuta, a dobivena suspenzija zatim prefiltrirana preko filter papira (Sartorious grade: 388) u Erlenmeyerovu tikvicu. Skupljeni filtrat služio je za analizu kreatina i kreatinina pomoću LS-MS.

3.3.3.3. LC-MS analiza

Analiza uzoraka je bila napravljena na sustavu Agilent 1100 koji se sastoji od:

- vakuum rasplinivača: G1379A,
- binarne pumpe: G1312A,
- automatskog injektora uzoraka: G1330B,
- termostata kolone: G1316A,
- DAD detektora: G1315B.

Kromatografski uvjeti:

- način kromatografije: HILIC,
- kromatografska kolona: Xbridge HILIC (5 μm × 3,0 × 100 mm) (Waters),
- mobilna faza A: 100 mM amonijev formijat u vodi ($HCOOHNH_4$; Fluka, 09739),
- mobilna faza B: acetonitril (AcN; Merck, 1.00030),
- volumen injektiranja: 10 μl,
- temperatura uzoraka: 4 °C,
- temperatura kolone: 30 °C.

U tablici 4 prikazani su kromatograski uvjeti korišteni za određivanje kreatin i kreatinina.

Tablica 4. Kromatografski uvjeti (gradijenti mobilne faze) pri određivanju kreatina i kreatinina

Vrijeme (min)	mobilna faza A (%)	mobilna faza B (%)	protok (ml/min)
0,00	10	90	0,200
25,00	90	10	0,200
25,10	10	90	0,200
33,00	10	90	0,200

Uvjeti detekcije:

Za detekciju kreatina i kreatinina uporabljen je maseni detektor Micromass Quattro micro® API (Waters, ZDA) s elektrosprej ionizacijom (Electrospray Ionization – ESI) koja je djelovala pri ovim uvjetima:

- napetost kapilare 3,5 kV u pozitivnom načinu ionizacije (ESI+),
- napetost ulazne leće: 30 V,
- ekstraktor: 2 V,
- temperatura ulazne leće: 120 °C,
- temperatura razpršivajućeg N2: 350 °C,
- protok N2 ulazne leće: 50 l/h,
- protok razpršenog N2: 350 l/h,
- način detekcije: SIR način.

Detekcija na masnom spektrometru je provedena u SIR načinu pri uvjetima koji su navedeni u tablici 5.

Tablica 5: Uvjeti detekcije na masenom spektrometru u SIR načinu

	m/z (ESI+)	Cona (V)
Kreatin	131,14	30
Kreatinin	113,12	35

Rezultati su bili obrađeni s funkcijom Quantify u računalnom programu MassLynxTM V4.1 (Micromass, 2004).

3.3.4. Statistička analiza

Za statističku obradu podataka korišten je SAS Software (SAS Software. Version 8.01. 1999. Cary, SAS Institute Inc.: software). Osnovni statistički parametri izračunati su postupkom MEANS, s postupkom UNIVARIATE te su podaci testirani na normalnost distribucije (SAS Software, 1990). Rezultati pokusa su bili analizirani po metodi najmanjih kvadrata s postupkom GLM (*General Linear Model*).

Za analizu utjecaja temperature ploče grila na iskorištenje pečenja, sadržaj prekursora HCA, pojedine i ukupne HCA te teksturne parametre odrezaka upotrebljen je statistički model, u kojem je uključen fiksni utjecaj temperature (i = 9, 120 °C, 140 °C, 160 °C, 180 °C, 200 °C, 220 °C, 240 °C, 260 °C, 280 °C), i ponovljivosti (j = 6), i njihove interakcije : model 1: $y_{ijk} = \mu + T_i + R_j + T{*}R_{ij} + e_{ijk}$. Prosječne vrijednosti za eksperimentalne skupine su bile izračunate uporabom Duncanovega testa i uspoređene s 5% rizikom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati mjerenja i obrade podataka prikazani su kroz 6 potpoglavlja.

Tema ovog diplomskog rada bila je istražiti utjecaj 9 različitih temperatura pečenja (120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260 i 280 °C) na dvopločnom žaru na tvorbu kancerogenih i mutagenih spojeva heterocikličkih amina u svinjskim odrescima kvadratnog oblika debljine približno 2,5 cm sve dok središnja temperatura unutar odreska ne dostigne 72 °C.

Rezultati su prikazani u 5 tablica i 6 grafova unutar kojih je prikazan sadržaj pojedinih i ukupnih HCA, njihov sadržaj s obzirom na temperature pečenja, sadržaj kreatina i kreatinina, rezultati teksturne analize te iskorištenje pečenja.

4.1. SADRŽAJ POJEDINIH I UKUPNIH HCA

U tablici 6 su prikazani rezultati analize sadržaja pojedinih i ukupnih HCA u pečenim svinjskim odrescima s izračunatim osnovnim statističkim parametrima. 107 uzoraka je bilo korišteno u analizama za određivanje HCA. Mjerenja su rađena na 9 temperatura u 6 ponavljanja, svako u 2 paralele, što je 108 uzoraka, no jedan nije bio uspješan te se dolazi do brojke 107. Određeno je sedam različitih heterocikličkih amina: MeIQx, PhIP, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMelQx, Glu-P-2, Harman i Norharman. Sadržaji pojedinih HCA variraju (65 % < KV < 233 %), što je posljedica u prvom redu različitih temperatura ploča prilikom postupka pečenja, također i razlika među životinjama (ili ponovljivosti pokusa). Izmijerili smo količine HCA u rasponu od 0 (MeIQx, PhIP, 4,8-DiMeIQx, Glu-P-2, Harman in Norharman) do 40,03 (PhIP) ng/g toplinski obrađenoga mesa. Uzorci odrezaka su sadržavali prosječno najviše PhIP (2,91ng/g), no kod njih je uočena i najveća standardna devijacija, u manjim količinama 4,8-DiMeIQx (0,83 ng/g).

U pečenoj govedini, svinjetini, ribama i peradi u najvećem se opsegu tvore MeIQx i PhIP u odnosu na ostale HCA. Njihov sadržaj varira u rasponu od 0,1 do 100 ng/g toplinski obrađenoga mesa (Knize i sur., 1994; Skog i sur., 1998; Nagao, 1999). U ovom istraživanju je potvrđeno da u prosjeku nastaje najviše PhIP. Jedan od razloga, da se PhIP tvori u najvećem opsegu je u tom da je mehanizam nastanka PhIP jednostavniji od ostalih HCA (Knize i Felton, 2005).

Tablica 6. Rezultati kemijske analize sadržaja pojedinih i ukupnih HCA u pečenim svinjskim odrescima

HCA	n	ng HCA/g mesa			Standardna devijacija	Koeficijent varijabilnosti (%)
		Srednja vrijednost	Min	Max		
MeIQx	107	1,94	0	14,79	2,8	143
PhIP	107	2,91	0	40,03	6,8	233
4,8-DiMeIQx	107	0,83	0	3,30	0,8	94
7,8-DiMelQx	107	2,37	0,03	6,52	1,5	65
Glu-P-2	107	2,60	0	9,73	2,9	112
Harman	107	2,24	0	10,75	2,4	105
Norharman	107	1,88	0	26,73	3,2	171
ukupni HCA	107	14,77	1,27	75,72	13,3	90

Kod pečenja i prženja je povećana tvorba PhIP, a kod kuhanja IQ i IQx tipa HCA. Messner i Murkovic (2004) su s pomoću modelnog sustava u suhim uvjetima dokazali povećanu tvorbu PhIP koja je posljedica velikog gubitka vode koja pogoduje tvorbi PhIP. Olsson i sur. (2005) su također u toplinski obrađenom mišićima određivali PhIP, Harman, Norharman i MeIQx, dok su IQx određivaili samo u uzorcima svinjetine, koja je imala mutiran gen RN^{-}.Warzecha i sur. (2004) također pokazuju, da se kod toplinski obrađenog mesa tvore PhIP, MeIQx te 4,8-DiMeIQx u relativno najvećim količinama.Ta tvrdnja se slaže rezultatima ovog istraživanja; PhIP, 7,8-DiMelQx, Glu-P-2 i Harman su detektirani u najvećem udjelu.

