

ZNANSTVENO MIŠLJENJE

o riziku od nitrata iz povrća

Donositelj znanstvenog mišljenja (sukladno članku 7. st. 3. ovoga Pravilnika)

(Zahtjev HAH-Z-2016-2.)

Usvojeno 08. studenog 2016.

ZNANSTVENO MIŠLJENJE IZRADILI:

Dr.sc. Sanja Miloš, Hrvatska agencija za hranu

Dr.sc. Brigita Hengl, Hrvatska agencija za hranu

Leonard Matijević, mag. nutr., Hrvatska agencija za hranu

ZNANSTVENO MIŠLJENJE IZDANO JE UZ SUGLASNOST ZNANSTVENOG ODBORA ZA KEMIJSKE OPASNOSTI U SASTAVU:

Prof.dr.sc. Jasna Bošnjir, Zavod za javno zdravstvo, „Andrija Štampar“, predsjednica ZO

Prof. dr.sc. Tomislav Klapac, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek

Prof.dr.sc. Helga Medić, Prehrambeno biotehnološki fakultet, Zagreb

Izv.prof.dr.sc. Jelka Pleadin, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Prof. dr.sc. Zdravko Špirić, Institut za primijenjenu ekologiju „Oikon“, Zagreb

SAŽETAK

Nitrati su spojevi koji se u prirodi pojavljuju kao dio ciklusa dušika u sustavu tlo-biljka-atmosfera i imaju važnu ulogu u ishrani i funkcioniranju biljaka. U prirodi se nitrati pretvaraju u nitrite i obrnuto. Dušik koji se u tlo unosi primjenom gnojiva sudjeluje u mnogim biološkim procesima i može biti asimiliran putem mikroorganizama tvoreći tako oblike hranjivih tvari koje su na raspolaganju biljkama nakon procesa mineralizacije organske tvari. Visoke razine nitrata u tlu su u korelaciji sa njihovim većim sadržajem u listovima zelenih biljaka dok je u sjemenkama i gomoljima njihov sadržaj niži. Dodatno, nitrati i nitriti su lako topivi u vodi i pokretljivi u okolišu te se mogu naći u vodotocima, a time i vodi za piće. Kao prehrambeni aditivi, nitrati i nitriti imaju široku primjenu i u mesnoj industriji jer poboljšavaju kvalitetu, trajnost i sigurnost proizvoda, posebice zbog inhibicije rasta i razmnožavanja bakterija.

Nitrati sami po sebi pokazuju vrlo malo toksično djelovanje za ljudski organizam, no njegovi metaboliti i produkti reakcija (npr. nitrozoamini) u probavnim organima mogu predstavljati zabrinutost za zdravlje. Unos nitrata kod ljudi uglavnom se odvija probavnim traktom konzumacijom voća, povrća, mesa i pitke vode. Prema Europskoj agenciji za sigurnost hrane - EFSA (2008), putem povrća i voća se unosi od 11 do 41 % dnevnog unosa nitrata. Iako je povrće jedno od glavnih izvora nitrata, zbog dokazane dobrobiti za zdravlje, unos različitog povrća se uvelike preporuča. Svjetska zdravstvena organizacija – WHO (2003b) preporuča dnevni unos povrća zajedno s voćem u količini od 400 g, podijeljeno u više obroka. Na razini Europske unije najveće dopuštene količine (NDK) nitrata u povrću propisane su Uredbama Komisije (EZ) br. 1881/2006 i 1258/2011 za svježi, prerađeni i duboko smrznuti ili smrznuti špinat, svježju zelenu salatu (*Lactuca sativa* L.), zelenu salatu sorte „Iceberg“, rukolu te prerađenu hranu na bazi žitarica i hranu za dojenčad i malu djecu.

Hrvatska agencija za hranu (HAH) je tijekom 2012. i 2013. godine provela istraživanje na području četiri grada u RH (Zagreb, Osijek, Rijeka, Split) o prisutnosti nitrata u različitim vrstama povrća čija je najveća dopuštena količina propisana zakonom (špinat, salata, rukola), ali i onim vrstama koje nemaju propisane vrijednosti (kelj, blitva, kupus, brokula, celer, hren, koraba). Niti jedan uzorak nije bio iznad NDK. Kako bi se procijenio rizik od nitrata iz različitih vrsta povrća na tržištu, za sve dobivene rezultate napravljena je procjena izloženosti u odnosu na njihov prihvatljiv dnevni unos (engl. *Acceptable daily intake*, ADI) od 0 do 3,7 mg/kg tjelesne mase. Za izračun procjene izloženosti je korišten računalni model „Improrisk“ (Improvast, 2016), koji je kombinirao podatke dobivene iz neobjavljene studije HAH-a o prehrambenim navikama stanovništva RH, te podatke o količinama nitrata dobivenih ovim istraživanjem. Procjenom izloženosti utvrđeno je kako u 0,4 % populacije konzumenata dolazi do prekoračenja toksikološke granice (ADI-a), iako vrijednosti nitrata nisu prelazile zakonski propisan NDK. Konzumacija povrća obuhvaćenog ovim istraživanjem temelj je prehrane koja tijelu osigurava optimalan unos kalorija, vitamina, minerala i tekućine, te optimalan omjer bjelancevina, ugljikohidrata i masti. Zadovoljavanje potreba organizma za gradivnim, energetske i zaštitnim tvarima, u ovom slučaju ima veću vrijednost nego štetni utjecaj od nitrata.

KLJUČNE RIJEČI

Nitrati, povrće, procjena izloženosti, sigurnost hrane

SUMMARY

Nitrates are the compounds that occur in nature as part of the nitrogen cycle, in the soil-plant-atmosphere system and play important role in the nutrition and functioning of plants. Nitrates are naturally converted into nitrites and vice versa. Nitrogen which enters in the soil by application of fertilizers participate in many biological processes and may be assimilated by microorganisms, creating a form of nutrients available to the plants after the organic substances mineralization process. High levels of nitrate in the soil are in the correlation with their higher content in the leaves of green plants and in seeds and tubers the content is lower. Furthermore, nitrates and nitrites are easily soluble in water, mobile in the environment and can be found in waterways and therefore in drinking water. As food additives, nitrates and nitrites are widely used in the meat industry to improve quality, durability and safety of the product, in particular inhibit the bacterial growth and reproduction.

Nitrates themselves have relatively low toxicity to the human body, but their metabolites and reaction products (eg. nitrosamines) in the digestive tract can pose health concerns. Intake of nitrate in humans usually occurs through digestive tract by eating fruits, vegetables, meat and drinking water. According to the European Food Safety Authority - EFSA (2008) vegetables and fruits contribution in daily intake of nitrates range between 11 % to 41 %. Although the vegetables are one of the main sources of nitrates, because of their proven health benefits, intake of various vegetables are highly recommended. The World Health Organization - WHO (2003b) recommended daily intake of vegetables and fruits of 400 g splitted into several servings. On the EU level, maximum levels (ML) of nitrates in vegetables are laid down in Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 and 1258/2011 for fresh, processed and deep frozen spinach, fresh lettuce (*Lactuca sativa* L.), lettuce varieties "Iceberg", rucola, processed cereal-based foods and foods for infants and young children.

Croatian Food Agency (CFA) during 2012 and 2013, conducted a survey in four Croatian cities (Zagreb, Osijek, Rijeka, Split) on the presence of nitrates in various types of vegetables whose MLs are prescribed by regulations (spinach, lettuce, rucola), but also in those types which don't have regulated MLs (kale, chard, cabbage, broccoli, celery, horseradish, kohlrabi). There were no samples with content of nitrates above the maximum levels. In order to assess the risk of nitrates from different types of vegetables in the market and in relation to their acceptable daily intake (Eng. Acceptable Daily Intake, ADI) from 0 to 3,7 mg/kg body weight, for all results an assessment of exposure was conducted. To calculate the exposure assessment, a computer model "Improrisk" (Improvast, 2016) was used. The model combined data from unpublished CFA's study on dietary habits of the population in Croatia and data for occurrence of nitrates obtained by this survey. Exposure assessment determined that although the value of nitrates did not exceed the legally prescribed maximum level, 0,4% of Croatian consumers exceed toxicological limits (ADI).

Consumption of vegetables included in this research is the foundation of the diet that provides optimum intake of calories, vitamins, minerals and fluids, and the optimal ratio of protein, carbohydrates and fats in human body. Satisfying the needs of the human body in relationship to building, energy and protective substances, in this case, has a higher value than the harmful effects of nitrates.

KEY WORDS

Nitrates, vegetables, exposure assessment, food safety

ZAHVALE

Hrvatska agencija za hranu zahvaljuje svim članovima Znanstvenog odbora na doprinosu u izradi ovog znanstvenog mišljenja.

SADRŽAJ

SAŽETAK	2
SUMMARY	3
CILJ ISTRAŽIVANJA	6
UVOD	6
PROCJENA RIZIKA	8
1. Identifikacija opasnosti	8
1.2 Faktori koji utječu na količinu nitrata u biljkama	8
1.3 Uzorkovanje i metode analize	10
1.3.1 Uzorci	10
1.3.2 Uzorkovanje	10
1.3.3. Analitički parametri i metode	11
1.3.4 Priprema uzorka	12
1.3.5 Rezultati analize	12
RASPRAVA	16
2. Karakterizacija opasnosti	16
2.1 ApSORPCIJA, distribucija, metabolizam i ekskrecija – ADME	16
2.2 Toksičnost	17
2.2.1 Akutna toksičnost	17
2.2.2 Kronična toksičnost; karcinogenost	18
2.2.3 Genotoksičnost	18
2.2.4 Methemoglobinemija	18
3. Procjena izloženosti	20
4. Karakterizacija rizika	24
ZAKLJUČCI	25
PREPORUKE	25
DOKUMENTACIJA DOSTAVLJENA HAH-U	25
LITERATURA (REFERENCE)	26

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je utvrditi količine nitrata u povrću za koje su zakonski propisane najveće dopuštene količine (NDK), salata, špinat i rukola, te osobito u ostalim vrstama povrća koje također mogu biti izvori nitrata u hrani, a za koje nije propisana NDK, kao što su kelj, blitva, kupus, koraba, komorač, hren, brokula i celer. Na temelju dobivenih rezultata, napraviti će se procjena izloženosti i karakterizacija rizika.

