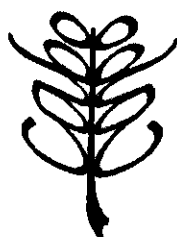


**Onderzoek naar de nitrosering van
N-houdende verbindingen in groentes**

H.G.M. Tiedink en J.A.R. Davies

**CABO-verslag nr. 112
1989**



Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek
Postbus 14, 6700 AA Wageningen, The Netherlands

Inhoudsopgave

	Blz.
Samenvatting	1
Summary	2
1. Inleiding	3
2. Materialen en methoden	4
3. Resultaten	13
4. Discussie	34
5. Conclusie	39
6. Referenties	42
Appendix A + B	

Samenvatting

Eenendertig Nederlandse groentes werden onderzocht op de aanwezigheid van precursors van direct-mutagene N-nitroso-verbindingen. Hiertoe werden water-extracten van groentes behandeld met nitriet. Daarna werd het totaal gehalte aan N-nitroso-verbindingen gemeten met behulp van een "Thermal Energy Analyser" en de mutagene activiteit bepaald met behulp van een bacterie-test (*S. typhimurium* test). Alle met nitriet behandelde extracten bevatten N-nitroso-verbindingen, met gehaltes variërend van 23 tot 789 nmol/25 mg drogestof. Ongeveer de helft van de groentes was mutageen na behandeling met nitriet. Mutageen was gedefinieerd als het aantal revertanten in een behandeld extract tenminste 2 x zo hoog was als in onbehandeld extract. Brassica groentes bevatten hoge gehaltes aan N-nitroso-verbindingen en waren op één na, allen mutageen na behandeling met nitriet.

Ook werd het glucosinolaatgehalte in de drogestof van de groentes bepaald. Alleen crucifere groentes bevatten glucosinolaten, met gehaltes variërend van 1,8 tot 26,0 $\mu\text{mol/g}$ drogestof. Het glucosinolaatgehalte in de groentes bleek significant ($P > 0,01$) gecorreleerd te zijn met de hoeveelheid N-nitroso-verbindingen die in groente-extracten gevormd werd door behandeling met nitriet ($r = 0,95$, berekend uitgaande van vers gewicht). Wanneer de glucosinolaten werden onderverdeeld in aryl/alkyl- en indolylglucosinolaten, dan bleef de correlatie significant voor beide subgroepen ($r = 0,93$ en $0,95$ respectievelijk). Hieruit zou geconcludeerd kunnen worden dat glucosinolaten betrokken zijn bij de vorming van N-nitroso-verbindingen in groentes.

In de drogestof van de groentes werden de gehaltes aan vrije aminozuren bepaald. Van de nitroseerbare aminozuren waren alleen de proline-gehaltes significant gecorreleerd ($P < 0,01$) met de hoeveelheid N-nitroso-verbindingen die in de groente-extracten werd gevormd door de nitrietbehandeling ($r = 0,96$, berekend uitgaande van vers gewicht). Metingen met behulp van HPLC, gekoppeld aan een fotohydrolyse detector, toonden aan dat N-nitrosoproline in een genitroseerd spruitenextract aanwezig was. Hiermee werd aangetoond dat proline een precursor van N-nitroso-verbindingen is in groentes.

Summary

More than 30 vegetables were screened for their potential to form biologically active N-nitroso compounds upon treatment with nitrite acidic conditions. The total N-nitroso content was determined in the nitrite-treated and untreated extracts of the vegetables according to a modified method of Walters et al. (Analyst. Lond. 1978, 103, 1127). All treated extracts contained N-nitroso compounds at levels ranging from 23 to 789 nmol/25 mg dry matter. In the same samples the mutagenic activity was determined using the Salmonella typhimurium assay. About half of the vegetables were found to be mutagenic upon nitrite treatment. (Nitrite-treated extracts were considered to be mutagenic if the number of induced revertants was at least twice as high as that induced by the corresponding untreated extract.)

The content of different glucosinolates in the dry matter of the vegetables was also determined. Glucosinolates could be detected only in cruciferous vegetables, at levels ranging from 1.8 to 26.0 $\mu\text{mol/g}$ dry matter. Although the nitrite-extracts of brassica species contained more N-nitroso compounds and induced more revertants than did other vegetables, there was no significant correlation between these parameters. However, the amounts of N-nitroso compounds formed upon nitrite treatment (expressed per fresh weight) did correlate significantly ($P < 0.01$) with the amounts of glucosinolates ($r = 0.95$). When the glucosinolates were divided into aryl/alkyl- and indolyl-glucosinolates, the significant correlation was maintained for both subgroups ($r = 0.93$ and 0.95 , respectively). From this it can be concluded that glucosinolates are probably involved in the formation of N-nitroso compounds in certain nitrite-treated vegetables. The amino acids were determined in the dry matter of the vegetables. From the nitrosatable amino acids, only the levels of proline were significantly correlated ($P < 0.01$) with the amounts of N-nitroso compounds formed upon nitrite treatment ($r = 0.96$, calculated per fresh weight).

