

ETUDE DE RELATIONS ENTRE LE BLOCAGE DU NITRITE ET LA PRODUCTION DE NITROSAMINES ET TENTATIVE D'EXPLICATION

A. FROUIN, Françoise LACOUR, J. BAZILE, J-P. BIDARD, Danièle JONDEAU.

SOCIETE OLIDA, Service de Recherches, 50, rue Raspail, 92304, LEVALLOIS-PERRET - FRANCE

=====

Nous avons précédemment étudié l'état du nitrite dans les produits carnés (FROUIN et coll.1975 et 1976), puis les lois de blocage de celui-ci par certains composés simples et leurs répercussions globales sur la production de nitrosamines, en milieu aqueux pur (FROUIN et coll.1978). Nous reprenons, ici, l'étude de l'interférence entre le blocage du nitrite et la production de nitrosamines de façon plus précise, pour approcher les mécanismes qui nous permettront d'entraver la production de nitrosamines.

Cette étude est basée sur une exploitation plus fine des résultats de 1978 et sur de nouvelles séries expérimentales plus précises, grâce à des améliorations de nos conditions expérimentales.

Conditions expérimentales

En 1978, nous avons étudié l'incidence des acides acétylneuraminique, galacturonique, lactique, gallique, de la sarcosine, du glutathion, de l'ascorbate, de la cystéine et du glycérol sur la production de diéthyl et diméthylnitrosamine en milieu aqueux pur, régulé à pH 6 par Na OH ou Cl H. Le milieu contenait de l'eau; 50, 100, 500 ou 1.000 mg/l de NO<sub>2</sub> Na, l'une des amines et éventuellement l'un des bloquants. A chaque essai correspondait un témoin de même composition sans le bloquant. Les nitrosamines avaient été dosées en gaz chromatographie selon TELLING.

La nouvelle série expérimentale ajoutée à la précédente reprend le même principe. Mais elle porte exclusivement sur les incidences du glutathion, de la cystéine et de l'ascorbate. 3 % de Na Cl ont été ajoutés pour éliminer les effets de Na OH ou de Cl H nécessaires pour réguler le pH à 6. Les milieux ont été incubés 48 h à 65° C pour produire les nitrosamines. Celles-ci ont été dosées comme précédemment et, de plus, par photolyse. Chaque essai a été répété 4 à 7 fois. Les essais n'ont porté que sur la diéthylnitrosamine, en présence de 500 et 1.000 mg/l de NO<sub>2</sub> Na.

Dosage par photolyse

Cette technique a l'avantage d'être spécifique.

Mettre dans une ampoule à décanter 5 ml de l'échantillon à analyser, 100 ml d'eau bidistillée, 25 g de Na Cl, 60 ml de dichlorométhane.

Agiter violemment et récupérer le dichlorométhane dans un Kuderna Danish jaugé à 3 ml, en passant sur un filtre rempli de Na<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> anhydre.

Introduire à nouveau 60 ml de dichlorométhane dans l'ampoule à décanter, agiter, puis les récupérer comme ci-dessus dans le Kuderna.

Concentrer, à 60° C, la solution de dichlorométhane à 3 ml.

Photolyser 1 ml selon la technique suivante :

Dans un tube de quartz se bouchant à l'èmeri mettre ce ml de solution à analyser, et 5 ml de méthanol alcalin ( 4 g Na OH sec + 20 ml H<sub>2</sub> O + Q.S.P. méthanol pour 1.000 ml ). Photolyser au temps optimum (lampe Philips TUV 15 ( 15 w à 254 nm ) - (exposition 20 mn dans notre dispositif ).

Effectuer un dosage de GRIESS en comparaison d'un témoin placé dans le même milieu, non photolysé, puis se reporter à la courbe d'étalonnage. Le rendement est de 100 % jusque vers 10 % de DENA, et tombe vers 90 % à 30 %.

Résultats

Les résultats de 1978 ont été réexploités de la façon suivante : comme les témoins, de composition identique, donnaient des résultats variables d'un jour à l'autre, nous avons calculé sur l'ensemble de ceux-ci la relation la plus probable entre la production de nitrosamines et la quantité de nitrite. Nous avons obtenu, ainsi, une corrélation de type linéaire.