UVOD

Gotovo 80 % zemljine atmosfere sastoji se od dušika kao najzastupljenijeg kemijskog elementa. Dušik je ključna komponenta esencijalnih biomolekula poput aminokiselina, vitamina, hormona, enzima i nukleotida. U živim tkivima, dušik je zastupljen kao četvrti najčešći element, iza ugljika, kisika i vodika. Sastavni je dio ciklusa dušika, u kojem se kontinuirano vrši izmjena dušika između organizama i okoliša. Nitrati su soli dušične kiseline i sadrže tri kisikova atoma i u prirodi se pretvaraju u nitrite i obratno. Nitriti sadrže dva atoma kisika.

Nitrati su prisutni u okolišu i stoga se mogu pronaći u zraku, hrani (najviše u voću i povrću) i vodi. Njihova prisutnost je rezultat tzv. kruženja dušika u prirodi u kojem bakterije koriste dušik iz nitrata za sintezu proteina u biljkama. Također, nitrati se koriste kao hranjiva u poljoprivredi te kao aditivi u hrani. Osim u okolišu, u probavnom sustavu ljudi mikroorganizmi dovode do pretvorbe nitrata u nitrite.

Ljudi su nitratima izloženi prvenstveno putem prehrane i to najviše iz povrća, konzerviranog mesa i vode za piće. Prema AESAN-u (2011) povrćem se unese 80 – 85 % od ukupne dnevne unesene količine nitrata, iako unos nitrata ovisi i o drugim faktorima kao što su prehrambene navike te zemljopisni položaj (JECFA, 1995.). Sadržaj nitrata u povrću kreće se u širokom rasponu (1 - 10 000 mg/kg) te ovisi o vrsti, podrijetlu, načinu uzgoju i uvjetima skladištenja povrća (JECFA, 1995). Visoke koncentracije nitrata mogu se pronaći u rukoli, svim vrstama zelene salate i špinatu (**Tablica 1**).

S druge strane, količine nitrita u svježem voću i povrću su puno niže (1 - 20 mg/kg) te se smatra da je glavni izvor nitrita endogena pretvorba iz nitrata (Thomson, 2004; Greer i Shannon, 2005; EFSA, 2008). Nitrati su prošli niz procjena od strane Zajedničkog FAO/WHO stručnog odbora za prehrambene aditive (JECFA) (JECFA, 1995, 2002, 2003), Znanstvenog odbora za hranu (SCF) (OVS, 1992) i Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) (EFSA 2008, 2010). Procjena EFSA-e (2008) o rizicima koji proizlaze iz prisutnosti nitrata u povrću uzela je u razmatranje različite scenarije izloženosti, obrasce potrošnje i količine nitrata u nekoliko vrsta povrća. Rezultati su pokazali kako je kritični element izloženosti vrsta povrća i količina nitrata u njima, a ne količina povrća koja se konzumira.

Tablica 1. Količina nitrata u lisnatom povrću (EFSA, 2008)

Vrsta povrća	Prosječna količina (mg/kg)	Vrsta povrća	Prosječna količina (mg/kg)
Rukola	4677	Belgijska endivija	1465
Amarant	2167	Zelena salata	1324
Matovilac	2104	Rimska salata	1105
Miješana salata	2062	Špinat	1066
Puterica	2026	Salata kristalka	875
Cikla	1852	Maslačak (listovi)	605
Blitva	1690	Endivija	523
Kovrčava salata	1601	Radič	355
Salata „Hrastov list“	1534	Dragušac	136

Nitrati su spojevi koji se često pojavljuju u prirodi, a posebice u povrću. Prirodno se pojavljuju u živim te propadajućim tkivima biljaka, životinja i ljudi (Mensinga i sur., 2003; Lundberg i sur., 2004 i 2008; Camargo i Alonso, 2006). Nitrati se također koriste u poljoprivredi kao gnojivo koje zamjenjuje tradicionalno korištenje stočnog gnojiva, kao i u preradi hrane u obliku odobrenih dodataka (aditiva). Nitrati su sami po sebi relativno netoksični, no njihovi metaboliti nitriti, dušikov oksid (NO) i N - nitrozo spojevi, zbog svojih potencijalno štetnih utjecaja na zdravlje, imaju regulatornu važnost. S druge strane, neka istraživanja (McKnight i sur., 1999) pokazuju kako pretvorba nitrata u nitrite igra važnu antimikrobnu ulogu u želucu (bez NO nema učinkovitog uništenja gastrointestinalnih patogena u želučanoj kiselini), dok drugi metaboliti nitrata imaju važne fiziološke uloge: vazodilatacija i snižavanje krvnog tlaka, antimikrobno djelovanje u ustima (Gilchrist i sur., 2009), te poticanje izlučivanja sluzi u želucu i time gastroprotektivno djelovanje (Lundberg i sur., 2004, 2006 i 2008; Bryan i sur., 2005). Osim toga, NO utječe na metabolizam trombocita što u konačnici može pozitivno djelovati na prevenciju i liječenje arterioskleroze. Postoje dokazi da redukcija nitrita u NO poboljšava otpornost na ishemijsku/reperfuzijsku ozljedu srca, mozga, jetre i bubrega, ali su točni mehanizmi djelovanja nepoznati. Suplementacija natrij nitratom se koristi i kod sportaša za postizanje boljih rezultata što su dokazale i neke studije (Gilchrist i sur., 2009).

Prva međunarodna procjena rizika povezana s unošenjem nitrata i nitrita provedena je od strane JECFA-e 1961. godine (FAO/WHO, 1962). Navedeni Odbor preispitao je toksikološki učinak nitrata i nitrita i uspostavio 1990. godine prihvatljiv dnevni unos (engl. *Acceptable daily intake*, ADI) od 0 do 3,7 mg/kg tjelesne težine za nitrate (EC, 1992). Vrijednost ADI-a 1995. godine ostala je nepromijenjena, a izvedena je i vrijednost ADI-a od 0 do 0,06 mg/kg za nitrite (EC, 1997). JECFA je svoju posljednju reviziju završila 2002. godine i potvrdila ADI od 0 do 3,7 mg/kg tjelesne težine za nitrate i uspostavila ADI od 0 do 0,07 mg/kg tjelesne težine za nitrite (FAO/WHO, 2003a, b). Nitrati uglavnom ulaze u ljudsko tijelo egzogeno konzumacijom povrća, vode i ostale hrane, ali se u ograničenoj količini stvaraju i endogeno (Lundberg i sur., 2004 i 2008). Neke vrste povrća, posebice lisnato povrće, sadrže relativno visoke razine nitrata, ali su posljedice za sigurnost hrane nejasne. U cilju pružanja znanstvene osnove za dugoročnu strategiju upravljanja rizicima iz hrane, EFSA je 2008. godine objavila znanstveno mišljenje o rizicima od prisustva nitrata u povrću, istražujući različite scenarije izloženosti i koristeći različite prehrambene modele s nekoliko vrsta povrća.

PROCJENA RIZIKA

1. Identifikacija opasnosti

Nitratni ion predstavlja anorganski spoj koji se sastoji od atoma dušika i tri atoma kisika (NO_3^-). Molekularne je težine 62 g/mol. S različitim kationima može tvoriti soli koje se većinom koriste kao hranjiva poput natrijevog nitrata, kalijevog nitrata, amonijevog nitrata, kalcijevog nitrata i magnezijevog nitrata.

Nitrati su važan metabolit kruženja dušika u prirodi. Stvaraju se pri oksidaciji nitrita (NO_2^-) uzrokovanoj djelovanjem dušičnih bakterija (*Nitrobacter*). Nitrati se prirodno nalaze u tlu i biljkama te kao uobičajeni produkt metabolizma sisavaca. Prisustvo u tlu i površinskim vodama povezuje se s mineralizacijom organske tvari i korištenjem hranjiva (IPCS, 1999).

1.2 Faktori koji utječu na količinu nitrata u biljkama

Dušik je esencijalni element za rast i održavanje biljaka. Nitrati se najčešće nalaze u staničnim vakuolama odakle se transportiraju u ksileme. Ksilemi prenose vodu i hranjive tvari iz korijena do lišća, dok floemi prenose produkte fotosinteze od lišća prema točkama rasta biljke. Navedeni proces nadalje utječe na distribuciju nitrata između lišća i skladišnih organa kao što su sjemenke ili plodovi. Stoga lisnati usjevi kao što su kupus, salata i špinat imaju relativno visoke količine nitrata za razliku od krumpira, mrkve, poriluka, luka, graha, graška i mahunarki. Sustav ovakvog prijenosa rezultira time da mladi listovi imaju manju količinu nitrata od starijih listova. Takav odnos se najbolje može zamijetiti kod biljke kupusa s najvećom količinom nitrata u vanjskim listovima i puno manjom količinom u unutrašnjosti (Greenwood i Hunt, 1986).

Dušik u mineraliziranom obliku nitrata i amonijaka glavni je faktor rasta većine poljoprivrednih kultura te se gnojiva na bazi dušika koriste u svrhu postizanja poboljšanih prinosa.

Količina nitrata u zelenom lisnatom povrću ovisi o nizu čimbenika, uključujući godišnje doba, intenzitet svjetla, temperaturu, uvjete rasta, način korištenja gnojiva i skladištenje (Dich i sur., 1996). Zbog nižeg intenziteta svjetla i manje dnevnih sati u sjevernim zemljopisnim širinama na području Europe i tijekom zime, nitrati su uglavnom prisutni u većim količinama.

Nadalje, sadržaj nitrata ovisi i o uvjetima okoliša koji uključuju:

- Karakteristike tla

Akumulacija nitrata ovisi o vrsti tla i njegovom mineralnom sastavu. S obzirom da se oni kreću iz dubljih slojeva prema površini i korijenskom sustavu biljaka putem konvekcije, kretanje im uslijed nedostatka vode može biti ograničeno. Prekomjerna vlažnost može razrijediti sadržaj nitrata u tlu, ograničiti rast biljaka i dovesti do gubitka nitrata denitrifikacijom.

- Korištenje gnojiva

Intenzivna poljoprivreda može dovesti do korištenja velikih količina gnojiva koji su izvor nitrata. Dušična gnojiva mogu sadržavati dušik u obliku nitrata, amonijaka ili uree te povremeno i drugih oblika koji se u konačnici pretvaraju u nitrate. Primjena dušičnih gnojiva povećava količinu nitrata u ksilemu i nema utjecaj na količinu u floemu. Kao odgovor na dušičnu gnojidbu, lisnato povrće poput salate ili

kupusa sadržava veću količinu nitrata osim kod mladih listova. Grašak i grah, biljke koje se hrane putem floema sadrže manje, a korijenasto povrće najmanje količine nitrata.