4.2. SADRŽAJ HCA S OBZIROM NA TEMPERATURU PEČENJA, NEKORIGIRANE VRIJEDNOSTI

Utjecaj temperature ploče na sadržaj pojedinih i ukupnih HCA može se procijeniti na osnovi rezultata mjerenja prikazanih u tablici 7. Ovi podaci nisu korigirani s obzirom na različite mase odrezaka prije pečenja koje su iznosile od cca 60 do 100 g. Sadržaj ukupnih HCA raste ($p < 0,001$) s povišenjem temperature pečenja. Pri temperaturi ploča od 120 °C do 240 °C se u svinjskim odrescima tvori se ukupno od 9,15 do 12,96 ng/g HCA, razlike između temperatura nisu statistički značajne. Pri temperaturi ploče od 260 °C se tvori 18,53 ng/g HCA, što je za 57 % više HCA, nego što ih se tvori prosječno pri temperaturi od 240 °C. Veći je skok u sadržaju ukupnih HCA zabilježen pri temperaturi ploče od 280°C, kada ih se tvorilo 36,50 ng/g, to predstavlja 330 % povećanje u odnosu na temperature do 240°C. Pri temperaturi od 180 °C, tvori se sumarno najmanje HCA, dok se očekivano pri najvišoj temperaturi (280 °C) tvori najviše HCA. Prije izvođenja pokusa, očekivan je linearniji porast sadržaja HCA porastom temperature, a ne ovakva dva značajna skoka u sadržaju HCA. Dok su dobiveni rezultati drugačiji od očekivanih jer od 120 do 240 °C nema značajnije statističke razlike u sadržaju ukupnih HCA, dok se pri temperaturama od 260 i 280 °C uočavaju značajnije statističke razlike u sadržaju ukupnih HCA. Pri najvišoj mjerenoj temperaturi je sadržaj HCA skoro dva puta veći u odnosu na temperaturu od 240 °C. Razlog ovakvim rezultatima vjerojatno leži u činjenici što se pojedini HCA brzo pretvaraju jedni u druge kemijskim reakcijama pri temparaturama do 240°C, te njihov sumarni sadržaj ne varira puno. Pri dvije najviše temperature dolazi do velikog porasta sumarnog HCA vjerojatno jer naraste brzina reakcije njihovog nastajanja i jer su to upravo kritične temperature kod koje je najviša njihova koncentracija. Problem kod nekorigiranih vrijednosti s obzirom na masu je taj što se HCA tvore u kori mesa, ako masa uzoraka varira od 60 do 100 g, veća je vjerojatnost da će više HCA nastati na istoj temperaturi kod uzoraka manje mase jer se kod takvih uzoraka stvori više kore jer su bliže pločama dvopločnog žara zbog njihove manje debljine.

Tablica 7. Utjecaj temperature ploča na sadržaj (ng HCA/g) heterocikličkih aromatskih amina (pojedinih i ukupnih) u svinjskim odrescima, pečenim na dvoploč nom žaru (nekorigirane vrijednosti s obzirom na masu)

Temperatura ploča (°C)	MeIQx	PhIP	4,8-DiMeIQx	7,8-DiMelQx	Glu-P-2	Harman	Norharman	sum HCA
120	$1,41 \pm 2,10^{b}$	$0,60 \pm 1,01^{c}$	$1,28 \pm 0,90^{a}$	$2,84 \pm 1,49^{a}$	$1,58 \pm 2,85^{c}$	$2,75 \pm 2,89^{ba}$	$1,02 \pm 1,12^{b}$	$11,49 \pm 5,37^{c}$
140	$2,61 \pm 4,32^{ba}$	$0,15 \pm 0,26^{c}$	$0,93 \pm 0,99^{bac}$	$2,64 \pm 1,43^{ba}$	$2,65 \pm 3,77^{bac}$	$1,06 \pm 0,98^{b}$	$0,30 \pm 0,54^{b}$	$10,34 \pm 6,46^{c}$
160	$0,80 \pm 0,61^{b}$	$0,28 \pm 0,39^{c}$	$0,66 \pm 0,55^{bdc}$	$2,56 \pm 1,49^{bac}$	$2,10 \pm 2,59^{bc}$	$2,08 \pm 2,91^{ba}$	$1,22 \pm 2,39^{b}$	$9,71 \pm 6,52^{c}$
180	$0,84 \pm 0,84^{b}$	$0,32 \pm 0,24^{c}$	$0,73 \pm 0,78^{bdc}$	$1,73 \pm 1,39^{d}$	$2,94 \pm 2,57^{bac}$	$1,35 \pm 0,90^{b}$	$1,23 \pm 1,38^{b}$	$9,15 \pm 5,12^{c}$
200	$1,09 \pm 0,94^{b}$	$0,84 \pm 1,76^{c}$	$1,33 \pm 1,01^{a}$	$2,36 \pm 2,11^{bac}$	$3,06 \pm 3,12^{ba}$	$2,23 \pm 2,26^{ba}$	$0,99 \pm 1,25^{b}$	$11,90 \pm 9,06^{c}$
220	$1,49 \pm 1,04^{b}$	$1,25 \pm 1,04^{c}$	$1,03 \pm 0,70^{ba}$	$2,46 \pm 1,79^{bac}$	$2,82 \pm 2,43^{bac}$	$2,20 \pm 1,62^{ba}$	$1,70 \pm 1,39^{b}$	$12,96 \pm 6,92^{c}$
240	$2,18 \pm 3,19^{b}$	$1,67 \pm 1,12^{c}$	$0,40 \pm 0,49^{d}$	$1,98 \pm 1,54^{dc}$	$1,80 \pm 1,91^{bc}$	$2,03 \pm 1,80^{ba}$	$1,74 \pm 1,28^{b}$	$11,80 \pm 6,15^{c}$
260	$2,76 \pm 3,39^{ba}$	$4,70 \pm 5,78^{b}$	$0,57 \pm 0,49^{dc}$	$2,09 \pm 1,14^{bdc}$	$3,81 \pm 3,54^{a}$	$2,44 \pm 3,32^{ba}$	$2,17 \pm 1,03^{b}$	$18,53 \pm 11,54^{b}$
280	$4,36 \pm 4,10^{a}$	$16,19 \pm 12,99^{a}$	$0,41 \pm 0,36^{d}$	$2,54 \pm 1,53^{bac}$	$2,78 \pm 3,29^{bac}$	$3,77 \pm 2,51^{a}$	$6,45 \pm 7,48^{a}$	$36,50 \pm 24,81^{a}$
SE	2,06	3,64	0,46	0,64	1,45	1,93	2,06	6,71
p_T	0,006	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,015	0,14	< 0,001	< 0,001
p_R	0,001	0,029	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
$p_{T\times R}$	0,006	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,092	0,001	< 0,001

SE – standardna pogreška procjene; p_T – utjecaj temperature ploče; p_R – utjecaj ponovljivosti; $p_{T\times R}$ – utjecaj interakcije temperature ploča i ponovljivosti; srednje vrijednosti s drugačijim slovom(^{a,b,c,d}) unutar stupca se značajno razlikuju (p <0,05; karakteristične razlike između temperatura ploče).

Tvorba PhIP, AαC, i β-karbolina je pod utjecajem temperature kuhanja i zasigurno je nelinearna (Gross i Gruter 1992; Bordas i sur., 2004; Olsson i sur., 2005), što pokazuju i naši rezultati u rasponu temperatura od 120 do 240°C. Norharman i 4,8-DiMeIQx su osjetljiviji na temperaturne promjene, dok su 8-MeIQx i AαC manje osjetljivi (Ahn i Grun, 2005).