HPLC-measurements in combination with a photohydrolysis detector showed that N-nitrosoproline was present in a nitrosated Brussels sprouts extract. This indicates that proline is one of the precursors of N-nitroso compounds in vegetables.

1. Inleiding

N-nitroso-verbindingen zijn verbindingen die gevormd kunnen worden uit NO_2^- en een secundair/tertiair amine of amide. Niet-vluchtige N-nitroso-verbindingen zijn direct mutagene verbindingen, vluchtige N-nitroso-verbindingen moeten metabool geactiveerd worden alvorens zij een mutagene werking kunnen uitoefenen. Voor veel N-nitroso-verbindingen is aangetoond dat ze reeds bij lage doses tumoren kunnen induceren bij verschillende soorten proefdieren (Preussmann 1984). In epidemiologisch onderzoek, "case" onderzoek en in-vitro onderzoek zijn geen aanwijzingen gevonden dat N-nitroso-verbindingen voor de mens niet carcinogeen zullen zijn (Bartsch en Montesano 1984).

De afgelopen 10-15 jaar is veel onderzoek gedaan naar de vorming, werking en het voorkomen van vluchtige N-nitroso-verbindingen. Spiegelhalder (1983) onderzocht in Duitsland circa 3000 voedingsmiddelen. In twee categorieën van producten, namelijk in met mout bereide dranken en in bewerkte vleesprodukten, met name in gebakken bacon, werden consequent hoge concentraties N-nitrosaminen gevonden. Andere onderzoekers over de gehele wereld bevestigden dit, hoewel de concentraties van onderzoeker tot onderzoeker varieerden. In gebakken bacon werd maximaal een hoeveelheid van $200 \mu\text{g/kg}$ N-dimethylnitrosamine/N-pyrrolidine (NDMA/NPYR) gevonden (Gough et al. (1977)). In bier was de concentratie aan NDMA maximaal $68 \mu\text{g/kg}$ (Spiegelhalder 1983). Inmiddels zijn de productieprocessen van de genoemde en tal van andere produkten aanmerkelijk verbeterd, waardoor de concentratie vluchtige N-nitrosaminen in voedingsmiddelen drastisch is gedaald (Institute of Food Technologists' Expert Panel on Food Safety and Nutrition 1987).

De mens neemt met zijn voeding naast de reeds gevormde N-nitroso-verbindingen ook precursors van deze verbindingen op, waaruit endogeen N-nitroso-verbindingen gevormd kunnen worden. Groenen et al. (1984) toonden vluchtige N-nitrosaminen aan in het maagsap van gezonde personen, na de consumptie van nitraatrijke maaltijden. Ongeveer 25 % van het NO_3^- in het voedsel wordt opgenomen in het speeksel, 20 % hiervan wordt in de mondholte door bacteriën gereduceerd tot NO_2^- (Spiegelhalder 1976). De op deze wijze gevormde hoeveelheid NO_2^- is vele malen hoger dan de eigenlijke NO_2^- opname. Gemiddeld wordt driekwart van de dagelijkse NO_3^- opname geleverd door groentes (Ellen en Schuller 1983).

Het is niet uitgesloten dat de endogene vorming van N-nitroso-verbindingen van meer betekenis is dan de opname van reeds gevormde N-

nitroso-verbindingen. Tegenwoordig richt veel onderzoek zich daarom op de endogene vorming. In-vitro kan de endogene vorming worden nagebootst door extracten van voedingsmiddelen met NO_2^- en gesimuleerd maagsap te incuberen. In op deze wijze behandelde extracten van "pickled vegetables" (groentes in 't zuur) (Wakabayashi et al. 1984), Chinese kool (Wakabayashi et al. 1985) en tuinbonen (Piacsek-Llanes en Tannenbaum 1982) werden direct mutagene produkten aangetoond. De mutagene componenten in Chinese kool en tuinbonen werden geïsoleerd en de precursor-verbindingen werden geïdentificeerd als respectievelijk indool-3-acetonitril (Wakabayashi et al. 1985) en 4-chloro-6-methoxyindool (Yang et al. 1984). Indoolverbindingen zijn verbindingen, welke in de plant voorkomen in de vorm van een glucosinolaat. Genitroseerde indoolverbindingen zijn niet-vluchtige verbindingen.