Uslijed nepridržavanja dobre poljoprivredne prakse, nekontrolirana primjena dušičnih gnojiva može dovesti do povećane količine anorganskih dušičnih spojeva u tlu i površinskim vodama.

- **Intenzitet svjetlosti**

Intenzitet svjetlosti je ključni faktor količine nitrata u lisnatom povrću kao posljedica asimilacije dušika i transporta elektrona pri procesu fotosinteze u lišću. Tako na primjer, razlike u intenzitetu svjetla tijekom različitih mjeseci mogu pri uzgoju salate u području zapadne Europe izazvati čak trostruke promjene u sadržaju nitrata (Van Eysinga, 1984). Zimski usjevi općenito sadrže veću količinu nitrata od ljetnih uzgajanih u istom okruženju. Također, biljke koje se uzgajaju u području sjeverne Europe sadrže veću razinu nitrata u odnosu na područja južne Europe (Weightman i sur., 2006). Navedene razlike mogu se objasniti činjenicom kako veće osvjetljenje ljeti smanjuje sadržaj nitrata u korist povećanja rasta biljaka (Kanaan i Economakis, 1992). Stoga protokoli za uzorkovanje u Velikoj Britaniji sugeriraju izbjegavanje uzorkovanja salate tijekom oblačnih vremenskih uvjeta ili tijekom određenog doba dana (Anonymous, 2002). Voće i povrće iz stakleničkog uzgoja ima veći sadržaj nitrata zbog manjeg intenziteta svjetla i veće mineralizacije okruženja u kojem raste (Gangolli i sur., 1994).

- **Uvjeti čuvanja**

Sadržaj nitrata u svježem povrću može opadati čuvanjem na sobnoj temperaturi. S druge strane, ovisno o vrsti povrća, razina nitrata može i rasti pod utjecajem specifičnog endogenog djelovanja enzima nitratne reduktaze ili utjecajem mikroorganizama. Pri čuvanju povrća u hladnjaku (7 dana na temperaturi od 5 °C), sadržaj nitrata ostaje nepromijenjen što upućuje na činjenicu kako nitrat reduktaza u navedenim uvjetima postaje neaktivna (Pate, 1973; Andrews, 1986; Wallace, 1986), te kako je aktivnost mikroorganizama smanjena (Phillips, 1968; Ezeagu i Fafunso, 1995; Ezeagu, 1996; Chung i sur., 2004). Različita istraživanja o sadržaju nitrata u špinatu (Phillips, 1968; Chung i sur., 2004), nigerijskom lisnatom povrću (Ezeagu i Fafunso, 1995; Ezeagu, 1996) i kineskom kupusu (Chung i sur., 2004) pri sobnoj temperaturi, navode kako sadržaj nitrata opada dok se sadržaj nitrita s vremenom povećava. Ovaj proces se ubrzao kad je proizvod bio pripremljen u obliku pirea. Sánchez-Echaniz i sur. (2001) su u svojim istraživanjima ustanovili visoke razine nitrita u pireu pripremljenom u kućanstvu nakon hladnog skladištenja od 12 i više sati. Isti autori navode kako je ova pojava vjerojatno povezana s oslobađanjem nitrat reduktaze koja uzrokuje stvaranje nitrita, posebice u povrću koje sadrži visoku razinu nitrata poput špinata i blitve. Autori stoga preporučuju kako bi dječju hranu od špinata i blitve trebalo upotrijebiti odmah nakon pripreme ili čuvati zamrznutu ukoliko je potrošnja odgođena za više od 12 sati.

- **Prerada**

Pranje

Nitrati su topivi u vodi i pranje lisnatog povrća (salate, matovilca, endivije) može smanjiti razinu nitrata za 10-15 % (Dejonckheere i sur., 1994). Mozolewski i Smoczynski (2004) svojim su istraživanjima pokazali da su se razine nitrata i nitrita u krumpiru nakon obrade (pranje, ljuštenje i ispiranje) smanjile od 18 do 75 %. Brojna druga istraživanja pokazuju slične rezultate (Czarniecka-Skubina i Golaszewska, 2001; Golaszewska i Zalewski, 2001).

Guljenje

Istraživanje, koje su proveli Rytel i sur. (2005) pokazuje kako je sadržaj nitrata u dvije sorte krumpira, Inovator i Santana, prije guljenja iznosio 258 odnosno 349 mg/kg suhe tvari te je tijekom procesa proizvodnje prženih krumpira (pomfrit) znatno smanjen. Oko 30 % nitrata uklonjeno je tijekom ljuštenja. Rezanjem i predprženjem umanjio se za daljnjih 20 %, a blanširanjem za 30 %. Nakon termičke obrade (prženje) sadržaj nitrata iznosio je 5-6 % (16-18 mg/kg) od početnog sadržaja suhe tvari.

1.3 Uzorkovanje i metode analize

1.3.1 Uzorci

Istraživanje prisutnosti nitrata u povrću trajalo je 2 godine. U 2012. godini analizirano je zeleno lisnato povrće: salata, špinat, kelj, blitva, kupus i rukola, dok je u 2013. godini obuhvaćeno sljedeće povrće: salata, špinat, blitva, kupus i rukola, komorač, korabica, celer, brokula i hren.

Prema postojećim zakonskim propisima, NDK za nitratre naveden je za salatu (zeleni i kristalica), špinat i rukolu, dok za ostale vrste povrća NDK nije propisan. Ostale vrste povrća također mogu biti izvor nitrata te se određivanjem njegove količine može provesti procjena izloženosti konzumenata.

1.3.2 Uzorkovanje

Uzorkovanje uzoraka provedeno je tijekom proljeća i jeseni 2012. i 2013. godine. Provedeno je na svim dostupnim mjestima na tržištu (trgovački centri, tržnice), metodom slučajnog uzorka. Težina uzorkovanog uzorka iznosila je minimalno 1 kg. Uzorkovanje su proveli stručni djelatnici Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“. Svi su uzorci, nakon uzorkovanja, pohranjeni u prijenosne rashladne uređaje, te u najkraćem roku dostavljeni u laboratorij za analizu, gdje su, poštujući «hladni lanac» do analize, skladišteni na niskim temperaturama.

Tijekom 2012. godine uzorci salate, špinata, kelja, blitve, kupusa i rukole su uzorkovani na četiri lokacije na području Republike Hrvatske: Rijeka, Zagreb, Osijek i Split.

U proljetnom periodu ukupno je uzorkovano 100 uzoraka zelenog lisnatog povrća, po 25 uzoraka na svakoj lokaciji (po 5 uzoraka salate, špinata, kelja, blitve te kupusa).

U jesenskom periodu također je uzorkovano 100 uzoraka zelenog lisnatog povrća, po 25 uzoraka na svakoj od predviđenih lokacija (po 5 uzoraka salate, špinata, kelja, blitve i 5 uzoraka rukole koja je uzorkovana umjesto uzoraka kupusa iz proljetnog perioda).

Tijekom 2013. godine uzorkovano je na četiri lokacije na području Republike Hrvatske: Rijeka, Zagreb, Osijek i Split. U proljetnom periodu sveukupno je uzorkovano 120 uzoraka zelenog lisnatog povrća, po 30 uzoraka na svakoj lokaciji (po 5 uzoraka salate, špinata, blitve, kupusa, rukole, te po 5 uzoraka ostalih vrsta povrća: koraba, celer, hren i brokula, koje je bilo dostupno u vremenu uzorkovanja).

U jesenskom periodu uzorkovano je također 120 uzoraka zelenog lisnatog povrća, po 30 uzoraka na svakoj od predviđenih lokacija (po 5 uzoraka salate, špinata, kupusa, blitve, rukule, te gomoljastog povrća). Većina uzoraka pripremljena je unutar 24 sata od uzorkovanja, a oni uzorci koji nisu pripremljeni u istom danu kada su i uzorkovani, pohranjeni su u zamrzivač.

Sveukupno, tijekom cijelog razdoblja uzorkovanja sa četiri lokaliteta na području RH, uzorkovano je ukupno 440 uzoraka povrća.

Postupak uzorkovanja, transport uzoraka do laboratorija te priprema uzoraka za analizu, proveden je u skladu sa zahtjevima Pravilnika o planu uzorkovanja i metodama analiza za službenu kontrolu količina nitrata u hrani (NN 42/08) koji je tada bio na snazi.

1.3.3. Analitički parametri i metode

Svi uzorci uzorkovani u svrhu provedbe ovog Projekta, analizirani su na prisutnost nitrata. U vrijeme provođenja istraživanja najveće NDK nitrata bile su propisane Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama kontaminanata u hrani (NN 154/2008. NN 78/2011.), a prikazane su u **Tablici 2**.

Tablica 2. Najveće dopuštene količine nitrata (izvadak)

	Hrana	Najveće dopuštene količine (mg NO ³ /kg)	
1.1.	Svježi špinat (<i>Spinacia oleracea</i>)	Ubrana od 1. listopada do 31. ožujka	3000
		Od 1. travnja do 30 rujna	2500
1.2.	Prerađen duboko smrznut ili smrznut špinat		2000
1.3.	Svježa zelena salata (<i>Lactuca sativa</i> L.) (uzgojena u stakleniku i na otvorenom) izuzev zelene salate navedene pod točkom 1.4.	Ubrana od 1. listopada do 31. ožujka: Zelena salata uzgojena u stakleniku Zelena salata uzgojena na otvorenom	4500 4000
		Ubrana od 1. travnja do 30 rujna: Zelena salata uzgojena u stakleniku Zelena salata uzgojena na otvorenom	3500 2500
1.4.	Zelena salata vrste «Iceberg»	Zelena salata uzgojena u stakleniku Zelena salata uzgojena na otvorenom	2500 2000
1.5*	Rukola (<i>Eruca sativa</i> , <i>Diplotaxis sp</i> , <i>Brassica tenuifolia</i> , <i>Sisymbrium tenuifolium</i>)	Ubrana od 1. listopada do 31. ožujka: Ubrana od 1. travnja do 30 rujna:	7000 6000

*- izvadak iz Commission Regulation (EU) No 1258/2011, of 2 December 2011.

Ulaskom RH u članstvo EU dopuštene količine nitrata su regulirane Uredbom Komisije (EZ) br. 1881/2006 o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani. U njoj su, pored vrijednosti NDK za određeno povrće (**Tablica 2**), navedene i vrijednosti za prerađenu hranu na bazi žitarica i hrane za dojenčad i malu djecu (200 mg NO³/kg). S obzirom da količine nitrata u rukoli nisu regulirane spomenutom Uredbom, u **Tablicu 2** je nadodan NDK prema Uredbi 1258/2011. Određivanje količine nitrata u uzorcima zelenog lisnatog povrća, provedeno je HPLC tehnikom prema HRN EN 12014-2:1998, a koja je akreditirana u skladu s Normom HRN EN ISO/IEC 17015.