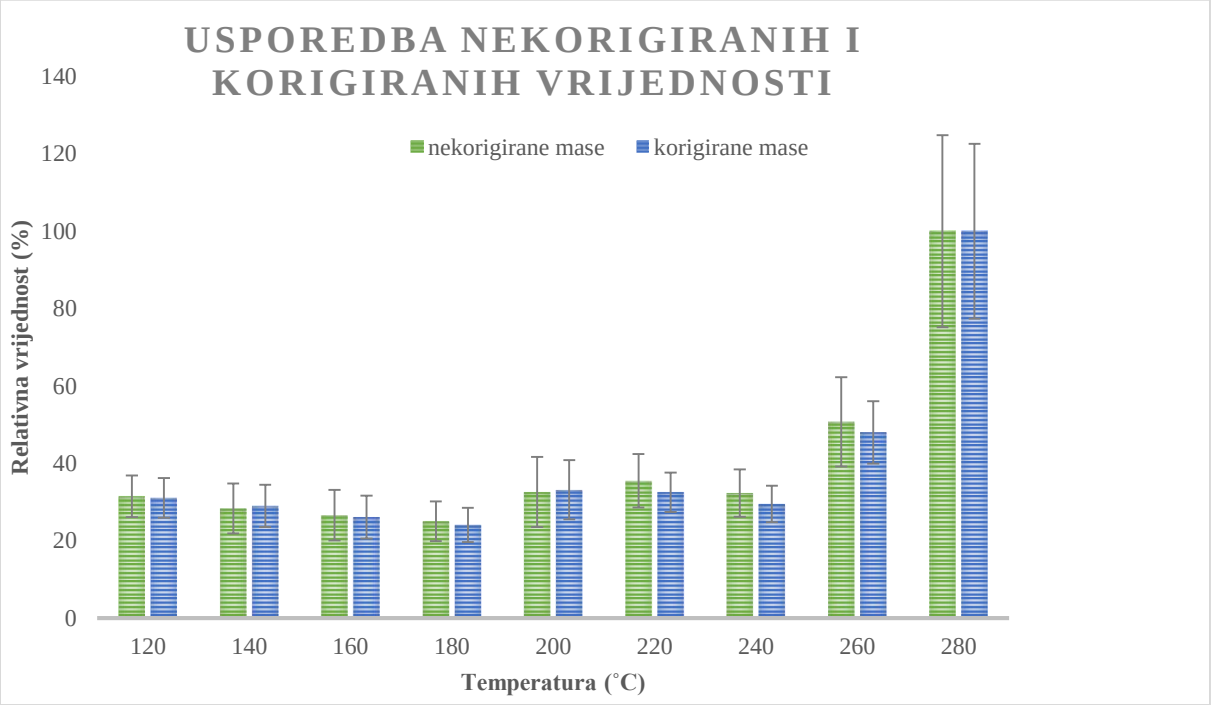
U modelu pečenja, temperatura i vrijeme utječu na tvorbu HCA, iako ne potpuno linearno. Kod kuhanja, smanjenje tvorbe HCA je uočeno nakon dugog vremena obrade i visokih uporabljenih temperatura (Bordas i sur., 2004).

Tvorba HCA ovisi o efikasnosti prijenosa topline. Neki autori tvrde da nakon nekog vremena, pri temperaturi od 225 °C, dosegnuta je maksimalna koncentracija koja se održava konstantnom. To se događa kod 4,8-DiMeIQx, dok se količine 8-MeIQx i 7,8-DiMeIQx smanjuju nakon dosezanja maksimalnog pika, te nisu nađene značajnije količine PhIP. Ovi rezultati govore da se HCA ne tvore samo, već prolaze i kroz degradaciju. Takva degradacija vjerojatno se događa pri svim temperaturama, ali je značajna tek iznad 200°C za IQx derivatei PhIP (Knize i sur., 1994c; Jackson i Hargraves 1995). Dobiveni rezultati se djelomično slažu s ovim tvrdnjama, nije zabilježen značajan porast koncentracije HCA pri temperaturi od 240°C jer se u tom rasponu sadržaj ukupnih HCA nije značajno mijenjao, no povišenjem temperature rezultira porastom u sadržaju ukupnih HCA.

4.3. SADRŽAJ HCA S OBZIROM NA TEMPERATURU PEČENJA, KORIGIRANE VRIJEDNOSTI

U tablici 8 prikazane su vrijednosti sadržaja pojedinih HCA s obzirom na temperaturu pečenja, ali su one sve korigirane na masu odrezaka od 100 g. Pri temperaturi ploča od 120 °C do 240 °C se u svinjskim odrescima tvori se skupno od 7,34 do 10,10 ng/g HCA, razlike između temperatura nisu statistično značajne. Arvidsson i sur. (1997) su s pomoću modelnog sustava pokazali, kako je tvorba HCA funkcijsko ovisna o temperaturi i vremenu toplinske obrade. Pri temperaturi od 200 °C količina HCA brzo naraste. U ovom istraživanju količina HCA se poveća tek pri temperaturi od 260°C što se ne slaže s njihovim zaključkom. Pri temperaturi ploče od 260 °C se tvori 14,67 ng/g HCA, što je za 64 % više HCA, nego što ih se tvori prosječno pri temperaturi od 240 °C. Veći je skok u sadržaju ukupnih HCA zabilježen pri temperaturi ploče od 280 °C, kada ih se tvorilo 30,43 ng/g, to predstavlja 340 % povećanje u odnosu na temperature do 240 °C. Ako se te vrijednosti usporede s nekorigiranim vrijednostima prikazanim u tablici 7, može se zaključiti da te varijacije u masi svinjskih odrezaka nisu bitno

utjecale na sadržaj HCA, no korigirane vrijednosti su ipak manje raspršene u odnosu na nekorigirane vrijednosti kao što je prikazano na slici 7.



Slika 7. Usporedba nastanka sumarnih HCA za korigirane i nekorigirane mase mesa pri različtim temperaturama

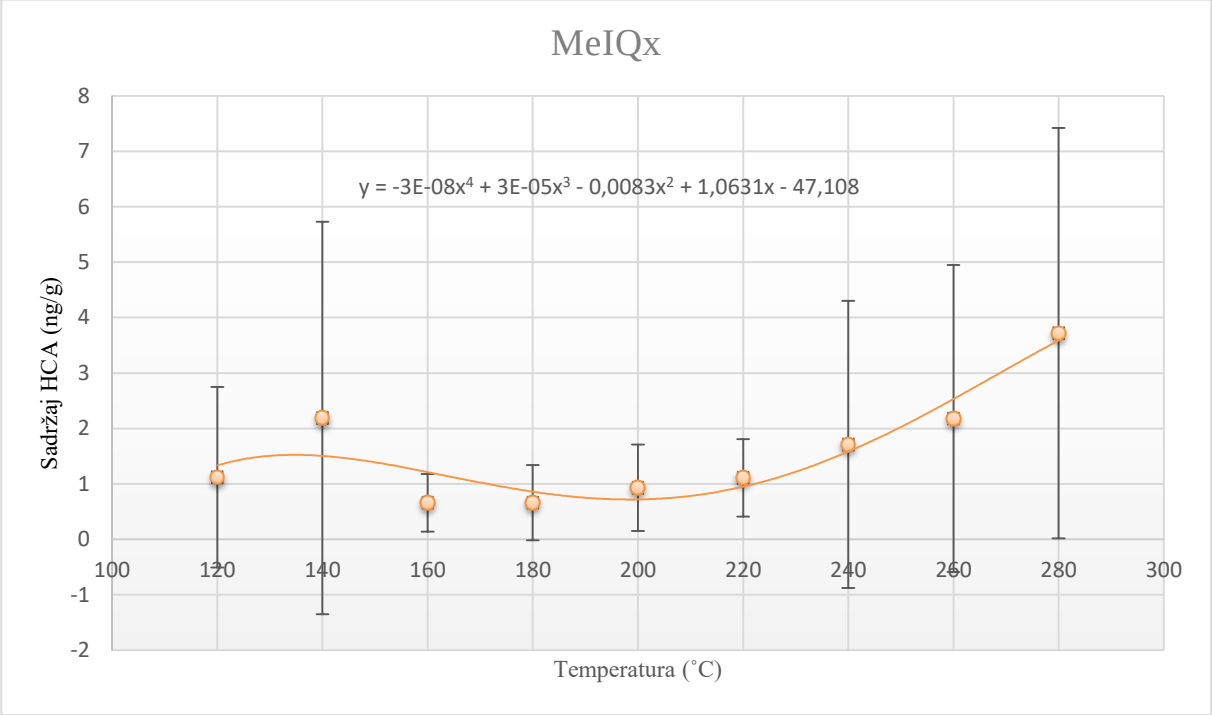
Tablica 8. Utjecaj temperature ploče na korigirani sadržaj (ng HCA/g) heterocikličkih aromatskih amina (pojedinih i ukupnih) u svinjskimodrescima s obzirom na njihovu masu, pečenih na dvopločnom žaru