In eerder onderzoek bij het CABO was gebleken dat ook het merendeel van de N-nitroso-verbindingen, gevormd in genitroseerde sla + vis extracten bestond uit niet-vluchtige componenten. Gezien bovenstaande bevindingen rees de vraag: Komen in Nederlandse groentes N-houdende verbindingen voor, welke met nitriet endogeen kunnen reageren tot direct mutagene (niet-vluchtige) N-nitroso-verbindingen? Het doel van dit onderzoek was antwoord te geven op een deel van deze vraag; Bevatten Nederlandse groentes precursors van direct mutagene N-nitroso-verbindingen? Mogelijk kunnen hierdoor in de toekomst bij de vaststelling van kwaliteitsnormen voor groentes, het gehalte aan N-nitroso-precursors en/of het totaal gehalte aan N-nitroso-produkt en mutagene activiteit na nitrosering, als parameters worden gehanteerd.

2. Materialen en methoden

In de hieronder volgende methoden zijn alle chemicaliën tenminste van analytische kwaliteit, tenzij anders vermeld.

Verwerking van verse groentes

Alle groentes werden vers gekocht bij een plaatselijke groentezaak. De groentes werden niet gewassen, vanwege kans op verhoging van het versgewicht door achterblijvend water. Zand en modder werden zoveel mogelijk met tissues verwijderd. Natte bladeren werden met tissues drooggedebd. Lelijke delen en niet-eetbare gedeelten werden verwijderd. De rest van de groentes werd klein gesneden en gewogen. Hierna werden de groentes gevriesdroogd (vriesdroger: Virtis, Gardiner, New York, USA), totdat het vriesdrooggewicht circa 1 dag stabiel was. Het gevriesdroogde materiaal werd gemalen in een blender en daarna bewaard bij -20 °C.

Nitriet-incubatie

De gevriesdroogde groentes werden geïncubeerd met nitriet volgens de methode van Wakabayashi (1984), met enkele wijzigingen. Een hoeveelheid gevriesdroogde groente, overeenkomend met 60 g vers, werd afgewogen in een centrifugebucket en werd met demi-water aangevuld tot 80 g. Wanneer de gevriesdroogde groente op het oog goed in het water was opgelost, werd de bucket geplaatst in een schudapparaat (Griffin & George LTD, Alperston, Wembley, UK). Er werd 15 minuten geschud. Hierna werd 20 minuten gecentrifugeerd, 16.300 x g bij 0-10 °C (Sorvall RC5 superspeed centrifuge, Sorvall Newton, Conn., USA). Na filtratie werd het supernatant met een bekende hoeveelheid demi-water weer aangevuld tot 80 g. Het zo verkregen groente-extract werd verdeeld over 2 gelijke porties van 40 g. Beide extracten werden op pH 2 gebracht met 6 mol/l HCl. Aan één van de porties werd NaNO_2 toegevoegd (eindconcentratie 40 mmol/l) en werd daarna weer op pH 2 gebracht. Aan de andere portie werd i.p.v. een NaNO_2 oplossing, een gelijke hoeveelheid demi-water toegevoegd. Beide extracten werden 1 uur in het donker geïncubeerd bij 37 °C. Tevens werden twee blanco-oplossingen geïncubeerd, een NaNO_2 -oplossing (40 mmol/l) en demi-water. De nitroseringsreactie werd gestopt door toevoeging van ammoniumsulfamaat (1.2 x de equimolaire hoeveelheid van NO_2) aan alle incubaten. Van elk incubaat werd een 1 ml monster genomen voor de totaal N-nitroso-bepaling. Hierna

werden de incubaten op pH 8 gebracht met NaOH-oplossingen. Weer werden 1 ml monsters genomen voor de N-nitroso-bepaling. Bovendien werden monsters genomen voor de mutageniteitstest. Zowel de N-nitroso-bepaling als de mutageniteitstest werden binnen 3 uur na het beëindigen van de incubatie uitgevoerd.