1.3.4 Priprema uzorka

Nakon homogenizacije uzorka, odvagano je $10 \pm 0,05$ g u odmjernu tikvicu od 500 mL, dodano 400 mL vode (temperatura $>80^{\circ}\text{C}$) te homogenizirano pomoću magnetske miješalice. Nakon hlađenja uzorka, sadržaj je profiltriran kroz membranski filter nakon čega je provedeno određivanje količine nitrata HPLC tehnikom. Svježi pripremljeni su za analizu unutar 24 sata od uzorkovanja. Kada to nije bilo moguće provesti, uzorak se zamrznuo i čuvao zamrznut, ali ne dulje od 6 tjedana.

Količina nitrata u uzorku određena je metodom vanjskog standarda koristeći kalibracijski pravac. Da bi se pripremio kalibracijski pravac određena je površina pikova za ≥ 4 različita koncentracijska nivoa (područje metode) te najmanje s tri ponavljanja za svaki koncentracijski nivo.

Uzorci pripremljeni za kromatografsku analizu postavljeni su u automatski uzorkivač HPLC-a.

Uvjeti kromatografske analize:

- mobilna faza – 10 g/L KH_2PO_4 pH 3,0
- protok mobilne faze – 1 mL/min
- temperatura – sobna
- detektor – UV 214 nm
- volumen analiziranog uzorka – konstantan 20 μL

Rezultati su izraženi u mg/kg prema formuli: $\text{mg/kg} = a(\text{mg/kg}) \times b(\text{mL})/\text{odvaga}(\text{g})$

a = količina očitana s kromatograma

b = razrjeđenje

1.3.5 Rezultati analize

Tablica 3. Srednje vrijednosti nitrata prema mjestu i periodu uzorkovanja (2012. godina)

Vrsta uzorka	Mjesto uzorkovanja	Srednja vrijednost nitrata (mg/kg) PROLJEĆE	Srednja vrijednost nitrata (mg/kg) JESEN
SALATA	Zagreb	877	2198
	Osijek	481	729
	Rijeka	666	756
	Split	790	1376
ŠPINAT	Zagreb	306	1408
	Osijek	673	2866
	Rijeka	1216	1657
	Split	630	2121
KELJ	Zagreb	523	641
	Osijek	326	1537
	Rijeka	354	640
	Split	1209	1908
BLITVA	Zagreb	1049	2260
	Osijek	831	714
	Rijeka	1572	876
	Split	437	249

KUPUS	Zagreb	394	-
	Osijek	392	-
	Rijeka	553	-
	Split	1523	-
RUKOLA	Zagreb	-	4900
	Osijek	-	4408
	Rijeka	-	4344
	Split	-	3767

Tablica 4. Zbirni prikaz srednjih vrijednosti količine nitrata (2012. godina)

Vrsta uzorka	Količina nitrata u mg/kg PROLJEĆE	Količina nitrata u mg/kg JESEN
SALATA	703	1264
ŠPINAT	706	2013
KELJ	603	1181
BLITVA	972	1024
KUPUS	718	-
RUKOLA	-	4354

Rezultati u **Tablici 3** prikazuju srednje vrijednosti nitrata s obzirom na vrstu povrća uzorkovanog na lokacijama Rijeka, Zagreb, Osijek i Split, tijekom proljeća i jeseni 2012. godine.

Iz dobivenih rezultata prikazanih u **Tablici 3** vidljivo je da su se prosječne količine nitrata u pojedinim vrstama povrća kretale u rasponu od 306 mg/kg (određeno u špinatu na području Zagreba) do 4900 mg/kg (u rukoli, također na području Zagreba). Prema **Tablici 4**, ustanovljene su veće količine nitrata u jesenskom periodu, a općenito su u salati određene najniže količine, a u rukoli najveće.

Sve utvrđene količine ne prelaze NDK propisane zakonodavstvom.

Tablica 5. Srednje vrijednosti nitrata prema mjestu i periodu uzorkovanja (2013. godina)

Vrsta uzorka	Mjesto uzorkovanja	Srednja vrijednost nitrata (mg/kg) PROLJEĆE	Srednja vrijednost nitrata (mg/kg) JESEN
SALATA	Zagreb	608	486
	Osijek	698	697
	Rijeka	672	811
	Split	803	696
ŠPINAT	Zagreb	1619	1370
	Osijek	404	372
	Rijeka	251	293
	Split	467	510
BLITVA	Zagreb	591	1080
	Osijek	956	1511
	Rijeka	1603	809
	Split	518	981

KUPUS	Zagreb	217	193
	Osijek	459	467
	Rijeka	444	431
	Split	803	299
RUKOLA	Zagreb	2573	3833
	Osijek	2055	3262
	Rijeka	4460	2889
	Split	5146	3345
KORABA	Zagreb	1007	1021
	Osijek	773	705
	Rijeka	959	957
	Split	1091	1037
KOMORAČ	Zagreb	893	567
	Osijek	388	419
	Rijeka	1116	1149
	Split	-	-
HREN	Zagreb	-	-
	Osijek	-	-
	Rijeka	125	115
	Split	-	-
BROKULA	Zagreb	-	-
	Osijek	879	949
	Rijeka	-	-
	Split	838	-
CELER	Zagreb	-	-
	Osijek	55	74
	Rijeka	-	-
	Split	527	611

Tablica 6. Zbirni prikaz srednjih vrijednosti količine nitrata (2013. godina)

Vrsta uzorka	Količina nitrata (mg/kg) PROLJEĆE	Količina nitrata (mg/kg) JESEN
SALATA	695	658
ŠPINAT	687	659
BLITVA	897	1042
KUPUS	481	342
RUKOLA	3558	3335
OSTALO POVRĆE	816	853

Rezultati ovoga istraživanja, prema lokacijama uzorkovanja za 2013. godinu prikazani su u **Tablicama 5** i **6**. U njima su prikazane srednje vrijednosti nitrata u analiziranim uzorcima zelenog lisnatog povrća i gomoljastog povrća.

Iz dobivenih rezultata prikazanih u **Tablici 5** vidljivo je da su se prosječne količine nitrata u pojedinim vrstama povrća kretale u rasponu od 55 mg/kg (izmjereno u celeru s područja Osijeka) do 5146 mg/kg (u rukoli s područja Splita). Prema **Tablici 6**, za 2013. godinu se pokazalo da su u proljetnom periodu u prosjeku zabilježene veće količine nitrata kod svog povrća (izuzev blitve i kategorije „ostalo povrće“) u odnosu na jesenski period. Osim toga, vidljivo je da su najveće prosječne količine i u ovoj godini zabilježene za rukolu, dok su najniže ovaj puta zabilježene za kupus.

Tijekom 2013. godine također nisu zabilježene količine nitrata veće od zakonski dopuštenih.

Tablica 7. Zbirni prikaz srednjih vrijednosti količine nitrata za 2012. i 2013. godinu

Vrsta povrća	Količina nitrata (mg/kg) PROLJEĆE	Količina nitrata (mg/kg) JESEN	Prosječna količina nitrata (mg/kg)
SALATA	699	961	830
ŠPINAT	696	1336	1016
KELJ	603	1181	892
BLITVA	934	1033	983
KUPUS	599	342	471
RUKOLA	3558	3845	3702
OSTALO POVRĆE	816	853	835

Prema rezultatima u **Tablici 7** količina nitrata veća je u jesenskim uzorcima povrća od proljetnih, osim u slučaju kupusa. Isto tako, najniže količine nitrata su određene u kupusu, a najveće u rukoli. Slične vrijednosti nitrata dobivene su za salatu, špinat, kelj i blitvu.

RASPRAVA

Slično istraživanje na području EU provela je EFSA u svrhu izrade Znanstvenog mišljenja o nitratima u povrću (Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain - Question No. EFSA-Q-2006-071) (EFSA, 2008). EFSA je prikupila podatke od 20 zemalja članica uključujući i Norvešku. U periodu od 2000. do 2007. godine ukupno je prijavljeno i obrađeno 41 969 analitičkih podataka. Utvrđen je širok raspon varijacija srednjih vrijednosti, od niskih 1 mg/kg (u grašku i kelju pupčaru) do visokih 4800 mg/kg (u rukoli). Prikaz rezultata uzoraka povrća i količine nitrata koji se navode u EFSA-inom znanstvenom mišljenju (EFSA, 2008), a koji su bili obuhvaćeni i istraživanjem tržišta u RH prikazani su u **Tablici 8.**

Tablica 8. Usporedba rezultata nitrata u povrću iz EFSA-inog znanstvenog mišljenja (EFSA, 2008) i ovog istraživanja

Vrsta povrća	Količina nitrata (mg/kg) EFSA	Količina nitrata (mg/kg) RH
SALATA	1324	830
ŠPINAT	1066	1016
KELJ	324	892
BLITVA	1690	983
KUPUS	311	471
RUKOLA	4800	3702
OSTALO POVRĆE	670	835

Usporedbom rezultata s istraživanjem provedenim u RH može se uočiti kako su u našoj zemlji veće srednje vrijednosti zabilježene u uzorcima kelja, kupusa i ostalog povrća (celer, koraba, komorač, hren i brokula), dok su za ostalo istraživano povrće srednje vrijednosti manje.

Španjolska Agencija za sigurnost hrane i ishranu (AESAN) objavila je 2011. godine rezultate istraživanja nitrata u špinatu i blitvi (od 2000. do 2009. godine) na ukupno 1018 uzoraka. Srednja vrijednost količine nitrata iznosila je 1526 mg/kg za blitvu odnosno 816 mg/kg za špinat, što je u odnosu na naše istraživanje više za blitvu, ali niže za špinat.

2. Karakterizacija opasnosti

2.1 Apsorpcija, distribucija, metabolizam i ekskrecija – ADME

Nitrati se iz sirovog ili termički obrađenog povrća učinkovito apsorbiraju, što rezultira njihovom visokom bioraspoloživošću od gotovo 100 % (van Velzen i sur., 2008). Unosom putem hrane nitrati se brzo apsorbiraju kroz proksimalno područje tankog crijeva, nadalje se kreću kroz krvotok i distribuiraju tako da se najveće koncentracije nitrata u ljudi mogu naći u serumu, slini i urinu (JECFA, 2003). Nakon distribucije aktivno se prenose iz krvotoka u slinu što je uočeno i kod ljudi i kod nekoliko vrsta pokusnih životinja (osim štakora). Kod ljudi, oko 25 % svih unesenih nitrata se izlučuje u slini. S druge strane, od tih 25 % nitrata izlučenih u slini, 20 % njih su reducirani u nitrite zbog prisustva stabilne populacije nitrarno-reducirajućih bakterija koje se nalaze u podnožju jezika (Gangolli i sur., 1994) (JECFA, 2003).