Nous avons, ensuite, établi un facteur correctif amenant, pour chaque jour, la moyenne des témoins sur cette droite, et nous avons appliqué le même facteur correctif aux essais de ce jour ( Tableau 1 ).

Dans la seconde série expérimentale effectuée selon le nouveau protocole, la méthode de TELLING et la photolyse donnent des résultats statistiquement équivalents, ce qui confirme que nous avons bien dosé la DENA seule, et assez réguliers pour n'effectuer aucune correction ( Tableau 2 ).

Exploitation des résultats

L'étude des relations entre les taux de nitrosamines, de nitrite et l'influence des bloquants du nitrite et de l'oxyde d'azote a été faite sur calculateur.

Nous avons écrit l'ensemble des équations d'équilibre des composés en présence ( FROUIN et coll.1975 ) et donné au calculateur les systèmes de résolution de ces équations.

Les résultats ont été jugés statistiquement par corrélation globale et par le test de STUDENT FISHER sur les pentes des droites de production de nitrosamines comparées au témoin.

Les meilleurs résultats sont obtenus en supposant que le blocage du nitrite se fait sous forme de complexes de l'oxyde d'azote.

Les résultats sont résumés graphiquement dans les figures 1 à 3.

Discussion

L'effet de la sarcosine, de l'imidazole et probablement de l'acide acétylneuraminique s'explique quantitativement par leur action de blocage de l'oxyde azotique.

Par contre, l'ascorbate, la cystéine et l'acide gallique ralentissent la formation de nitrosamines plus que ne le laisse prévoir leur capacité de blocage de cet oxyde ( ou du nitrite ) ( P = 0,000 à 0,006 )

La production de nitrosamines est, pour la sarcosine d'environ moitié, pour la cystéine du quart et pour l'ascorbate de 1/10 de ce que laisse prévoir le taux de NO libre.

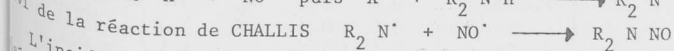
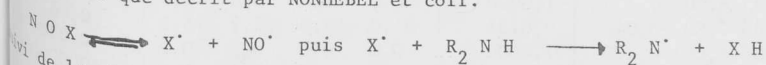
Par opposition, le glutathion et l'acide galacturonique ralentissent moins la production de nitrosamines que ne le laisse prévoir le calcul ( $P = 0,000$  à  $0,001$ ). Cet effet de catalyse sur le taux résiduel de NO libre correspond à un facteur d'environ 2 pour l'acide galacturonique et 15 pour le glutathion.

L'effet de blocage de l'oxyde azotique est incontestable, mais il ne peut suffire à tout expliquer. Il vient s'y ajouter un effet catalyseur ou anticatalyseur au sein même de la réaction de formation de nitrosamines.

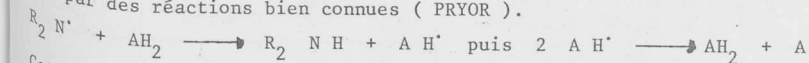
Cet effet ne peut pas être conçu au sein d'une réaction ionique, car les teneurs ioniques sont fonction des composés présents, de leurs équations d'équilibre, du pH et du potentiel Red ox, tous pris en compte dans les calculs précités sans pour autant arriver à une explication totale des phénomènes observés : nous devons leur ajouter un facteur d'activité, constant pour chaque corps qui conduit à l'explication totale des observations.

Nous devons donc envisager une réaction de formation de nitrosamines en milieu aqueux, de type radicalaire. Il y a tout lieu de penser que cette réaction n'est pas différente de celle donnée par CHALLIS pour les milieux apolaires tout à fait conforme à la structure radicalaire naturelle de NO.

L'effet catalyseur des sels NOX, démontré par BOYLAND, correspond alors à un transfert radicalaire classique tel que décrit par NONHEBEL et coll.

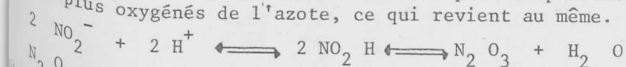


L'incidence résiduelle des réducteurs radicalaires comme l'acide ascorbique s'explique alors très facilement par des réactions bien connues (PRYOR).