Totaal N-nitroso-bepaling

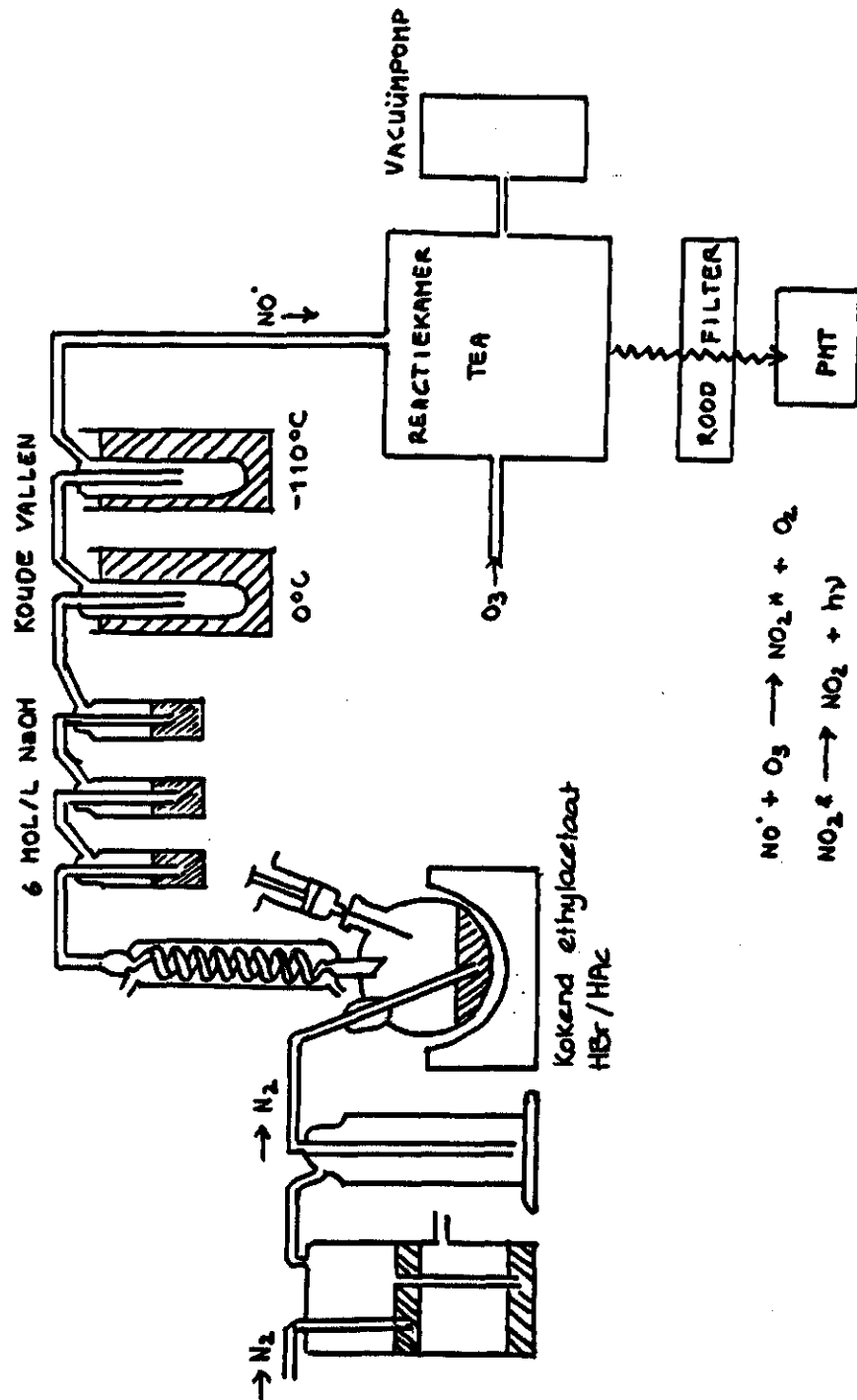
Het totale N-nitroso-gehalte van de monsters werd bepaald volgens de methode van Walters et al. (1978). Deze methode is gebaseerd op de chemische denitrosering van N-nitroso-verbindingen door HBr/azijnzuur (150 g/l) in refluxend ethylacetaat. Het daarbij vrijkomend nitrosylradicaal wordt door een draaggas (zeer zuiver N₂) de Thermal Energy Analyser (TEA, Thermo Electron Corp., Waltham, USA) ingevoerd, welke als NO_x-detector dient. Verontreinigingen, meegevoerd door het draaggas worden verwijderd in wasflessen gevuld met 6 mol/l NaOH en 2 koude vallen (0 °C - water/ijs en -110 °C - isopentaan in vloeibare N₂). De gehele opstelling bevat uitsluitend glas- en teflonleidingen. Zie figuur 1.

Van de incubaten werd 2.5 µl in de refluxende ethylacetaat met HBr/azijnzuur geïnjecteerd. De daarbij behorende respons van de TEA werd gecorrigeerd voor de blanco-bepalingen en voor een eventuele respons van het monster, gemeten in refluxende ethylacetaat met HCl/azijnzuur. De HCl/azijnzuur meting corrigeert voor responses, afkomstig van componenten anders dan N-nitroso- en C-nitroso-verbindingen (Pignatelli et al. 1986). Geen van de groentes gaf echter in de HCl/azijnzuur meting een respons.

Voor berekening van het gehalte aan N-nitroso-verbindingen werd de gecorrigeerde respons vergeleken met een calibratiecurve, gemaakt met verschillende NO₂-standaardoplossingen. De detektiEGrens voor deze bepaling onder de gebruikte meetcondities van de TEA (druk: 1333 Pascal, attenuation: 16) was 5 µmol N- nitroso-verbindingen per liter.

Mutageniteitstest

Een Salmonella typhimurium plaatstest werd uitgevoerd met een TA100 bacteriestam zonder S-9 mix, zoals beschreven door Ames et al. (1975), met enkele wijzigingen, welke beschreven zijn door van der Hoeven et al. (1983).



Figuur 1. Schematische weergave Thermal Energy Analyser (TEA) opstelling.