Kao krajnji rezultat, oko 5 % do 7 % svih unesenih nitrata se u slini zdravih odraslih osoba mogu detektirati kao nitriti (EFSA, 2008).

Nitrati se mogu reducirati do nitrita djelovanjem crijevnih bakterija ili pomoću enzima nitrat-reduktaze kojeg posjeduju sisavci. U kiseloj sredini želuca, nitriti prisutni u slini se brzo pretvaraju u dušičnu kiselinu koja se nadalje raspada do dušikovog oksida (NO). NO je važna signalna i antimikrobna molekula koja u organizmu normalno nastaje djelovanjem NO sintaza (NOS) iz L-arginina i kisika. Prilikom hipoksije, NO nastaje redukcijom iz nitrata i nitrita. Većina apsorbiranih nitrata se izlučuje u mokraći, no stalno je prisutna selektivna reapsorpcija iz bubrega i recirkulacija u žuči i slini (EFSA, 2008). Bartolomej i Hill (1984) u svom radu ističu da se oko 65 % do 70 % nitrata izlučuje urinom.

2.2 Toksičnost

Nitrati imaju relativno nisku toksičnost za ljude. Međutim, metaboliti koji se tvore u ljudskom organizmu kao što su nitriti, dušikov oksid i N-nitrozo spojevi mogu biti povezani sa zdravstvenim problemom kao što je methemoglobinemija ili karcinogenezom. Uobičajena stopa pretvorbe nitrata u nitrite je između 5 % i 7 %, iako u pojedinim slučajevima može iznositi i do 20 % (JECFA, 1995, 2002) (EFSA, 2008). Toksičnost nitrata i njegovih metabolita procijenjena je u nekoliko navrata i od strane JECFA-e i EFSA-e. Istaknuto je kako se za procjenu trebaju koristiti eksperimentalne životinje kod kojih je proces pretvorbe nitrata u nitrite sličan kao onaj u ljudskoj populaciji (JECFA, 2002). S tim u vezi, studije metabolizma nitrata i toksikokinetika kod životinja potvrdile su kako štakori, na primjer, nisu dobar model jer se kod njih ne vrši transport nitrata putem sline te je stoga proces konverzije nitrata u nitrite ograničen.

2.2.1 Akutna toksičnost

Provedena istraživanja ukazuju na podatak kako je akutna oralna toksičnost nitrata kod ispitivanih životinja općenito niska, s vrijednostima LD₅₀ u rasponu od 300 mg/kg t.m./dan u svinja do 9000 mg/kg t.m./dan kod štakora. Što se tiče nitrita, opaženi rezultati pokazuju da je toksičnost natrijevog nitrita daleko veća od natrijevog nitrata, uz vrijednosti LD₅₀ u rasponu od 180 mg/kg t. m. (kod štakora) i 214 mg/kg t. m. (kod miševa) (EFSA, 2008).

Slučajevi methemoglobinemije, kao jedne od najčešćih posljedica akutne toksičnosti kod ljudi, zabilježeni su kod odraslih osoba nakon slučajnih konzumacija visokih doza nitrata ili kao posljedica liječenja. Smrtni slučajevi su zabilježeni nakon pojedinačnog unosa od 4 do 50 g nitrata (što je ekvivalent od 67 do 833 mg nitrata/kg t.m.). Međutim, mnogi od tih smrtnih slučajeva su zabilježeni kod ljudi sa smanjenom kiselosti želuca, koji su i označeni kao rizična skupina. Toksična doza za sve ostale (temeljena na stvaranju methemoglobina) se kreće između 2 i 9 g (ekvivalent je od 33 do 150 mg nitrata/kg t.m.). U kontroliranoj studiji (Speijers i sur., 1989) oralna doza od 7 do 10,5 g amonijevog nitrata te intravenozna doza od 9,5 g natrij nitrata nije uzrokovala povećanje razina methemoglobina kod odraslih, ali je došlo do povraćanja i proljeva (WHO, 2011).

Slučajna otrovanja ljudi su zabilježena kao rezultat pojave nitrita u hrani. Oralna smrtonosna doza za ljude je procijenjena na 33 do 250 mg nitrita/kg t.m. pri čemu se donja granica odnosi na djecu i starije. Toksična doza koja uzrokuje methemoglobinemiju se kreće između 0,4 i 200 mg/kg t.m.

Još jedan izvor informacija vezanih za toksičnost nitrita kod ljudi je upotreba natrij nitrata kao lijeka za vazodilataciju ili kao protuotrova kod trovanja cijanidom. Za doze između 30 i 300 mg/osobi (ekvivalent je od 0,5 do 5 mg/kg t.m.) nije zabilježeno da uzrokuju toksične učinke (WHO, 2011).

2.2.2 Kronična toksičnost; karcinogenost

S toksikološkog stajališta, nitrati sudjeluju u formiranju nitrozamina, te stoga mogu biti potencijalni karcinogeni (AESAN, 2008) iako su istraživanja karcinogenosti u većini slučajeva bila negativna, osim kod iznimno visokih doza nitrata. Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) je nitrata i nitrite unesene putem prehrane, svrstala u grupu 2A, što znači da su u slučaju ljudi vjerojatno kancerogeni (IARC, 2010). Brojne epidemiološke studije (JECFA, 1995, 2002; EFSA, 2008) na ljudima nisu dokazale povezanost izloženosti nitratima hranom ili vodom i formiranja tumora, no prema IARC - u (2010) postoji ograničen broj dokaza o karcinogenosti nitrita prisutnih u hrani te ih se povezuje s povećanom stopom incidencije raka želuca kod ljudi. U pogledu N-nitrozo spojeva, ne postoje kvantitativni dokazi njihovog endogenog formiranja iz nitrita i N-nitrozo spojeva unesenih putem prehrane. Stoga se endogeno formiranje N-nitrozo spojeva ne smatra prikladnim za procjenu rizika od nitrita (JECFA, 2002). Nadalje, kada se nitrati konzumiraju putem uobičajene raznolike prehrane koja sadrži povrće, istovremeno se unose i druge bioaktivne tvari koje djeluju kao antioksidansi (na primjer vitamini C i E) koji mogu inhibirati formiranje nitrozamina (EFSA, 2010). NOAEL od 500 mg/kg t.m./dan natrij nitrata odgovara količini nitrata od 370 mg/kg t.m. koji je dobiven na temelju dugotrajnih studija na štakorima te studije subkronične toksičnosti na psima. Primjenom faktora nesigurnosti od 100, dobio se ADI od 0 do 5 mg/kg t.m./dan za natrij nitrat te **od 0 do 3,7 mg/kg t.m./dan za nitrate**.

Prihvatljivi dnevni unos (ADI) za nitrate od 3,7 mg/kg t.m./dan, odgovara unosu od 222 mg nitrata po danu za odraslu osobu od 60 kg kojeg je EFSA-in CONTAM odbor potvrdio na temelju JECFA-inog izvješća iz 2002. godine.

2.2.3 Genotoksičnost

Rezultati dobiveni u studijama genotoksičnosti pokazuju kako nitrati sami po sebi nisu genotoksični te ih nije potrebno klasificirati kao takve (JECFA, 2002).

2.2.4 Methemoglobinemija

Akutna toksičnost nitrata se uglavnom pripisuje redukciji nitrata u nitrite. Nitriti uzrokuju oksidaciju hemoglobina (Hb) u crvenim krvnim zrnima, stvarajući methemoglobin (MHb) što posljedično može uzrokovati pojavu methemoglobinemije. Methemoglobinemija se pojavljuje kada brzina oksidacije Hb u MHb premaši sposobnost enzima NADH-citokroma b5 methemoglobin reduktaze da reducira MHb u Hb (Sánchez-Echaniz i sur., 2001; Pérez-Caballero i sur., 2005), ili kada je navedeni enzim nedostatan (kongenitalna methemoglobinemija) (Da Silva i sur., 2003, Laporta Báez i sur., 2008). Bolest je poznata pod nazivom "sindrom plave bebe" i karakterizira je plavo-siva koža dojenčeta (Herranz i Clerigué, 2003). U uobičajenim okolnostima novorođenčad ima optičajnu razinu MHb od 2 %, dok je kod prerano rođene djece razina 2-3 % (Greer i Shannon, 2005). Kod odraslih razina iznosi <2 % (Gómez Lumbreras i sur., 2008). Nekoliko autora navodi kako je najveća stopa incidencije methemoglobinemije, u dojenčadi mlađe od 3 mjeseca. Najveći utjecaj ima visok udio fetalnog hemoglobina koji je osjetljiviji na oksidaciju u MHb uslijed visoke izloženosti nitritima. Nadalje, visoki pH želuca pogoduje rastu nitrarno-reducirajućih bakterija i stoga povećava transformaciju nitrata u nitrite u probavnom traktu, što može uzrokovati gastroenteritis popraćen povećanim stvaranjem nitrita. Osjetljivost dojenčadi

vremenom nestaje jer se smanjuju ostaci fetalnog hemoglobina i razine enzima postaju slične onima u odraslih (Herranz i Clerigué, 2003; Greer i Shannon, 2005; Gómez Lumberras i sur., 2008).

AESAN (2010) navodi kako su u Španjolskoj tijekom nekoliko godina zabilježeni slučajevi methemoglobinemije. Kao glavni uzrok navedena je potrošnja domaćeg povrća s visokim razinama nitrita pohranjenog u neodgovarajućim uvjetima ili miješanjem dojenačke formule s vodom koja se koristila za kuhanje povrća. Iako je razina nitrita u sirovom, neoštećenom povrću općenito vrlo niska, razine se mogu povećati tijekom skladištenja zbog redukcije nitrata i smanjenja sadržaja vode. Ovaj proces se ubrzava kad je povrće pripremljeno u obliku pirea (Chung i sur., 2004). Autori Alonso Vega i sur. (2007), Laporta Báez i sur. (2008) su izvijestili o slučajevima methemoglobinemija djece starosti 8 do 9 mjeseci sa simptomima cijanotičnih usana i bljedila ekstremiteta nakon konzumacije kašica od mješovitog povrća koje je sadržavalo i blitvu ili pirea od blitve. Obrok nakon pripreme nije bio pohranjen u hladnjaku, a konzumiran je nakon nekoliko sati stajanja. Prema svemu navedenom može se zaključiti kako neprimjereno ili produljeno skladištenje kuhanog povrća povećava rizik za nastanak methemoglobinemije.