Cette réaction peut s'effectuer identiquement sur le radical oxydant initial  $\text{X}^\cdot$

Nous retrouvons aussi le schéma classique (MIRVISH) de taux de nitrosation proportionnel au carré du taux de nitrite, en y incluant les travaux de MOTTRAM en milieu apolaire qui montrent l'absence de nitrosation par NO pur, et la nitrosation rapide en présence de celui-ci et d'une trace d'oxygène, ou d'oxydes plus oxygénés de l'azote, ce qui revient au même.



$\text{N}_2\text{O}_3 \rightleftharpoons \text{NO}^\cdot + \text{NO}_2^\cdot$  comparable à un sel NOX, peu actif en milieu aqueux à cause de la reversibilité des réactions de formation et de l'ionisation parasite  $\text{N}_2\text{O}_3 \rightleftharpoons \text{NO}^+ + \text{NO}_2^-$

stable pour tous les sels NOX.

## CONCLUSION

Pour rendre compte des phénomènes observés, il nous semble nécessaire de voir l'action du nitrite sur les amines au travers de deux étapes liées à la composition du milieu.

Dans une première étape, le nitrite est partiellement bloqué sous forme de complexes nitrosés par les composants du milieu, tel que, par exemple, l'ascorbate.

Ces blocages obéissent aux lois quantitatives simples de la chimie classique.

Ensuite, le NO resté libre et les amines vont interagir au sein d'une réaction radicalaire pour conduire à la formation de nitrosamines :  $\text{NO}^\cdot + \text{R}_2\text{N}^\cdot \longrightarrow \text{R}_2\text{NNO}$

Cette réaction est catalysée par les radicaux de type oxydant qui sont capables de déshydrogéner l'amine selon le schéma



Cette réaction est, au contraire, freinée par les radicaux réducteurs qui hydrogènent l'amine radicalisée, et tout particulièrement par ceux qui, tel l'acide ascorbique, désamorcent finalement la chaîne radicalaire.

Par ailleurs, conformément aux travaux de CASSENS, une interface lipidique qui favorise les réactions radicalaires, favorise la formation de nitrosamines, par passage des oxydes de l'azote en phase grasse (MOUTEFONGEA-MOTTRAM).

On notera que le schéma de réaction précité est, du point de vue fondamental, très proche de celui concernant la peroxydation des lipides. Il faut donc s'attendre à un effet "antin nitrosamine" pour la présence de radicaux réducteurs, phénomène déjà démontré pour certains d'entre eux (ascorbate et ses dérivés, tocophérol, notamment).

Travaux aidés par la D G R C T - Contrat 77.7.0093 et 94.

TABLEAU I : RESULTATS DE 1978 CORRIGES ET CONSTANTES DE CALCUL DES EQUILIBRES DU NITRITE

Résults of 1978 corrected and constants for nitrite equilibrium calculation

50 - 100 - 500 1000=mg NO <sub>2</sub> Na/1	Taux de nitrosamines corrigés				M i l i e u		Constante blocage NO	% blocage NO <sub>2</sub> Na				Concent.Molé. Bloquant
	50	100	500	1000	pH	volt.		50	100	500	1000	
<b>D E N A</b>												
ACID.ACET.NEURAM.		24	672	1305	6,00	0,430	0,0018	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0324
SARCOSINE	31	57	270	455	6,00	0,430	0,3800	2,5	2,0	1,0	1,5	0,1124
AC.GALACTURONIQUE	52	103	506	868	6,35	0,360	0,0466	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0472
GLUTATHION	19	48	253	493	5,00	0,250	0,0014	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0329
ASCORBATE		0	19	122	5,40	0,080	0,0193	91,5	91,5	90,0	53,0	0,0505
CYSTEINE	0	0	74	130	7,80	-0,047	0,0196	61,0	48,0	22,5	16,5	0,0826
GLYCEROL	47	180			3,50	0,600	1,0000 (1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0000 (1)
GLUTATHION	8	24			5,00	0,250	0,0014	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0329
ACID.LACTIQUE	63	127			6,00	0,400	1,0000 (1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0000 (1)
ACID.GALLIQUE	16	22	125	219	6,00	0,233	1,0000 (1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0000 (1)
CYSTEINE	6	13	48	146	7,80	-0,047	0,0196	61,0	48,0	22,5	16,5	0,0826
ACID.GALLIQUE	7	80	338	590	6,00	0,400	1,0000 (1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0000 (1)
IMIDAZOLE		31	277	719	5,80	0,410	1,0000 (1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1124
SARCOSINE	29	33	293	795	6,00	0,430	0,3800	2,5	2,0	1,0	1,5	0,0505
ASCORBATE	9	15	59	244	5,40	0,080	0,0193	91,5	91,5	90,0	53,0	0,0472
ACID.GALACTURON.	86	70	598		6,35	0,360	0,0466	0,0	0,0	0,0	0,0	
<b>D M N A</b>												
ACID.ACET.NEURAM.		151	1380	1850	6,00	0,430	0,0018	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0324
SARCOSINE	123	165	705	1150	6,00	0,430	0,3800	2,5	2,0	1,0	1,5	0,1124
AC.GALACTURON.	124	216	149	940	6,35	0,360	0,0466	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0472
GLUTATHION	117	382	1342	1792	5,00	0,250	0,0014	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0329
ASCORBATE	164	138	355	722	5,40	0,080	0,0193	91,5	91,5	90,0	53,0	0,0505
CYSTEINE	30	19	123	236	7,80	-0,047	0,0196	61,0	48,0	22,5	16,5	0,0826
GLYCEROL	100	71			3,50	0,600	1,0000 (1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0000 (1)
GLUTATHION	22	46			5,00	0,250	0,0014	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0329
ACID.LACTIQUE	129	258			6,00	0,400	1,0000 (1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0000 (1)
ACID.GALLIQUE	106	100	534	850	6,00	0,233	1,0000 (1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0000 (1)