In het kort komt deze test op het volgende neer: Een histidine-behoefte, repair-deficiënte, niet-virulente bacteriestam wordt overgebracht op een histidine-arm medium. De te testen stof wordt toegediend. Indien deze stof in staat is om basepaarsubstituties te veroorzaken, welke leiden tot terugmutaties naar histidineprototrofie, dan kunnen de bacteriën uitgroeien tot kolonies. Het aantal kolonies is een maat voor de mutageniteit.

Omdat incubatie van de groente-extracten en monstername op aseptische wijze waren uitgevoerd, was het niet nodig de monsters voorafgaand aan de test te steriliseren.

Iedere groente werd in tenminste 2 afzonderlijke experimenten in 4 concentraties, elk in triplo, getest. Namelijk:

0,2 ml monster + 0,8 ml gedestilleerd water

0,5 ml + 0,5 ml

0,8 ml + 0,2 ml

1,0 ml + 0,0 ml

Het aantal revertanten (terugmutanten) in behandelde groente-extracten werd verminderd met het aantal revertanten in de onbehandelde groente-extracten. Van de resulterende aantallen revertanten werden dosis-respons curves gemaakt. De mutagene activiteit van de groente-extracten na behandeling met nitriet werd bepaald uit het lineaire deel van deze curves. Voor alle groentes viel de dosis 25 mg binnen het lineaire deel, zodoende wordt de mutagene activiteit uitgedrukt als het aantal revertanten per 25 mg droge stof (per 25 mg vers). Een met NO_2^- behandelde groente werd mutageen bevonden als het aantal revertanten in het met NO_2^- behandelde extract minstens 2x zo hoog was als in het niet behandelde extract.

In elk experiment werd een blanco (geïncubeerde nitrietoplossing) en een positieve controle (1 μg methyl N-nitroso guanidine (MNNG) per plaat) in triplo meegenomen. Gemiddeld aantal revertanten in de blanco: 110 ± 25 en in de positieve controle: 775 ± 187 .

Glucosinolaatbepaling

De glucosinolaatbepalingen werden uitgevoerd bij het RIKILT (B.G. Muuse en H.J. van der Kamp, afdeling Koolhydraat- en Vetchemie) volgens een aldaar ontwikkelde methode (Muuse en v.d. Kamp 1987).

De gevriesdroogde groentes werden gedurende enkele minuten in een kokend waterbad gehouden om enzymen die de glucosinolaten hydrolyseren te inactiveren. Hierna werd een interne standaard (glucotropaeolin)

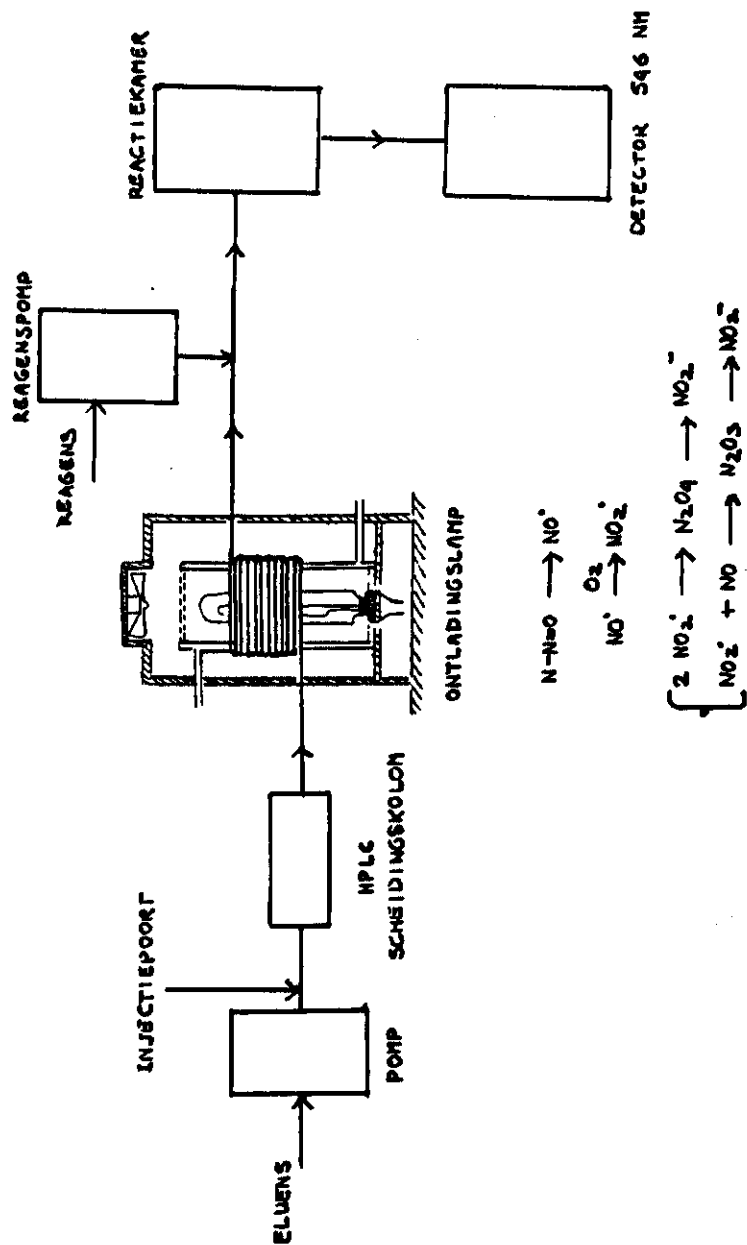
toegevoegd. Na centrifugeren werden de glucosinolaten uit het supernatant op een anionwisselaar gebracht (binding aan de sulfaatgroep van het glucosinolaat). Na enzymatische desulfatie werden de glucosinolaten geëluëerd en vervolgens gescheiden met HPLC. Meetcondities: Lichrosorb RP 18 kolom, flow: 1,5 ml/minuut, eluens gradiënt van 100 % H₂O naar 25 % (v/v) acetonitril in 20 minuten. De glucosinolaten werden gedetecteerd m.b.v. UV (229 nm) en gekwantificeerd aan de hand van glucotropaeolin. De HPLC-elutie volgorde was: glucoiberin (1,13), progoitrin (1,15), sinigrin (1,05), glucoalyssin (1,13), glucoraphanin (1,13), gluconapin (1,17), 4-hydroxyglucobrassicin (0,29), glucotropaeolin, 4-methylbutenylglucosinolaat (0,52), glucobrassicin (0,31), glucosturtiin (1,00), 4-methoxyglucobrassicin (0,26), neoglucobrassicin (0,21). Tussen haakjes is de relatieve respons factor van de componenten in vergelijking met glucotropaeolin bij 229 nm weergegeven.