Budući da nitrati nakon redukcije u nitrite mogu potencijalno izazvati methemoglobinemiju i to već putem jednog obroka, EFSA je zaključila kako bi bilo dobro da se odredi vrijednost akutne referentne doze (ARfD) sa svrhom procjene razina sigurnosti za akutnu izloženost nitratima, ali za to još uvijek nema dovoljno eksperimentalnih studija. Prema navodima EFSA-e (2010), temeljem dostupnih podataka istraživanja na životinjama i prijavljenim humanim intoksikacijama, razine MHb nisu povišene kod djece ili djece iznad tri mjeseca kada je izloženost nitratima putem vode za piće i povrća manja od 15 mg/kg t. m./dan. Uzimajući u obzir ovu preporučenu vrijednost ARfD-a, a prema najvećoj utvrđenoj količini nitrata u špinatu (3412 mg/kg u jesen u Osijeku) i/ili blitvi (3752 mg/kg, također u jesen u Osijeku) dijete od 10 kg t. m. smjelo bi odjednom unijeti 44 g špinata ili 40 g blitve.

3. Procjena izloženosti

Procjena izloženosti napravljena je pomoću računalnog modela „Improrisk 1.3.1“, koji je ugrađen u „MS Excel“ te se koristi za izračun izloženosti populacije određenim kontaminantima (Improvast, 2016). Ovaj model kombinira podatke o prehranbenim navikama ispitanika (konzumacija hrane) s podacima o prisutnosti pojedinog kontaminanta u hrani, dobivenih iz određenog istraživanja, te računa stopu izloženosti za promatranu populaciju. Za izračune se koriste svi zabilježeni unosi hrane jer se pretpostavlja da je svaka osoba, pri svakom obroku (zabilježenom unosu hrane) izložena kontaminantu. Podaci o prehranbenim navikama dobiveni su iz neobjavljene studije o prehranbenim navikama HAH-a (korišteni su samo podaci za ispitanike koji su prijavili konzumaciju namirnica na kojima su utvrđene količine nitrata u ovom istraživanju). Rezultati dobiveni korištenjem ovog modela o ukupnoj izloženosti populacije nitratima iz povrća prikazani su u **Tablici 8 i 9** te **Slikama 1 i 2**.

Tablica 8. Ukupna izloženost populacije

Ukupna izloženost populacije [$\mu\text{g/kg t.m.}$]	
Prosječna izloženost	420,262
Medijan izloženosti	190,701
95. percentil	1601,731
Postotak ISPOD toksikološke granice	99,6%
Postotak IZNAD toksikološke granice	0,4%

Tablica 9. Odabrani statistički parametri za promatranu populaciju

N=1501

Statistika izloženosti	($\mu\text{g/kg t.m./dan}$)
Najmanja	0,592
Najveća	5717,92
Medijan	190,701
Prosječna izloženost	420,26
St. devijacija izloženosti	608,919
Izloženost populacije u usporedbi s ADI-em	

Broj ispitanika ispod ADI-a 1495

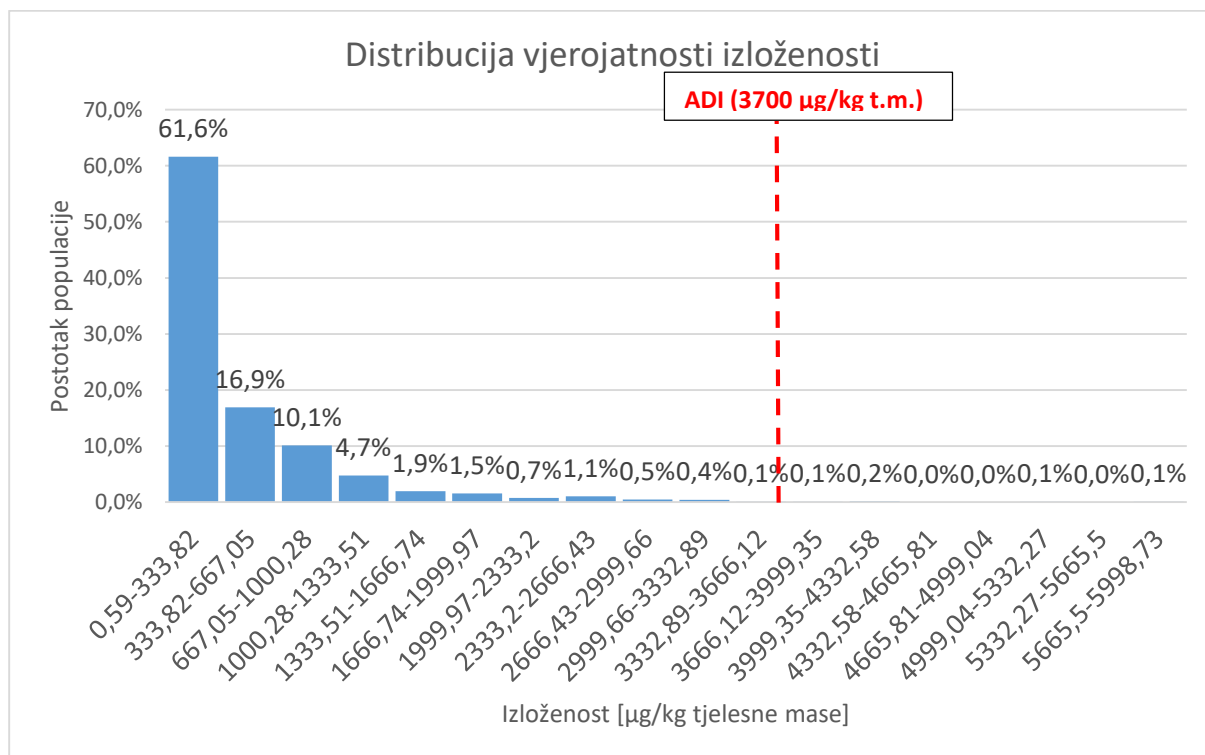
Broj ispitanika IZNAD ADI-a 6

Postotak ispitanika IZNAD ADI-a 0,4%

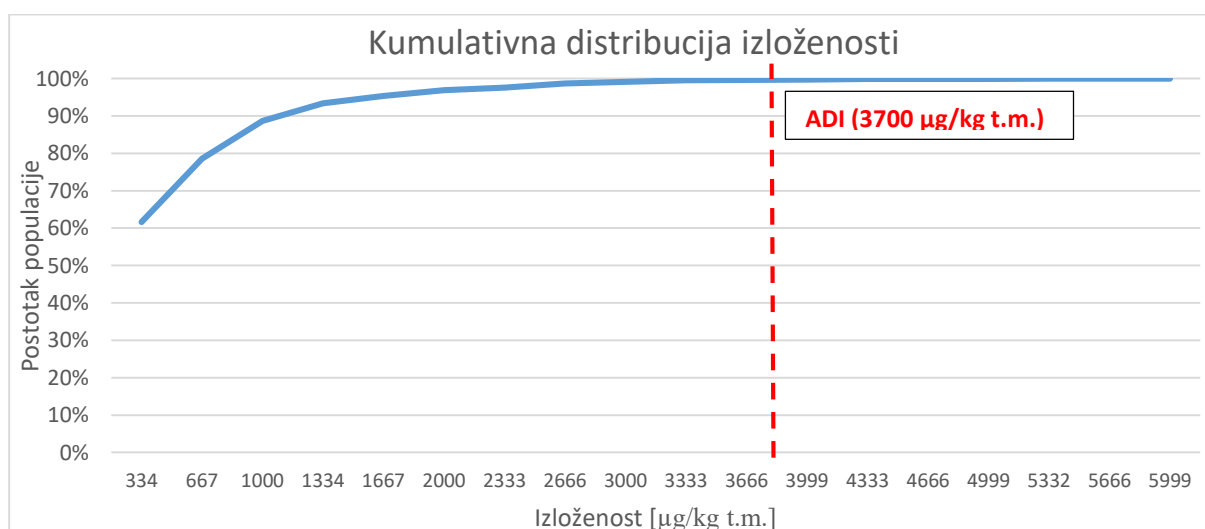
Iz **Tablice 8 i 9** je vidljivo da je ukupan broj ispitanika koji su prijavili konzumaciju povrća iz ove studije bio 1501 (ukupno je bio obuhvaćen 1971 ispitanik). Prosječna izloženost nitratima kod konzumacije povrća iz studije je 420,26 $\mu\text{g/kg t.m.}$, dok je maksimalna zabilježena izloženost iznosila 5717,92 $\mu\text{g/kg}$

t.m. Ukupno 6 ispitanika ili 0,4 % premašuje uspostavljenu ADI vrijednost za nitrate koja iznosi 3700 $\mu\text{g/kg t.m.}$

Na **Slici 1** se može vidjeti koliki udio populacije konzumenata spada u određeni raspon izloženosti (npr. u rasponu od 0,59 do 333,82 $\mu\text{g/kg t.m.}$ izloženosti nalazi se 61,6% konzumenata itd.). Na **Slici 2** vidljivo je da je 99,6 % populacije konzumenata ispod ADI vrijednosti.