Temperatura ploča (°C)	MeIQx	PhIP	4,8-DiMeIQx	7,8-DiMelQx	Glu-P-2	Harman	Norharman	sum HCA
120	$1{,}12 \pm 1{,}63^{b}$	$0{,}55 \pm 0{,}96^{c}$	$1{,}07 \pm 0{,}81^{a}$	$2{,}29 \pm 1{,}22^{a}$	$1{,}52 \pm 2{,}94^{bc}$	$2{,}10 \pm 2{,}10^{ba}$	$0{,}82 \pm 0{,}90^{b}$	$9{,}47 \pm 5{,}13^{c}$
140	$2{,}19 \pm 3{,}54^{b}$	$0{,}14 \pm 0{,}24^{c}$	$0{,}81 \pm 0{,}88^{ba}$	$2{,}25 \pm 1{,}24^{a}$	$2{,}31 \pm 3{,}31^{bac}$	$0{,}88 \pm 0{,}80^{b}$	$0{,}25 \pm 0{,}44^{b}$	$8{,}83 \pm 5{,}48^{c}$
160	$0{,}66 \pm 0{,}52^{b}$	$0{,}24 \pm 0{,}33^{c}$	$0{,}52 \pm 0{,}42^{bdc}$	$2{,}09 \pm 1{,}23^{ba}$	$1{,}74 \pm 2{,}17^{bc}$	$1{,}64 \pm 2{,}26^{ba}$	$1{,}06 \pm 2{,}14^{b}$	$7{,}95 \pm 5{,}54^{c}$
180	$0{,}66 \pm 0{,}68^{b}$	$0{,}27 \pm 0{,}21^{c}$	$0{,}56 \pm 0{,}59^{bdc}$	$1{,}33 \pm 1{,}02^{d}$	$2{,}45 \pm 2{,}27^{ba}$	$1{,}05 \pm 0{,}65^{b}$	$1{,}01 \pm 1{,}21^{b}$	$7{,}34 \pm 4{,}42^{c}$
200	$0{,}93 \pm 0{,}78^{b}$	$0{,}69 \pm 1{,}41^{c}$	$1{,}10 \pm 0{,}79^{a}$	$1{,}95 \pm 1{,}65^{ba}$	$2{,}81 \pm 3{,}30^{a}$	$1{,}80 \pm 1{,}78^{ba}$	$0{,}82 \pm 1{,}01^{b}$	$10{,}10 \pm 7{,}65^{cb}$
220	$1{,}11 \pm 0{,}70^{b}$	$1{,}01 \pm 0{,}81^{cb}$	$0{,}77 \pm 0{,}53^{bac}$	$1{,}86 \pm 1{,}33^{bac}$	$2{,}14 \pm 1{,}83^{bac}$	$1{,}72 \pm 1{,}37^{ba}$	$1{,}30 \pm 1{,}02^{b}$	$9{,}91 \pm 5{,}09^{cb}$
240	$1{,}71 \pm 2{,}59^{b}$	$1{,}32 \pm 0{,}94^{cb}$	$0{,}30 \pm 0{,}36^{d}$	$1{,}46 \pm 1{,}07^{dc}$	$1{,}32 \pm 1{,}21^{c}$	$1{,}57 \pm 1{,}47^{ba}$	$1{,}31 \pm 0{,}95^{b}$	$8{,}98 \pm 4{,}71^{c}$
260	$2{,}18 \pm 2{,}77^{b}$	$3{,}53 \pm 3{,}96^{b}$	$0{,}47 \pm 0{,}42^{dc}$	$1{,}70 \pm 0{,}99^{bdc}$	$3{,}15 \pm 3{,}06^{a}$	$1{,}91 \pm 2{,}68^{ba}$	$1{,}73 \pm 0{,}76^{b}$	$14{,}67 \pm 8{,}06^{b}$
280	$3{,}72 \pm 3{,}70^{a}$	$13{,}51 \pm 11{,}14^{a}$	$0{,}32 \pm 0{,}30^{d}$	$2{,}07 \pm 1{,}39^{ba}$	$2{,}36 \pm 2{,}96^{bac}$	$2{,}99 \pm 1{,}99^{a}$	$5{,}47 \pm 6{,}71^{a}$	$30{,}43 \pm 22{,}60^{a}$
SE	1,71	2,99	0,37	0,53	1,14	1,55	1,8	5,58
p_T	0,002	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,005	0,173	< 0,001	< 0,001
p_R	0,001	0,029	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	< 0,001	< 0,001
$p_{T\times R}$	0,003	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,137	0,001	< 0,001

SE – standardna pogreška procjene; p_T – utjecaj temperature ploče; p_R – utjecaj ponovljivosti; $p_{T\times R}$ – utjecaj interakcije temperature ploča i ponovljivosti; srednje vrijednosti s drugačijim slovom(^{a,b,c,d}) unutar stupca se značajno razlikuju (p <0,05; karakteristične razlike između temperatura ploče)

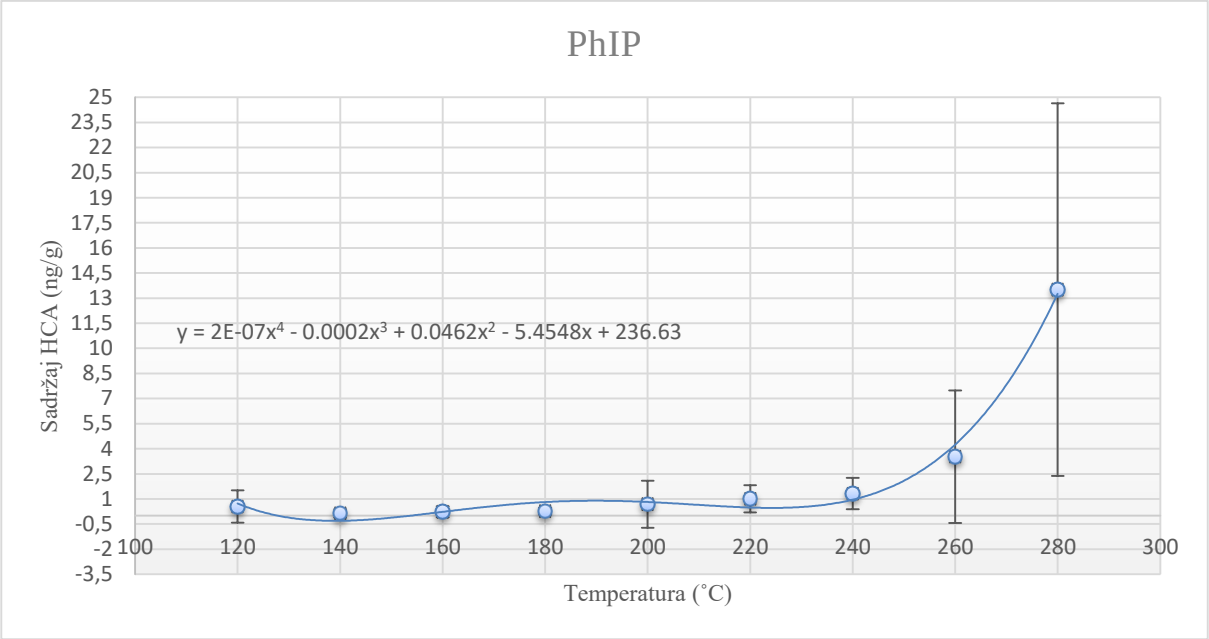
Na temperaturama poput 225 i 250 °C HCA se degradiraju ili reagiraju s ostalim spojevima (Jackson i Hargraves 1995; Arvidsson i sur., 1997)

Degradacija HCA se također može paraleno događati prilkom prženja na temperaturama između 130 i 225°C, ovisno o vremenu (Arvidsson i sur., 1997; Randel i sur., 2007). Degradacijska stabilnost je najviša za b-karboline i najmanja za PhIP (Chiu i Chen, 1999). Rezultati su to potvrdili jer nema značajne statističke razlike u sadržaju PhIP u rasponu temperatura od 120 do 240 °C.