HPLC-fotohydrolyse detector

Om te controleren of proline uit een groente-extract kan bijdragen aan het totaal N-nitroso-produkt, werd een groente-extract 2 uur in plaats van 1 uur geïncubeerd op bovenstaande wijze en vervolgens geanalyseerd met HPLC, welke gekoppeld was aan een fotohydrolyse detector. Via deze methode, welke beschreven is door Shuker & Tannenbaum (1983), worden N-nitroso-verbindingen eerst van elkaar gescheiden. Vervolgens worden door een ontladingslamp (golflengte 420 nm) de N-nitroso-verbindingen afgebroken, waarbij een nitrosyl radicaal vrijkomt. Dit radicaal is instabiel en wordt uiteindelijk omgezet in NO₂⁻. Na de ontladingslamp wordt Griess-reagens bijgepompt. NO₂⁻ reageert hiermee tot een azoverbinding, welke spectrofotometrisch gemeten kan worden bij 546 nm. Zie figuur 2. Meetcondities HPLC: Hypersyl APS kolom 200 x 3 mm, eluens: 0,01 M fosforzuur pH 4,5, eluensflow 0,5 ml/min., Griessreagens: 5 g sulfanilamide en 0,5 g N(1-naphtylethyleendiamide-dihCl) in 1 liter 3 % (v/v) fosforzuur, reagensflow 0,5 ml/min.

Nitraat- en nitrietbepaling

Het NO₃⁻- en NO₂⁻-gehalte van de gevriesdroogde groentes werd bepaald met een Autoanalyser (Technicon Instruments b.v. Rotterdam), door de sectie Chemisch Laboratorium van het CABO.



Figuur 2. Schematische weergave HPLC-fotohydrolyse detector opstelling.

NO_3^- werd eerst gereduceerd tot NO_2^- met een Cd-reductor. NO_2^- reageert met sulfanilamide tot een diazo-component, welke met N(1-naphtyl-ethyleendiamine-diHCl) reageert tot een rozegekleurde azo-verbinding. De azo-verbinding werd spectrofotometrisch gemeten bij een golflengte van 540 nm. De detectiegrens van deze methode is 0,10 mmol NO_3^- /l.

Totale stikstofbepaling

Het totale stikstofgehalte in de gevriesdroogde groentes werd bepaald met een CHN-Rapid (W.C. Heraeus GmbH, Hanau, BRD), door de sectie Chemisch Laboratorium van het CABO.

In deze bepaling worden alle gebonden stikstofmoleculen door O_2 geoxideerd tot N_2 en NO_x . Het NO_x wordt door Cu verder geoxideerd tot N_2 . De uiteindelijke N_2 produktie is een maat voor het totale stikstofgehalte.