Slika 1. Distribucija vjerojatnosti izloženosti



Slika 2. Kumulativna distribucija izloženosti

Tablica 10. Usporedba izloženosti prema spolu ($\mu\text{g/kg t.m.}$)

Ukupni br. ispitanika=1501	MUŠKI	ŽENSKI
N	715	786
Najmanja	0,59	0,76
Najveća	5085,64	5717,92
Medijan	187,81	196,43
Prosječna izloženost	396,35	442,01
St. devijacija izloženosti	562,32	648,00
St. pogreška	21,030	24,234
Izloženost populacije u usporedbi s ADI-em		
Broj ispitanika ispod ADI-a	713	782
Broj ispitanika IZNAD ADI-a	2	4
Postotak ispitanika IZNAD ADI-a	0,3%	0,5%

Tablica 11. Određivanje statistički značajne razlike između spolova

Usporedba između MUŠKIH i ŽENSKIH T - test za nezavisne uzorke	
Združena st. devijacija	608,69
t vrijednost	-1,451
p vrijednost	0,147
Cohenov D	0,08
Rezultat NE postoji statistički značajna razlika u prosječnim vrijednostima izloženosti [$\mu\text{g/kg t.m.}$] između muškog i ženskog spola pri nivou signifikantnosti od 5%	
Cohenov D smjernice* D ~ 0,20 -> mala razlika D ~ 0,50 -> umjerena razlika D > 0,80 -> velika razlika	

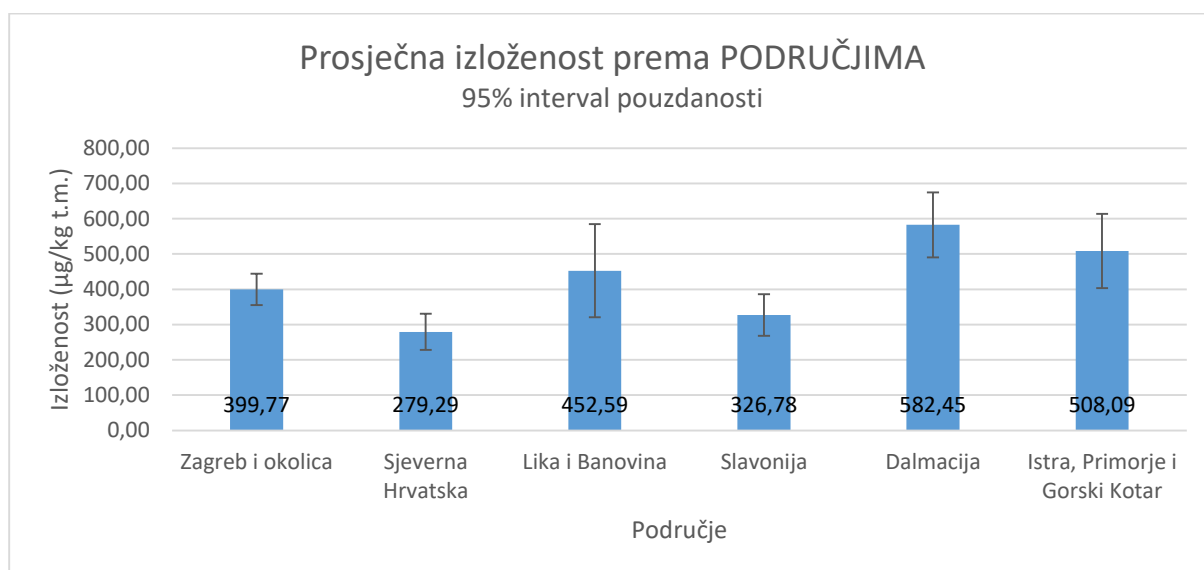
*Cohen J (1977). Statistical power analysis for the behavioral sciences.

U **Tablici 10** prikazana je izloženost nitratima u muškoj i ženskoj populaciji, dok su u **Tablici 11** prikazani podaci o statistički značajnoj razlici između spolova. Vidljivo je da na nivou signifikantnosti od 5% nema statistički značajne razlike među spolovima, odnosno ne može se reći da je jedan od spolova više izložen nitratima od drugog.

Tablica 12. Statistički pokazatelji prema geografskom području ($\mu\text{g/kg t.m}$)

95% IP	Ukupan broj=1501	Zagreb i okolica	Sjeverna Hrvatska	Lika i Banovina	Slavonija	Dalmacija	Istra, Primorje i Gorski Kotar
	N	379	278	115	241	308	180
	Najmanja	0,59	0,96	0,61	0,85	0,79	0,94
	Najveća	2580,14	3089,08	4181,61	2472,32	5085,64	5717,92
	Medijan	254,43	124,58	173,91	140,26	283,09	226,97
	Prosječna izloženost	399,77	279,29	452,59	326,78	582,45	508,09
	St. devijacija izloženosti	439,18	433,34	721,70	466,37	826,17	719,76
	St. greška	22,56	25,99	67,30	30,04	47,08	53,65
	Niža granica	355,56	228,35	320,69	267,90	490,19	402,94
	Viša granica	443,99	330,23	584,50	385,67	674,72	613,24
	95% pogreška	44,22	50,94	131,90	58,88	92,27	105,15
	UKUPNA IZLOŽENOST u usporedbi s ADI	Zagreb i okolica	Sjeverna Hrvatska	Lika i Banovina	Slavonija	Dalmacija	Istra, Primorje i Gorski Kotar
	Broj osoba izloženih ispod ADI-a	0	0	1	0	4	1
	Ukupna izloženost IZNAD ADI-a	0%	0%	1%	0%	1%	1%
	Ukupna izloženost ISPOD ADI-a	100%	100%	99%	100%	99%	99%

Prema **Tablici 12**, nitratima su u prosjeku najviše izloženi konzumenti s područja Dalmacije (582,45 $\mu\text{g/kg t.m.}$), dok su najniže izloženi konzumenti iz Sjeverne Hrvatske (279,29 $\mu\text{g/kg t.m.}$). Također, iz Dalmacije je i najviše konzumenata koji su nitratima izloženi iznad ADI vrijednosti (iako se radi o svega 4 ispitanika).



Slika 3. Prosječna izloženost prema područjima

Slika 3 prikazuje prosječnu izloženost ispitanika prema geografskim područjima. „Crtu pogreške“ na stupcima predstavljaju nižu i višu granicu za 95%-tni interval pouzdanosti prave prosječne izloženosti.

4. Karakterizacija rizika

Na temelju rezultata procjene izloženosti može se vidjeti da iako vrijednosti nitrata u istraživanom povrću nisu prelazile zakonom propisan NDK, u 0,4 % populacije konzumenata bi moglo doći do prekoračenja toksikološke granice (ADI) od 3,7 mg/kg t. m.

Međutim, bitno je navesti nesigurnosti vezane za ovu procjenu rizika. Prilikom izračuna izloženosti nitratima, ImproRisk uzima u obzir prosječnu vrijednost količine nitrata u grupi povrća, a ne pojedinačno po vrsti. Prosječna količina nitrata u povrću izračunata je kao srednja vrijednost bez obzira koliki je udio tog povrća prema prehrambenim navikama. Npr. rukola utječe na povećanje srednje vrijednosti jer je u njoj određena najveća količina nitrata, a rjeđe se konzumira u odnosu na ostalo povrće. Prema tome, može se zaključiti da vrsta povrća više doprinosi povećanju izloženosti, nego količina unesene hrane što je zaključila i EFSA (2010).

S obzirom da su ovo rezultati za sirovo povrće, a nitrati se u određenoj količini gube uobičajenim postupcima pripreme (pranje, guljenje, ljuštenje, termičke obrade i sl.), vrlo je vjerojatno da se niti kod tih potrošača neće pojaviti štetni utjecaj na zdravlje.

ZAKLJUČCI

Nitrati su utvrđeni u svom ispitivanom povrću, u različitim količinama, ali ispod NDK (za ono povrće za koje je propisan).

U povrću za koje je propisan NDK (špinat, blitva i rukola), vrijednosti nitrata su bile puno veće nego u ostalom povrću. Stoga se može zaključiti kako te vrste povrća najviše doprinose izloženosti nitratima. Uobičajenom praksom pripreme povrća (pranje, guljenje, ljuštenje, termičke obrade i dr.), smanjuje se količina nitrata, stoga je stvarni unos nitrata znatno manji od količina utvrđenih u sirovom povrću.

Količine nitrata u istraživanom povrću slične su vrijednostima koje su utvrđene u istom povrću u ostalim zemljama EU te se može prihvatiti EFSA-in zaključak kako su koristi od konzumacije raznolikog povrća veće od potencijalnog rizika štetnog djelovanja nitrata.

U skladu s procjenom izloženosti, rizik od štetnog djelovanja nitrata iz ispitivanog povrća na zdravlje je zanemariv.

Konzumacija povrća obuhvaćenog ovim istraživanjem temelj je prehrane koja tijelu osigurava optimalan unos kalorija, vitamina, minerala i tekućine, te optimalan omjer bjelancevina, ugljikohidrata i masti. Zadovoljavanje potreba organizma za gradivnim, energetske i zaštitnim tvarima, u ovom slučaju ima veću vrijednosti nego štetni utjecaj od nitrata.

PREPORUKE

Zbog nedovoljno podataka o količinama nitrata u hrani spremnoj za konzumaciju, preporuča se provođenje takve vrste istraživanja kako bi se točnije mogla utvrditi izloženost. Osim toga, preporuča se nastavak istraživanja koje bi obuhvatilo i drugo povrće i voće (osobito šljive), a gdje bi se rezultati mogli primijeniti i na populaciju vegetarijanaca i djece, koji nisu bili obuhvaćeni u ovoj procjeni, s obzirom da za njih trenutno ne postoje podaci o prehranbenim navikama.

Nadalje, rezultati ovakvih istraživanja mogu doprinijeti i nadopuni postojeće legislative, odnosno postavljanju NDK za nitrate za vrste povrća i voća za koje trenutno nisu postavljeni.