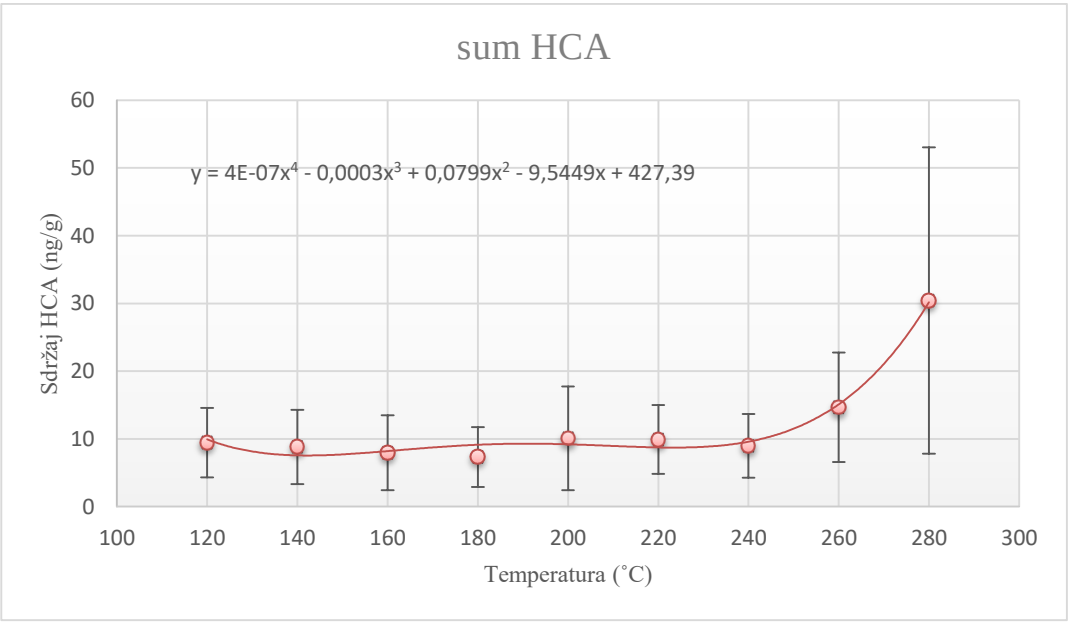
Slika 8. Utjecaj temperature na nastanak MeIQx u mesu

Na slici 8 prikazan je utjecaj temperature na sadržaj MeIQx u mesu. Iz grafa je vidljiv pik na 140 °C gdje je izuzetno visoka koncetracija MeIQx u odnosu na bliske temperature. Potom koncentracija MeIQx opet opada do temperature od 180 °C jer se dio MeIQx degadira, nakon ove temperature bilježimo rast u koncentraciji sve do najviše mjerene temperature. Pri većim koncentracijama više su i standardne devijacije. Ponovljivost ovog pokusa bila je zadovoljavajuća jer je na svakoj temperaturi ponovljeno pečenje 6 puta.



Slika 9. Utjecaj temperature na nastanak PhIP u mesu

Na slici 9 je prikazan utjecaj temperature na sadržaj PhIP u mesu. Od najniže mjerene temperature sve do 220 °C ne bilježe se značajne razlike koncentraciji PhIP, nakona toga slijedi brz porast u sadržaju sve do najviše temperature. Ako se ovaj graf usporedi s onim gdje je prikazan sadržaj MeIQx, može se zaključiti da je do temperature 240 °C koncentracija MeIQx veća od koncentracija PhIP, nakon koje se taj odnos promijeni. Ovim rezultatima potvrđena je postavljena radna hipoteza.



Slika 10. Utjecaj temperature na nastanak ukupnih HCA u mesu

Na slici 10 prikazan je utjecaj temperature na sadržaj ukupnih HCA u pečenom mesu. Vidljivo je iz grafa da nema značajne razlike u koncentraciji ukupnih HCA sve do temperature od 260 °C kada koncetracija značajno poraste. Dobivenim rezultatima potvrdili smo radnu hipotezu kako se pri najvišoj temperaturi tvori najviše HCA. Zanimljivo je da su uvijek kod najviših izmjerenih koncentracija i najveće standardne devijacije.

4.4. SADRŽAJ KREATINA I KREATININA

U tablici 9 prikazane su vrijednosti kreatina, kreatinina i ukupnog kreatina određivane u svježim uzorcima svinjskih odrezaka. Dobivene vrijednosti kreatina i kreatinina izražene su preko skupne vrijednosti kreatina. Mehanizam reakcije je taj da kreatin ciklizacijom prelazi u kreatinin pri temperaturama višim od 100 °C koji je potom prekursor za HCA. Dobivene vrijednosti nam govore koliko je prekursora kreatinina na raspolaganju za tvorbu HCA. Ne smijemo zaboraviti kako kreatinin nije jedini prekursor za tvorbu HCA, uz njega su to još šećeri te slobodne AK. Vrijednosti ukupnog kreatina se kreću između 9,47 i 10,09 mM/kg. U ovoj tablici temperature nisu važne (tj. nisu bitan parametar), one nam govore pri kojim su uvjetima kasnije pečeni ti odresci. Dobivenim rezultatima potvrđena je uniformnost mesa. Prisutnost kreatina/kreatinina posebno utječe na mutagenost HCA, jer se s većim sadržajem kreatina/kreatinina dokazano poveća mutagenost.

Tablica 9. Sadržaj kreatina, kreatinina (μMol kg^{-1}) i ukupnog kreatina (mMol kg^{-1}) u svinjskim svježim odrescima

Temperatura pri kojoj je pečen odrezak (°C)	kreatin (μM/kg)	kreatinin (μM/kg)	Ukupni kreatin (mM/kg)
120	$958,4 \pm 89,3^{e}$	$8870,3 \pm 517,3^{ba}$	$9,83 \pm 0,50^{bc}$
140	$1050,0 \pm 210,3^{bdc}$	$9037,2 \pm 542,6^{a}$	$10,09 \pm 0,48^{a}$
160	$1023,7 \pm 196,2^{d}$	$8958,1 \pm 509,6^{a}$	$9,98 \pm 0,39^{ba}$
180	$1052,3 \pm 183,5^{bdc}$	$8719,0 \pm 637,0^{b}$	$9,77 \pm 0,56^{bc}$
200	$1053,5 \pm 201,2^{bdc}$	$8647,4 \pm 636,8^{bc}$	$9,70 \pm 0,56^{ecd}$
220	$1068,1 \pm 187,9^{bac}$	$8624,0 \pm 726,9^{bc}$	$9,69 \pm 0,65^{ecd}$
240	$1099,7 \pm 159,7^{a}$	$8370,3 \pm 666,7^{d}$	$9,47 \pm 0,63^{e}$
260	$1089,6 \pm 125,9^{ba}$	$8658,3 \pm 602,8^{bc}$	$9,75 \pm 0,55^{bcd}$
280	$1045,6 \pm 118,8^{dc}$	$8456,9 \pm 496,7^{dc}$	$9,50 \pm 0,46^{ed}$
SE	45,7	274,3	0,3
p_T	< 0,001	< 0,001	< 0,001
p_R	< 0,001	< 0,001	< 0,001
$p_{T\times R}$	< 0,001	< 0,001	< 0,001

SE – standardna pogreška procjene; p_T – utjecaj temperature ploče; p_R – utjecaj ponovljivosti; $p_{T\times R}$ – utjecaj interakcije temperature ploča i ponovljivosti; srednje vrijednosti s drugačijim slovom(^{a,b,c,d}) unutar stupca se značajno razlikuju (p <0,05; karakteristične razlike između temperatura ploče).