Aminozuurbepaling

In de gevriesdroogde groentes werden vrije aminozuren bepaald met de Pico-tag methode op HPLC. Hiertoe werden de groentes 1 uur onder reflux gekookt in 80 % ethanol. Het verkregen extract werd over een Büchner trechter gefiltreerd en tot een droog residu ingedampt met een rotatieverdamer ($t=45^\circ\text{C}$). Het residu werd in demi-water opgenomen en gefiltreerd over een Millex filter, $0.45\ \mu\text{m}$ (type SLHA025BS, Millipore SA, Molsheim, France) en vervolgens over een ultra-membraan filter (type PLGC01400, Millipore SA, Molsheim, France), waardoor de monsters ontdaan werden van hoogmoleculaire verbindingen, zoals eiwitten. De verkregen filtraten werden bewaard bij -20°C tot analyse. De uiteindelijke analyse werd uitgevoerd door de sectie chemisch laboratorium van het CABO. Hiertoe werden filtraten gederivatiseerd met phenylisothiocyanaat. Vervolgens werden de aminozuren gescheiden met HPLC, onder de volgende condities: Pico-tag kolom (for free amino acid analysis, $3,9 \times 30\ \text{cm}$) en eluens (Waters, Millipore B.V., chromatography division, Etten-Leur, Nederland), flow 1 ml/min.. Met behulp van standaarden werden de concentraties vrije aminozuren in de groentes bepaald.

Statistische bewerkingen

Lineaire regressie werd berekend met de kleinste quadraten methode. Berekende correlatie-coëfficiënten werden tweezijdig getoetst voor significantie.

De gemiddelde N-nitroso concentratie werd berekend van duplo metingen van 2 onafhankelijke experimenten. De standaard deviatie (SD) werd berekend aan de hand van de totale variantie van 4 waarnemingen.

De gemiddelde mutagene activiteit bij 25 mg $\pm$ SD werd berekend van 2 regressie curves van 2 onafhankelijke experimenten.

3. Resultaten

N-nitroso-gehalte

In tabel 1 is het totaal N-nitroso-gehalte in de groente-extracten weergegeven. De groentes zijn min of meer willekeurig onderverdeeld in kolen (Brassica's), bonen + erwt, bladgroentes, uiachtigen, knol- en vruchtgroentes en overig.

Tabel 1. Concentratie (mmol/l) totaal N-nitroso-produkt in groente-extracten al dan niet behandeld met NO_2^- , bij pH 2 en pH 8.

groente	$+\text{NO}_2^-$		$-\text{NO}_2^-$	
	le meting 2e meting		le meting 2e meting	
	pH 2/pH 8*	pH 2/pH 8*	pH 2/pH 8*	pH 2/pH 8*
bloemkool	0,49/0,33	0,49/0,41	--/--	--/--
spruiten	2,82/2,72	3,05/3,38	--/--	--/--
savoie kool	1,79/1,80	2,12/1,72	--/--	--/--
broccoli	1,33/1,26	1,60/1,30	--/--	--/--
rode kool	0,87/1,08	1,19/1,16	--/--	--/--
groene kool	1,46/1,60	2,04/2,00	--/--	--/--
spitskool	0,58/0,59	0,69/0,72	--/0.01	--/--
witte kool	0,88/0,82	0,64/0,56	--/--	--/--
koolrabi	0,25/0,23	0,35/0,31	--/--	--/--
Chineze kool	0,38/0,38	0,33/0,37	--/--	--/--
knolraap	0,15/0,13	0,14/0,11	--/--	--/--
spercieboon	0,43/0,31	0,39/0,32	--/--	--/--
snijboon	0,42/0,38	0,39/0,32	--/--	--/--
tuinboon	0,16/0,18	0,14/0,16	--/--	--/--
doperwt	0,07/0,10	0,05/0,09	--/--	--/--
capucijner	0,19/0,17	0,14/0,18	--/--	--/--
andijvie	0,12/0,18	0,10/0,36	--/--	--/--
witlof	0,40/0,38	0,41/0,45	--/--	--/--
spinazie	0,27/0,17	0,57/0,53	--/--	--/--
sla	0,15/0,33	0,28/0,30	--/--	--/--
ui	0,54/0,35	0,53/0,41	--/--	--/--
prei	0,47/0,28	0,56/0,38	--/--	--/--
rode biet	0,27/0,33	0,15/0,21	--/--	--/--
waspeen	0,02/0,12	0,08/0,22	--/--	--/--
radijs	0,26/0,24	0,37/0,38	--/--	--/--
rettich	0,25/0,23	0,28/0,27	--/--	--/--
gr. paprika	0,13/0,09	0,09/0,10	--/--	--/--
rode paprika	0,46/0,41	0,51/0,50	--/--	--/--
tomaat	0,11/0,12	0,11/0,37	--/--	--/--
komkommer	0,28/0,13	0,28/0,14	--/--	--/--
champignon	0,29/0,39	0,35/0,40	--/--	--/--

*De weergegeven concentratie zijn gecorrigeerd voor responses van NO_2^- blanco en water-blanco. ** -- betekent $< 0,01 \text{ mmol/l}$