(1) : valeurs traduisant l'absence de blocage dans notre calcul par l'ordinateur

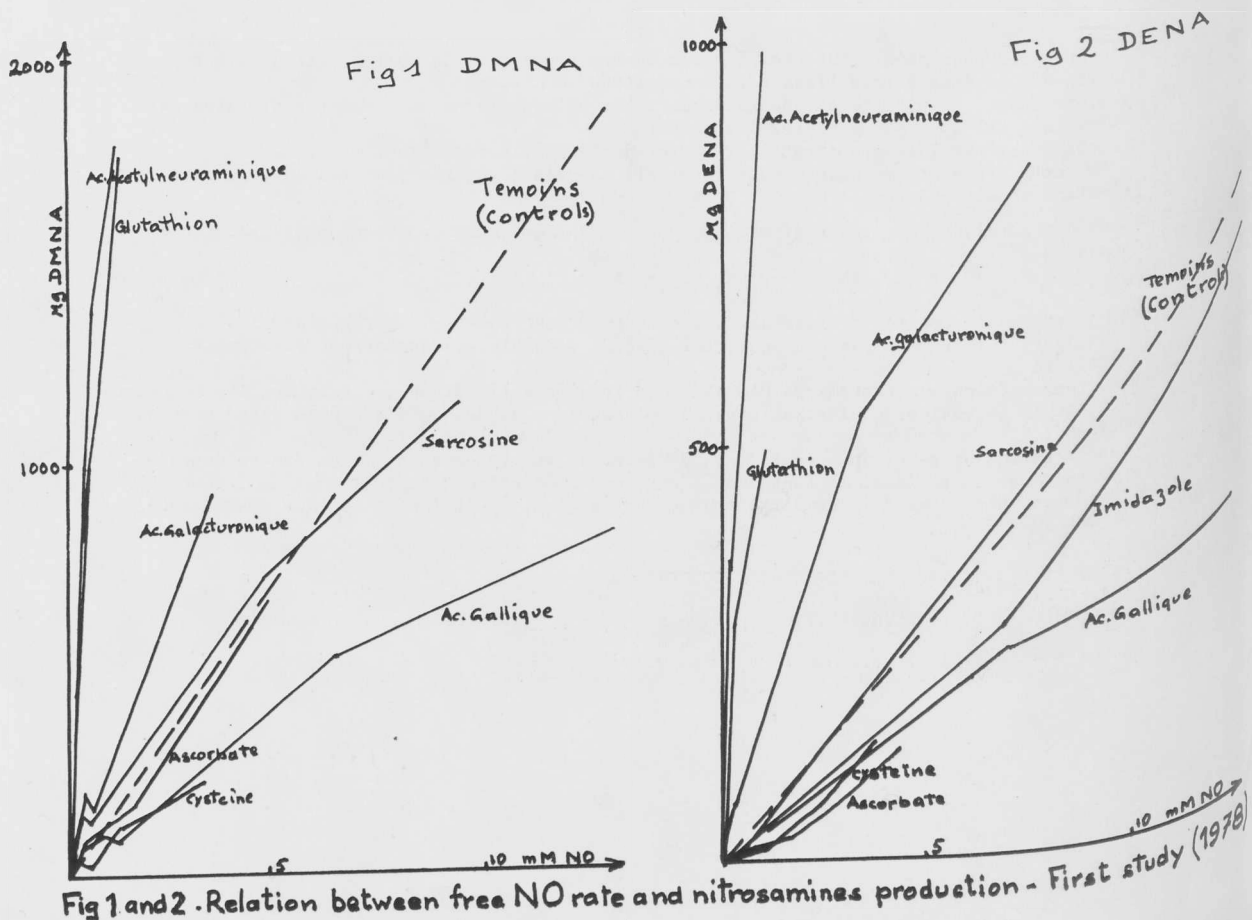


Fig 1 and 2 - Relation between free NO rate and nitrosamines production - First study (1978)

TABLEAU 2 : Nouvelle série : production de DENA en présence de 3% de Cl Na en 48h à 65° C à pH 6

N	Chromatographie		Photolyse		
	Moyenne x	Ecart-type	Moyenne x	Ec.type	
500	7	695,74	127,95	735,43	80,19
500	7	18,43	9,68	28,29	35,28
1000	7	1363,80	267,84	1574,57	303,48
1000	7	56,14	26,25	47,14	49,89
500	5	604,23	118,92	752,40	100,09