DOKUMENTACIJA DOSTAVLJENA HAH-U

- Završno izvješće o provedbi i rezultatima projekta „UTVRĐIVANJE KOLIČINE NITRATA U ZELENOM LISNATOM POVRĆU NA TRŽIŠTU RH“ - Zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Služba za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju, Odjel za zdravstvenu ispravnost hrane i predmeta opće uporabe, Zagreb, 17.12.2012. godine
- Završno izvješće o provedbi i rezultatima projekta „UTVRĐIVANJE KOLIČINE NITRATA U ZELENOM LISNATOM POVRĆU NA TRŽIŠTU RH“ - Zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Služba za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju, Odjel za zdravstvenu ispravnost hrane i predmeta opće uporabe, Zagreb, 17.12.2013. godine

LITERATURA (REFERENCE)

1. AESAN, Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (2011): Report from the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in relation to the risk assessment of infants and young children's exposure to nitrates resulting from the consumption of chard in Spain. *Journal Revista del Comité Científico de la AESAN* Nº 14, 65-88.
2. Alonso Vega LA, Gutiérrez Conde MLG, Canduela Martínez VC, Hernández Herrero MH, Tazón Varela MT i Pérez Mier LAP (2007): Metahemoglobinemia en una lactante por consumo de puré vegetal. *Emergencias*, 19, 283-285.
3. Andrews M (1986): The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants: mini-review. *Plant Cell Environ.* 9, 511-519.
4. Anonymous, (2002): Cultural advice to growers. U: *Crop Specific Protocol – Protected Lettuce 302*. Assuredd Produce Ltd. Issue No. 1/2002, 13.
5. Bryan NS, Fernandez BO, Bauer SM, Garcia-Saura MF, Milsom AB, Rassaf T, Maloney RE, Bharti A, Rodriguez J i Feelisch M (2005): Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nat.Chem.Biol.* 1, 290-297.
6. Bartholomew B i Hill MJ (1984): The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate. *Food and Chemical Toxicology*, 22 (10), 789-795.
7. Camargo JA i Alonso A (2006): Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International* 32, 831-849.
8. Czarniecka-Skubina E i Golaszewska B (2001): Wpływ procesu kulinarnego na jakość wybranych warzyw. *Zywn. Technol. Jak.* 2, 103-116.
9. Chung JC, Chou SS i Hwang DF (2004): Changes in nitrate and nitrite content of four vegetables during storage at refrigerated and ambient temperatures. *Food Additives and Contaminants*, 21, 317-322.
10. Dich J, Jarvine R, Knekt P i Penttil PL (1996): Dietary intakes of nitrate, nitrite and NDMA in the Finnish Mobile Clinic Health Examination Survey. *Food Additives & Contaminants* 13, 541-552.
11. Da-Silva SS, Sajan IS i Underwood JP (2003): Congenital methemoglobinemia: a rare cause of cyanosis in the newborn-A case report. *Pediatrics*, 112 (2), 158-e161.
12. Dejonckheere W, Steurbaut W, Drieghe S, Verstraeten R i Braeckman H (1994): Nitrate in food commodities of vegetable origin and the total diet in Belgium 1992-1993. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 12, 359-370.

13. EFSA, European Food Safety Authority (2008): Nitrate in vegetables. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*, 689, 1-79.
14. EFSA European Food Safety Authority (2010): Statement on possible public health risks for infants and young children from the presence of nitrates in leafy vegetables. *The EFSA Journal*, 8 (12), 1935.
15. EC, European Commission (1997): Opinion on nitrate and nitrite. Reports of the Scientific Committee for Food (SCF) 38th Series, 1-33. Dostupno na:
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/reports/scf_reports_38.pdf (13.07.2016.)
16. Ezeagu IE (1996): Nitrate and nitrite contents in ogi and the changes occurring during storage. *Food Chemistry* 56, 77–79.
17. Ezeagu IE i Fafunso MA (1995): Effect of wilting and processing on the nitrate and nitrite contents of some Nigerian leaf vegetables. *Nutrition and Health*, 10, 269-275.
18. FAO/WHO Food and Agriculture Organisation of the United Nations/World Health Organization (1996): Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Nitrate. Safety evaluation of certain food additives. Food Additives Series 35. Dostupno na:
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je14.htm> (12.07.2016.)
19. FAO/WHO, Food and Agriculture Organisation of the United Nations/World Health Organization (2003a): Nitrate (and potential endogenous formation of N-nitroso compounds). WHO Food Additive series 50, Geneva: World Health Organisation. Dostupno na: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je06.htm> (12.07.2016.)
20. FAO/WHO, Food and Agriculture Organisation of the United Nations/World Health Organization (2003b): Nitrite (and potential endogenous formation of N-nitroso compounds). WHO Food Additive series 50, Geneva: World Health Organisation. Dostupno na: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je05.htm> (13.07.2016.)
21. Gangolli SD, van den Brandt PA i Feron VJ (1994): Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *European Journal of Pharmacology*, 292, 1-38.
22. Gilchrist M, Winyard PG i Benjamin N (2009): Dietary nitrate – Good or bad?. *Nitric Oxide*, 22 (2010) 104-109.
23. Greer FR i Shannon M (2005): Infant methemoglobinemia: the role of dietary intake in food and water. *Pediatrics*, 16, 784-786.
24. Greenwood DJ i Hunt J (1986): Effect of nitrogen fertilizer on the nitrate contents of field vegetables grown in Britain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37, 373-383.

25. Golaszewska B i Zalewski S (2001): Optimisation of potato quality in culinary process. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 10, 59-64.
26. Gómez Lumbreras AG, Solaz Moreno LS i Villar Rubin SV (2008). Intoxicación por puré de acelgas. *Anales de pediatría*, 69 (3), pp: 279-291.
27. Herranz M i Clerigué N (2003): Intoxicación en niños. Metahemoglobinemia. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26, 209-223.
28. HZN, Hrvatski zavod za norme (1997): Norma Namirnica – *Određivanje količine nitrata i/ili nitrate. Dio: Metoda tekućinske kromatografije visokog učinka (HPLC)/ metoda kromatografije s ionskim izmjenjivačem (IC) za određivanje količine nitrata u povrću i proizvodima od povrća* (EN 12014-2:1997), HRN EN ISO/IEC 17015.
29. IARC, International Agency of Research in Cancer (2010): IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Ingested Nitrate and Nitrite and Cyanobacterial Peptide Toxins. Volume 94, 1-325. Dostupno na: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol94/index.php> (18.07.2016.)
30. IPCS, International Programme on Chemical Safety (1999): *Nitrates and nitrites*. Poisons Information Monograph (Group Monograph) G016.
31. Improvast (2016): Improrisk v1.3.1 (računalni program): Dostupno na: <http://www.improrisk.com/>.
32. JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1995): *Nitrate and nitrite. Evaluation of Certain Food Additives*. Forty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Who Technical Report Series 859. TRS 859-JECFA 44/29,32.
33. JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2002): *Nitrate and nitrite. Evaluation of Certain Food Additives*. Fifty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Who Technical Report Series 913. TRS 913-JECFA 59/75.
34. JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food (2003): *Nitrate (and potential endogenous formation of Nnitroso compounds)*. Safety evaluation of certain food additives. Who Food Additives Series: 50.
35. Laporta Báez YL, Goñi Zaballo MG, Pérez Ferrer AP, Palomero Rodríguez MAP, Suso B i García Fernández JG (2008): Metahemoglobinemia asociada a la ingesta de acelgas. *Anales de pediatría*, 69, 191-192.
36. Lundberg JO, Weitzberg E, Cole JA i Benjamin N (2004): Nitrate, bacteria and human health. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 593-602.

37. Lundberg JO, Feelisch M, Bjorne H, Jansson EA i Weitzberg E (2006): Cardioprotective effects of vegetables: is nitrate the answer? *Nitric Oxide*, 15, 359-362.
38. Lundberg JO, Weitzberg E i Gladwin MT (2008): The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7, 156-167.
39. McKinney PA, Parslow R i Bodansky HJ (1999): Nitrate exposure and childhood diabetes. *Special Publication of Royal Society of Chemistry*, 237, 327 –339.
40. Mensinga TT, Speijers GJ i Meulenbelt J (2003): Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. *Toxicological Review* 22, 41-51.
41. Mozolewski W i Smoczynski S (2004): Effect of culinary processes on the content of nitrates and nitrites in potatoes. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3, 357-361.
42. Pate JS (1973): Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biology&Biochemistry*, 5, 109-119.
43. Phillips WEJ (1968): Changes in the nitrate and nitrite contents of fresh and processed spinach during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16, 88–91.
44. Pérez-Caballero C, Pérez A i Moreno L (2005): Probable methemoglobinemia tras la administración de EMLA. *Anales de pediatría*, 63, 179-180.
45. *Pravilnik o najvećim dopuštem kolilčinama kontaminanata u hrani* (2008). Narodne Novine, br. 154/2008. i 78/2011.
46. *Pravilnik o planu uzorkovanja i metodama analiza za službenu kontrolu količina nitrata u hrani* (2008). Narodne Novine, br. 42/08.
47. Rytel E, Gołubowska G, Lisinska G, Peksa A i Aniołowski K (2005): Changes in glycoalkaloid and nitrate contents in potatoes during French fries processing. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 879–882.
48. Sánchez-Echaniz J, Benito J i Mintegui S (2001): Methemoglobinemia and consumption of vegetables in infants. *Pediatrics*, 107, 1024-1028.
49. Speijers GJA, van Duijvenbooden W i Matthijsen AJCM (1989): *Integrated criteria document nitrate; effects. Appendix to RIVM Report No. 758473012*. Bilthoven, National Institute for Public Health and the Environment. RIVM Report No. A758473012.
50. Thomsom B (2004): *Nitrates and nitrites dietary exposure and risk assessment*. Institute of Environmental Science & Research Limited. Dostupno na:
http://www.foodsmart.govt.nz/elibrary/nitrates_nitrites_dietary.pdf (05.07.2016.)

51. Uredba Komisije 1881/2006/EZ Europskoga parlamenta i vijeća do 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani. Službeni list Europskih zajednica, L 364/5.
52. Uredba Komisije 420/2011/EZ Europskoga parlamenta i vijeća do 29. travnja 2011. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1881/2006 o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani. Službeni list Europskih zajednica, L 111/3.
53. Uredba Komisije 1258/2011/EZ Europskoga parlamenta i vijeća do 02. prosinca 2011. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1881/2006 u pogledu najvećih dopuštenih količina za nitrate u hrani. Službeni list Europskih zajednica, L 320/15.
54. Van Eysinga R (1984): Nitrate and glasshouse vegetables. *Fertilizer Research*, 5, 149-156.
55. Van Velzen AG, Sips AJAM, Schothorst RC, Lambers AC i Meulenbelt J (2008): The oral bioavailability of nitrate rich vegetables in humans. *Toxicological Letters*, 181, 177-181.
56. Weightman RM, Dyer C, Buxton J i Farrington DS (2006): Effects of light level, time of harvest and position within field on variability of tissue nitrate concentration in commercial crops of lettuce (*Lactuca sativa*) and endive (*Cichorium endiva*). *Food Additives and Contaminants*, 23, 462–469.
57. Wallace W (1986): Distribution of nitrate assimilation between the root and shoot of legumes and a comparison with wheat. *Physiologia Plantarum*, 66, 630 – 636.
58. Walker R (1990): Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Additives and Contaminants*, 7, 717-768.
59. WHO, World Health Organization (2005b): *Dietary intake of fruit and vegetables and risk of diabetes, mellitus and cardiovascular diseases prepared by Bazzano, L.C.* Background paper for the Joint FAO/WHO workshop on fruit and vegetables for health 1-3 September 2004, Kolbe, Japan. Dostupno na: http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/f&v_cvd_diabetes.pdf (12.07.2016.)
60. WHO, World Health Organization (2011): Nitrate and nitrite in drinking-water; Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. WHO, Geneve. Dostupno na: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/chemicals/nitratenitrite2ndadd.pdf (13.07.2016.)