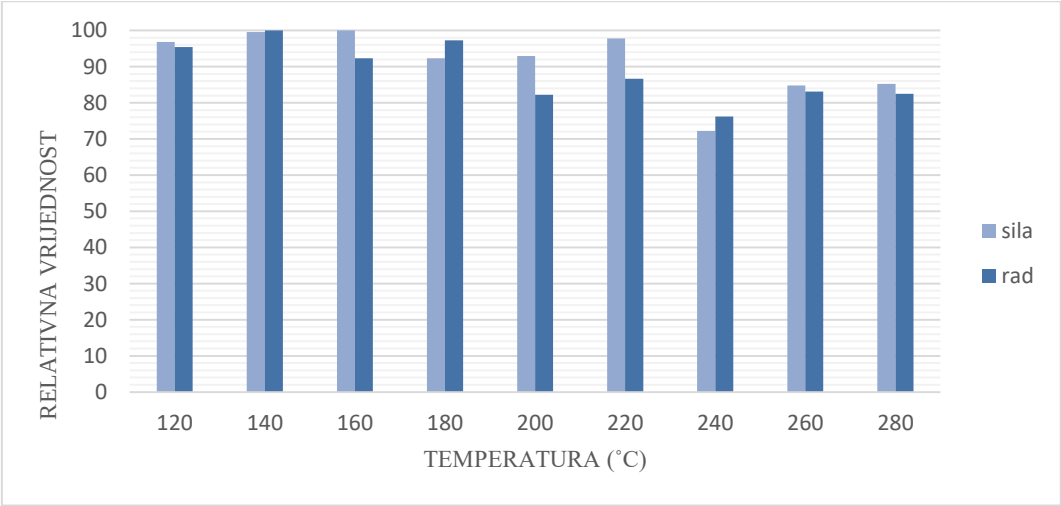
4.5. TEKSTURNI PARAMETRI

U tablici 10 prikazani su rezultati utjecaja temperature ploče na teksturne parametre svinjskih odrezaka. Sila potrebna za rezanje komada odreska je bila najmanja pri 240°C (36,6 N), a najveća pri 160°C (50,7 N). Količina rada potrebna za rezanje komada odreska bila je najniža pri temperaturi od 240°C (211,5 Ns), a najveća pri temperaturi od 140 °C (277,6 Ns). Količina sile i rada se smanji kod temperature od 240°C jer se pri toj temperaturi smanji vrijeme potrebno da središnja temperatura dostigne 72°C što utječe na teksturu mesa što je vidljivo na slici 10. Nakon te temperature, vrijednosti za silu i rad opet neznatno porastu.

Tablica 10. Utjecaj temperature ploče na teksturne parametre svinjskih odrezaka, pečenih na dvopločnom žaru

Temperatura ploča (°C)	sila (N)	rad (Ns)
120	$49,1 \pm 15,2^{a}$	$264,9 \pm 50,6^{ba}$
140	$50,5 \pm 23,0^{a}$	$277,6 \pm 88,3^{a}$
160	$50,7 \pm 29,4^{a}$	$256,2 \pm 120,2^{ba}$
180	$46,8 \pm 12,4^{ba}$	$270,1 \pm 80,6^{ba}$
200	$47,1 \pm 29,1^{ba}$	$228,3 \pm 114,7^{ba}$
220	$49,6 \pm 21,7^{a}$	$240,5 \pm 78,7^{ba}$
240	$36,6 \pm 11,2^{b}$	$211,5 \pm 52,9^{b}$
260	$43,0 \pm 20,0^{ba}$	$230,8 \pm 114,1^{ba}$
280	$43,2 \pm 17,6^{ba}$	$229,0 \pm 104,7^{ba}$
SE	13,2	69,5
p_T	0,163	0,277
p_R	< 0,001	< 0,001
$p_{T\times R}$	< 0,001	0,003

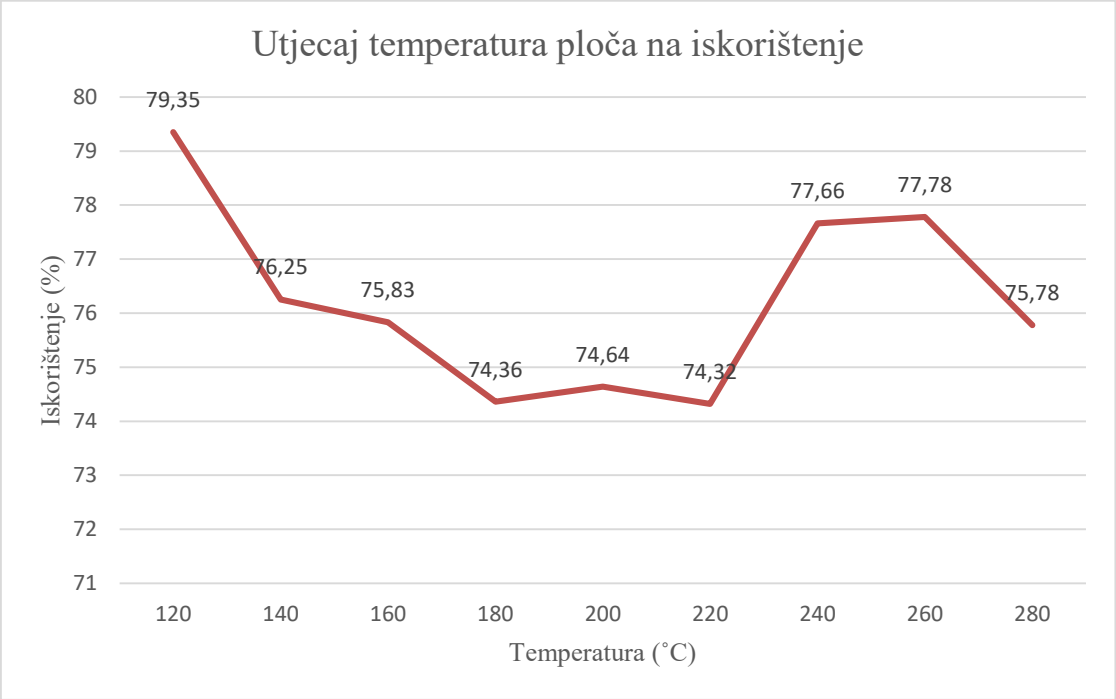
SE – standardna pogreška procjene; p_T – utjecaj temperature ploče; p_R – utjecaj ponovljivosti; $p_{T\times R}$ – utjecaj interakcije temperature ploča i ponovljivosti; srednje vrijednosti s drugačijim slovom(^{a,b,c,d}) unutar stupca se značajno razlikuju (p <0,05; karakteristične razlike između temperatura ploče).



Slika 10. Usporedba relativnih vrijednosti sile i rada upotrebljenih na odrescima pri različitim temperaturama

4.6. ISKORIŠTENJE PRILIKOM PEČENJA

Na slici 12 prikazani su rezultati utjecaja temperature pečenja na iskorištenje svinjskih odrezaka. Iskorištenje je podatak koji se odnosi na omjer masa pečenih i svježih svinjskih odrezaka. Odresci su prilikom pečenja izgubili na masi jer su izgubili dio vode. Iskorištenje je bilo najmanje pri 220 °C, a najveće pri 120 °C. Iskorištenje blago pada do temperature od 220 °C, te opet blago do krajnje temperature kako se smanjuje vrijeme pečenja što je vidljivo na slici 11. Najmanji gubitak mase je zabilježen pri 120 °C, a najveći pri 220 °C. Postotak iskorištenja se kreće u malom rasponu, od 74,32 do 79,35%.



Slika 11. Kretanje iskorištenja

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata, napravljenih analiza istih te usporedbom s literaturnim podacima, može se zaključiti sljedeće:

1. Od istraživanih heterocikličkih aromatskih amina najzastupljeniji je bio PhIP (2,90 ng/g).
2. Sadržaj ukupnih HCA raste ($p < 0,001$) s povišenjem temperature pečenja. Pri najvišoj temperaturi (280°C) tvori se najviše HCA – 36.50 ng/g.
3. Porast sadržaja HCA s povećanjem temperature nije bio potpuno lineran. Pri nižim temperaturama tvorilo se više MeIQx u odnosu na PhIP, dok se s povišenjem temperature, na temperaturi od 240 °C taj odnos promijenio.
4. Vrijednost ukupnog kreatina se kreće između 9,47 i 10,09 mM/kg. Rezultatima je potvrđena uniformnost mesa.
5. Količina rada potrebna za rezanje komada odreska bila je najniža pri temperaturi od 240 °C (211,5 Ns), a najveća pri temperaturi od 140 °C (277,6 Ns). Količina sile i rada su manje kod 240°C jer se pri toj temperaturi smanji vrijeme termičke obrade.
6. Postotak iskorištenja iznosio je od 74,32 do 79,35%.