500	5	35,33	12,93	39,6	36,15
1000	5	1142,97	189,36	1557,60	380,86
1000	5	68,61	10,72	79,20	29,52
500	5	735,46	154,03	910,80	118,06
500	5	515,28	131,31	726,00	306,03
1000	4	1429,74	161,87	1897,50	165,00
1000	4	1310,40	87,87	1551,00	255,62

(\*)  
500= 500 mg/l NO<sub>2</sub> Na  
1000= 1000 mg/l NO<sub>2</sub> Na

Confirmation study : DENA production with 3% ClNa, in 48h, at 65°C and pH 6.

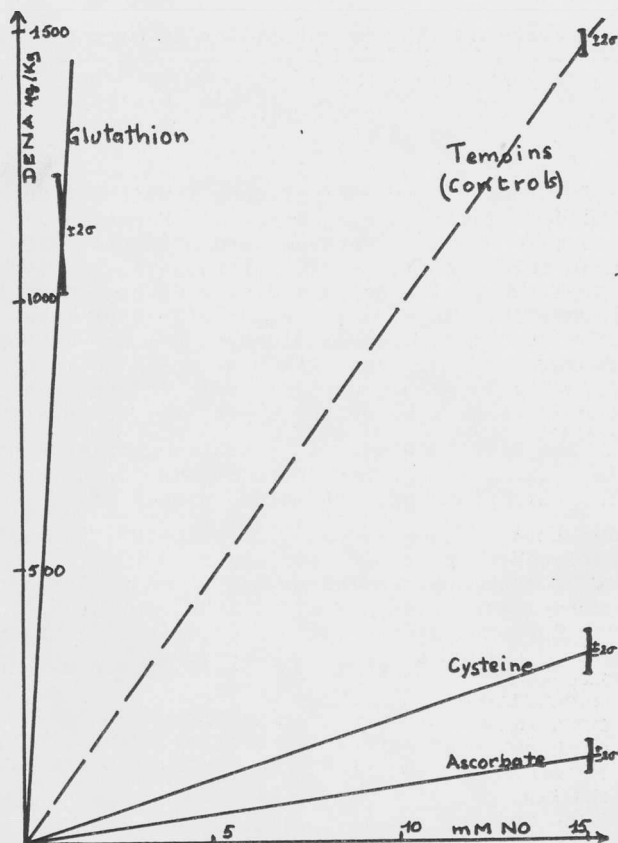


Fig 3. Relation between free NO rate and DENA production with 3% ClNa-Confirmation study