6. LITERATURA

Ahn, J., Grün, I. U. (2006) Heterocyclic amines: 2. Inhibitory effects of natural extracts on the formation of polar and nonpolar heterocyclic amines in cooked beef. *J. Food Sci*. **70**, 263-268.

Alaejos, M. S., Afonso, A.M. (2011) Factors that affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods. *Compr. Rev. Food Sci. F*. **10**, 52-108.

Alaejos, M. S., Pino, V., Alfonso, A. M. (2008) Metabolism and toxicology of heterocyclic aromatic amines when consumed in diet: Influence of the genetic susceptibility to develop human cancer. *Food Res. Int*. **4**, 327-340.

Arvidsson, P., Boekel, M.A.J.S., Skog, K., Jägerstad, M. (1997) Kinetics of formation of polar heterocyclic amines in a meat model system. *Journal Food Sci*. **62**, 911-916.

Bordas, M., Monyano, E., Puignou, L., Galceran, M.T. (2004) Formation and stability of heterocyclic amines in meat flavour model system. Effect of temperature, time and precursors. *J. Chromatogr. B.* **802**, 11-17.

Bruas-Reignier, F., Brun-Bellut; J. (1996) Changes affecting the *longissimus dorsi*, *triceps brachii caput longum* and *rectus femoris* muscles of young friesian bulls during meat ageing. *Meat Sci*. **43**, 335-344.

Campo, G., Gallego, B., Berregi, I., Casado, J.A. (1998) Creatinine, creatine and protein in cooked meat products. *Food Chem*. **63**, 187-190.

Cheng, K., Che,n F., Wang, M. (2006) Heterocyclic amines: Chemistry and health. *Mol. Nutr. Food Res*. **50**, 1150-1170.

Felton, J. S., Fultz, E., Dolbeare, F. A., Knize, M. G. (1994) Reduction of heterocyclic aromatic amine mutagens/carcinogens in fried beef patties by microwave pretreatment. *Food Chem. Toxicol*. **32**, 897-903.

Felton, J.S., Jägerstad, M., Knize, M.G., Skog, K., Wakabayashi, K. (2000) Contents in food, beverages and tobacco. U: Food borne carcinogens. Heterocyclic amines. (Nagao, M., Sugimura, T., ured.). John Wiley & Sons, LTD, New York. str. 31-72.

Ferk, F. Huber, W.W., Filipič, M., Bichler, J., Haslinger, E., Mišík, M., Nersesyan, A., Grasl-Kraupp, B., Žegura, B., Knasmüller, S. (2010) Xanthohumol, a prenylated flavonoid contained in beer, prevents the induction of preneoplastic lesions and DNA damage in liver and colon induced by the heterocyclic aromatic amine amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Mutat. Res*. **691**, 17-22.

Gross, G.A., Grüter, A. (1992) Quantitation of mutagegnic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines in food products. *J. Chromatogr. A.* **592,** 271-278.

Harris, R.C., Lowe J.A., Warnes, K., Orme, C.E. (1997) The concentration of creatine in meat, offal and commercial dog food. *Res. Vet. Sci.* **62**, 58-62.

Hwang, D.K., Ngadi, M. (2002) Kinetics og heterocyclic amines formation in meat emulsion at different fat content. *Lebensm. Wiss. Technol*. **35**, 600-606.

IARC (1993) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. < http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56.pdf> Pristupljeno 30.6.2016.

Jackson, L.S., Hargraves,W.A. (1995) Effects of Time and Temperature on the Formation of MeIQx and DiMeIQx in a Model System Containing Threonine, Glucose, and Creatine *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1678–1684.

Jägerstad, M., Skog, K., Arvidsson, P, Solyakov, A. (1998) Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model system and cooked foods. *Z. Lebensm. Unters. F. A.* **207**, 419-427.

Jinap, S., Mohd-Mokhtar, M.S., Farhadian, A., Hasno,l N.D., Jaafar, S.N., Hajeb, P. (2013) Effects of varying degrees of doneness on formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and beef satay. *Meat Sci*. **94**, 202-207.

Johansson, M.A.E., Fredholm, L., Bjerne I., Jägerstad, M. (1995) Influence of frying fat on formation of heterocyclic amines in fried beefburgers and pan residues. *Food Chem. Toxicol*. **33**, 993-1004.

Keating, G.A., Bogen, K.T. (2004)Estimates of heterocyclic amine intake in the US population. *J. Chromatogr. B.* **802**, 127-133.

Keeton, J.T., Eddy, S. (2004) Chemical and physical characteristics of meat. U: Encyclopedia of meat sciences, 1.izd, (Jensen, W.K., Devine, C., Dikeman, M., ured.), Elsevier Ltd. Oxford, str. 210-264.

Kizil, M., Oz F., Besler, H.T. (2011) A review on the formation of carcinogenic/mutagenic heterocyclic aromatic amines. *J. Food Process. Technol*. **2**, 5, doi: 10.4172/2157-7110.1000120.

Knize, M.G., Dolbeare, F.A., Carroll, K.L., Moore, D.H., Felton, J.S. (1994) Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. *Food Chem. Toxicol*. **32**, 595-603.

Knize, M.G., Felton, J.S. (2005) Formation and human risk of carcinogenic heterocyclic aromatic amines formed from natural precursors in meat. *Nutr. Rev.* **63**, 158-165.

Kulier, I. (1994) Hrvatsko-engleski prehrambeni rječnik, Hrvatski farmer, Zagreb.

Le Marchand, L., Hankin, J.H., Pierce, L.M., Sinha, R., Nerurkar, P.V., Franke, A.A., Wilkens, L.R., Kolonel, L.N., Donlon, T., Seifried, A., Custer, L.J., Lum-Jones, A., Chang, W. (2002) Well-done red meat, metabolic phenotypes and colorectal cancer in Hawaii. *Mutat. Res*. **506-507**, 205-214.

Liao, G.Z., Wang, G.Y., Xu, X.L., Zhou, G.H. (2010) Effect of cooking methods on formation of heterocyclic amines in chicken and duck breast. *Meat Sci*. **85**, 149-154.

Messner, C., Murkovic, M. (2004) Evaluation of a new model system for studying the formation of heterocyclic amines. *J. Chromatogr. B*. **802**, 19-26.

Milić, B. Lj., Djilas, S. M., Čanadanović-Brunet, J. M.(1993) Synthesis of some heterocyclic aminoimidazoazarenes. *Food Chem*. **46**, 273-276.

Murkovic, M. (2004) Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. *J. Chromatogr. B.* **802**, 3-10.

Murkovic, M., Steinberger, D., Pfannhauser, W. (1998) Antioxidant spices reduce the formation of heterocyclic amines in fried meat. *Z. Lebensm. Unters. F. A.* **207**, 477-4804.

Nagao, M. (1999) A new approach to risk estimation of food-borne carcinogens – heterocyclic amines – based on molecular information. *Mutat. Res*. **431**, 3-12.

Nagao, M. (2000) Mutagenicity. U: Food borne carcinogens. Heterocyclic amines. (Nagao, M., Sugimura, T. ured.), John Wiley & Sons, LTD, New York, str. 163-196.

Olsson, V. (2004) The effect of the RN^{-} allele and production system on meat quality and the formation of heterocyclic amines in pork. Doctoral thesis. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Food Science, str. 70.

Olsson, V., Skog, K., Lundström, K., Jägerstad, M. (2005) Colour photographs for estimation of heterocyclic amine intake from fried pork chops of different RN genotypes indicate large variations. *Food Qual. Prefer*. **16**, 91-101.

Oz, F., Kaban, G., Kaya, M. (2010) Effects of cooking methods and levels on formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and fish with Oasis extraction method. *Food Sci. Technol*. **43**, 1345-1350.

Oz, F., Kaya, M. (2011) The inhibitory effect of red pepper on heterocyclic aromatic amines in fried beef *Longissimus dorsi* muscle. *J. Food Process. Pres*. **35**, 806-812.