#### BIBLIOGRAPHIE

- RYLAND E. The Effect of some ions of physiological interest on nitrosamine synthesis 1972, IARC, Scientific publications n°3, p.124
- RYLAND E.; WALKER S.A. Thiocyanate catalysis of nitrosamine formation and some dietary implications 1974, IARC, Scientific publications n°9, p.132
- RYLAND E.; WOOLF A.S. Effect of thiocyanate on nitrite estimations and the cleavage of nitrosamines 1976, IARC, Scientific publications n°14, p.161
- CASSENS R.G.; GREASER M.L.; ITO T.; LEE M. Reactions of nitrite in meat, 1979, Food Technol. July, 46-57
- CASSENS R.G.; ITO T.; LEE M. Morphology of bacon and its possible role in formation of nitrosamines, 1979, J. of Fd. Sci. n° 44, p.306
- HALLIS B.C.; OSBORNE M.R. The chemistry of nitroso-compounds Part. VI-Direct and indirect transnitrosation reactions of N-nitrosodiphenylamine, 1973, J.C.S. Perkin II, p.1526
- HALLIS B.C.; EDWARDS R.R.; HUNNA S.A.; KYRTOPOULOS S.A.; OUTRAM J.R. Rapid formation of N-nitrosamines from nitrogen oxides under neutral and alkaline conditions, 1978, IARC, Scientific publications n° 19
- RYLAND E.; JONDEAU D.; THENOT M. Etude sur l'état et la disponibilité du nitrite dans les produits de viande, 1976, 22ème Eur. Meat. Res. Work. (BERNE)
- RYLAND E.; THENOT M. Etat du nitrite dans les produits de viande, 1976, 22ème Eur. Meat. Res. Work. (MALMO)
- RYLAND E.; BAZILE J.; JOANNES M. Etude sur la fixation de l'oxyde azotique et la formation de nitrosamines, 1978, 24ème Eur. Meat. Res. Work. (KULMBACH)
- RYLAND E.; CASSENS R.G.; WOOLFORD G. Distribution of sodium nitrite in adipose tissue during curing, 1977, J. of Food Sci. vol. 42, p.1637
- RYLAND E.; CREWS C.; DAVIES R.; McWEENY D.J. A study of competitive nitrosations of pyrrolidine, ascorbic acid, cysteine and p-cresol in a protein-based model system, 1978, J. Sci. Food Agric. 29, p.815-21
- CASSENS W.J.; KAMM J.J.; NEWMARK H.L.; FIDDLER W.; PENSABENE J. Alpha-tocopherol: uses in preventing nitrosamine formation, 1978, IARC, n°19, p.199
- RYLAND E.S. Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics and in vivo occurrence, 1975, Toxicology and applied pharmacology, 31, p.325-51
- RYLAND E.; MAYRHOFER O.L.; HALLEMAYER E. Possible mechanisms of nitrosamine formation in food and animal feeding stuffs 1974, IARC, Scient. publ. n°9, p.142
- RYLAND E.S. Increased N-nitrosamine formation in model fat systems containing sodium ascorbate, 1976, Proc. 2nd Symp. Nitrite Meat prod. ZEIST, p.135
- RYLAND E.S.; PATTERSON R.L.S. The effect of ascorbate reductants on N-nitrosamine formation in a model system resembling bacon fat, 1977, J. of the Sci. of Food and Agric. 28, 4, 352-4
- RYLAND E.S.; WALTON J.C. Free Radicals chemistry, 1974, Cambridge University Press, ISBN : 0-521-201-49-7
- RYLAND E.S.; TEDDER J.M.; WALTON J.C. Radicals, 1979, University Press Cambridge, ISBN 0-521-22004-1
- RYLAND E.S.; DONALDSON B. The effect of ascorbic acid and glutathione on the formation of nitrosopiperazines from piperazine adipate and nitrite 1974, IARC n° 9, p.103
- RYLAND E.S.; WISHNOK J.S.; HOVIS J.S.; BISHOP W.W. N-nitroso compounds from the reaction of primary amines with nitrite and thiocyanate, 1978, IARC Scientific publications n° 19
- RYLAND E.S. A gas-liquid chromatographic procedure for the detection of volatile N-nitrosamines at the ten parts per billion level in foodstuffs after conversion to their corresponding nitramines, 1972, J. Chromat. 73, p.79-87