Pais, P., Knize, M.G. (2000) Chromatographic and related techniques for the determination of aromatic heterocyclic amines in foods. *J. Chromatogr. B.* **747**, 139-169.

Pais, P., Salmon, C.P., Knize, M.G. Felton, J.S. (1999) Formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines in dry-heated model system, meat and meat drippings. *J. Agr. Food Chem.* **47**, 1098-1108.

Persson, E., Graziani, G., Ferracan,e R., Fogliano, V., Skog, K. (2003) Influence of antioxidants in virgin olive oil on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers. *Food Chem. Toxicol*. **41**, 1587-1597.

Polak, T., Andrenšek, S., Žlender, B., Gašperlin, L. (2009) Effects of ageing and low internal temperature of grilling on formation of heterocyclic amines in *beef longissimus dorsi* muscle. *Food Sci. Tecnol-Leb.* **42**, 256-264.

Polak, T., Došler D., Žlender, B., Gašperlin, L. (2008) Heterocyclic amines in aged and thermally treated pork *longissimus dorsi* muscle of normal and PSE quality *Food Sci. Tecnol-Leb*. **42**, 504-513.

Randel, G., Balzer, M., Grupe, S., Drusch, S., Kaina, B., Platt, K.-L., Schwarz, K.(2007) Degradation of heterocyclic aromatic amines in oil under storage and frying conditions and reduction of their mutagenic potential. *Food Chem. Toxicol*. **45**, 2245-2253.

Salmon, C.P., Knize, M.G., Felton, J.S. Zhao, B., Seow, A. (2006) Heterocyclic aromatic amines in domestically prepared chicken and fish from Singapore Chinese households. *Food Chem. Toxicol*. **44**, 484-492.

Schut, H.A., Snyderwine, E.G. (1999) Review of DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. **20**, 353-368.

Sentellas, S., Moyano, E., Puignou, L., Galceran, M.T. (2004) Optimization of a clean-up procedure for the determination of heterocyclic aromatic amines in urine by field-amplified sample injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr*. **1032**, 193-201.

Shin, H.S. (2005) Influence of food ingredients on the formation of heterocyclic aromatic amine in cooked pork patties. *Food Sci. Biotechnol*. **14**, 572-575.

Skog, K. (2004) Blue cotton, blue rayon and blue chitin in the analysis of heterocyclic aromatic amines – a review. *J. Chromatogr. B.* **802**, 39-44.

Skog, K., Augustsson, K., Steineck, G., Stenberg, M., Jagerstad, M. (1997) Polar and non-polar heterocyclic amines in cooked fish and meat products and their corresponding pan residues. *Food Chem. Toxicol*. **35**, 555-565.

Skog, K., Eneroth, A., Svanberg, M. (2003) Effects of different cooking methods on the formation of food mutagens in meat. *Int. J. Food Sci. Tech*. **38**, 313-323.

Skog, K., Solyakov, A. (2002) Heterocyclic amines in poultry products: a literature review. *Food Chem. Toxicol*. **40**, 1213-1221.

Skog, K.I., Johansson, M.A.E., Jägerstad, M.I. (1998) Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem. Toxicol*. **36**, 879-896.

Sugimura, T. (1997) Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutat. Res-Fund Mol. M.* **376**, 211-219.

Sugimura, T., Adamson, R.H. (2000) Introduction. U: Food borne carcinogens: Heterocyclic amines. (Nagao, M., Sugimura, T.,ured.), John Wiley & Sons, LTD, Chichester, str. 1-4

Toldrá, F., Reig, M. (2011) Innovations for healthier processed meats. *Trends. Food Sci. Tech*. **22**, 517-522.

Toribio, F., Moyano, E., Puignou, L., Galceran, M.T. (2000) Determination of heterocyclic aromatic amines in meat extracts by liquid chromatography-ion-trap atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **869**, 307-317.

Turesky, R.J. (2007) Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicol. Lett*. **168**, 219-227.

Turesky, R.J. (2008) Heterocylic aromatic amines. U: Process-Induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks. (Stadler, R.H., Lineback, D.R., ured.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, str.75-117.

Turesky, R.J., Lang, N.P., Butler, M.A., Teitel, C.H., Kadlubar, F.F. (1991) Metabolic-activation of carcinogenic heterocyclic aromatic-amines by human liver and colon. *Carcinogenesis.* **12**, 1839-1845.

Turesky, R.J., Vouros, P. (2004) Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine–DNA adducts *in vitro* and *in vivo*. *J. Chromatogr. B*. **802**, 155-166.

Viegas, O., Žegura, B., Pezdri,c M., Novak, M., Ferreira, M.P.L.V.O.I., Pinho, O., Filipič, M. (2012) Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of heterocyclic aromatic amines MeIQx and PhIP in bacteria and in human hepatoma (HepG2) cells. *Food Chem. Toxicol*. **50**, 949-955.

Vitaglione, P., Fogliano, V. (2004) Use of antioxidants to minimize the human heath risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines. *J. Chromatogr. B*. **802**, 189-199.

Wakabayashi, K., Nagao, M., Esumi, H., Sugimura, T. (1992) Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Research*, **52**, 2092-2098.

Wakabayashi, K., Sugimura, T. (1998) Heterocyclic amines formed in the diet: Carcinogeniticy and its modulation by dietary factors. *J. Nutr. Biochem*. **9**, 604-612.

Wakabayashi, K., Ushiyama, H., Takahashi, M., Nukaya, H., Kim, S.B., Hirose, M., Ochiai, M., Sugimura, T., Nagao, M. (1993) Exposure to heterocyclic amines. *Environ. Health. Persp*. **99**, 129-133.

Warzecha, L., Janoszka, B., Blaszczky, U., Strozyk, M., Bodze,k D., Dobosz, C. (2004) Determination of heterocyclic aromatic amines content in samples of household-prepared meat dishes. *J. Chromatogr. B*. **802**, 95-106.

Wyss, M., Kaddurah-Daouk, R. (2000) Creatine and creatine metabolism. *Physiol. Rev*. **80**, 1107-1213.

Yamazoe, Y., Zenser, T.V., Miller, D.W., Kadlubar, F.F. (1988) Mechanism of formation and structural characterization of DNA adducts derived from peroxidative activation of benzidine. *Carcinogenesis*. **9**, 1635-1641.

Zöchling, S., Murkovic, M., Pfannhauser, W. (2002) Effects of industrially produced flavours with pro- and antioxidative properties on the formation of the heterocyclic amine PhIP in a model system, *J. Biochem. Biophys. Method.* **53**, 37–44.

7. PRILOZI

7.1. POPIS KORIŠTENIH KRATICA

AαC	2-amini-9H-pirido [2,3-b]indol
AIA	aminoimidazo – azareni
DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-*f*]kinoksalin
DMIP	2-amino-1,5-4dimetilimidazo[4,5-b]piridin
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
Glu-P-1	2-amino-6-metildipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
Glu-P-2	2-aminodipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
Harman	9-metil-9-(4'-amino-fenil)-9-H-pirido [3,4-b] indol
HCA	heterociklični aromatski amini
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High Performance Liquid Chromatography)
HPLC/MC	tekućinska kromatografija povezana s masenom sprektrometrijom
IARC	Mednarodna agencija za istraživanje raka (engl. International Agency for Research on Cancer)
IQ	2-amino-3metilimidazo[4,5-f]kinolin
IQx	2-amino-3metilimidazo[4,5-f]kinoksalin
LC-MC	tekućinska kromatografija/maesna spektrometrija
MeAαC	2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3-b]indol
MeIQ	2-amino 3,4dimetilimidazo[4,5f]kinolin
MeIQx	2-amino-3,8dimetilimidazo[4,5f]kinoksalin
Norharman	9-(4'-amino-fenil)-9-H-pirido [3,4-b] indol
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridin
SIR	engl. Selected Ion Recording
SPE	ekstrakcija na tvrdoj fazi (engl. Solid Phase Extraction)
TriMeIQx	2-amino-3,4,7,8-tetrametilimidazo[4,5-*f*]kinoksalin
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol
Trp-P-2	3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol
7,8-DiMeLQx	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo [4,5-f] kinoksalin
4,8-DiMeLQx	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo [4,5-f] kinoksalin