Uit tabel 1 blijkt dat door behandeling met NO_2^- , N-nitroso-verbindingen in de groente-extracten worden gevormd. Opvallend is de hoge concentratie in de meeste Cruciferen (hiertoe behoren de Brassica's, zie Appendix 1). Om de groentes onderling te kunnen vergelijken zijn de concentraties N-nitroso-produkt per hoeveelheid droog/vers gewicht weergegeven (tabel 2). (De verdunningsfactoren van de verschillende groentes variëren, vanwege een variatie in het percentage droge stof. Zie Appendix 1). In tabel 2 en in het verdere verslag is uitgegaan van concentraties gemeten bij pH 2, omdat metingen bij pH 8 hier en daar sterk afwijken van de pH 2 metingen. Bij aanzuren van de pH 8 monsters kwamen de concentraties echter met de pH 2 metingen overeen, zodat vermoed wordt dat bepaalde componenten uit de groente-extracten een storende werking hebben op de N-nitroso-bepaling bij pH 8.

Mutageniteitstest

In tabel 3 worden de resultaten van de S. typhimurium-test weergegeven. De S. typhimurium-test werd uitgevoerd met monsters genomen bij pH 8, omdat uit eerder onderzoek was gebleken dat de gevormde N-nitroso-verbindingen bij pH 8 meer stabiel waren dan bij pH 2. In tabel 3 zijn de aantallen revertanten van zowel de behandelde als de niet-behandelde groente-extracten gecorrigeerd voor spontaan optredende revertanten (=aantal revertanten in de blanco).

Brassica's hebben behalve hoge concentraties gevormde N-nitroso-verbindingen ook meer geïnduceerde revertanten dan de overige groentes. Toch zijn de hoeveelheid gevormd N-nitroso-produkt en het aantal geïnduceerde revertanten niet gecorreleerd, zie figuur 3.

Dat geen correlatie gevonden wordt tussen het gevormde N-nitroso-produkt en de geïnduceerde mutageniteit had ook opgemaakt kunnen worden uit de variatie in de biologische activiteit van de gevormde N-nitroso-verbindingen, dit is: het aantal geïnduceerde revertanten per μmol gevormde N-nitroso-verbinding (tabel 4).

Tabel 2. Gemiddelde hoeveelheid N-nitroso-produkt in de groente-extracten na behandeling met NO_2^- , uitgedrukt in nmol en $\pm$ SD.

groente	per 25 mg d.s.	per 25 mg vers
bloemkool	263 $\pm$ 9	23 $\pm$ 1
spruiten	789 $\pm$ 57	147 $\pm$ 8
savoie kool	628 $\pm$ 65	86 $\pm$ 9
broccoli	492 $\pm$ 53	73 $\pm$ 8
rode kool	492 $\pm$ 90	50 $\pm$ 9
groene kool	697 $\pm$ 134	92 $\pm$ 18
spitskool	277 $\pm$ 46	28 $\pm$ 5
witte kool	370 $\pm$ 59	32 $\pm$ 5
koolrabi	186 $\pm$ 12	14 $\pm$ 1
Chinese kool	247 $\pm$ 31	15 $\pm$ 2
knolraap	76 $\pm$ 5	6 $\pm$ 0
spercieboon	188 $\pm$ 15	20 $\pm$ 2
snijboon	172 $\pm$ 24	17 $\pm$ 2
tuinboon	42 $\pm$ 3	8 $\pm$ 1
doperwt	23 $\pm$ 4	8 $\pm$ 1
capucijner	104 $\pm$ 18	25 $\pm$ 5
andijvie	103 $\pm$ 11	6 $\pm$ 1
witlof	311 $\pm$ 10	18 $\pm$ 1
spinazie	274 $\pm$ 122	17 $\pm$ 8
sla	158 $\pm$ 57	9 $\pm$ 3
ui	187 $\pm$ 11	25 $\pm$ 1
prei	213 $\pm$ 23	22 $\pm$ 2
rode biet	69 $\pm$ 23	10 $\pm$ 3
wortel	25 $\pm$ 13	4 $\pm$ 1
radijs	143 $\pm$ 117	6 $\pm$ 5
rettich	190 $\pm$ 16	7 $\pm$ 1
gr. paprika	79 $\pm$ 22	5 $\pm$ 1
rode paprika	237 $\pm$ 9	25 $\pm$ 1
tomaat	58 $\pm$ 4	4 $\pm$ 0
komkommer	287 $\pm$ 17	17 $\pm$ 1
champignon	241 $\pm$ 25	19 $\pm$ 2

Tabel 3. Gemiddeld aantal revertanten +, ++ $\pm$ s.d. in groente-extracten al dan behandeld met NO_2^- en het verschil tussen behandelde en niet-behandelde extracten.
*mutageen

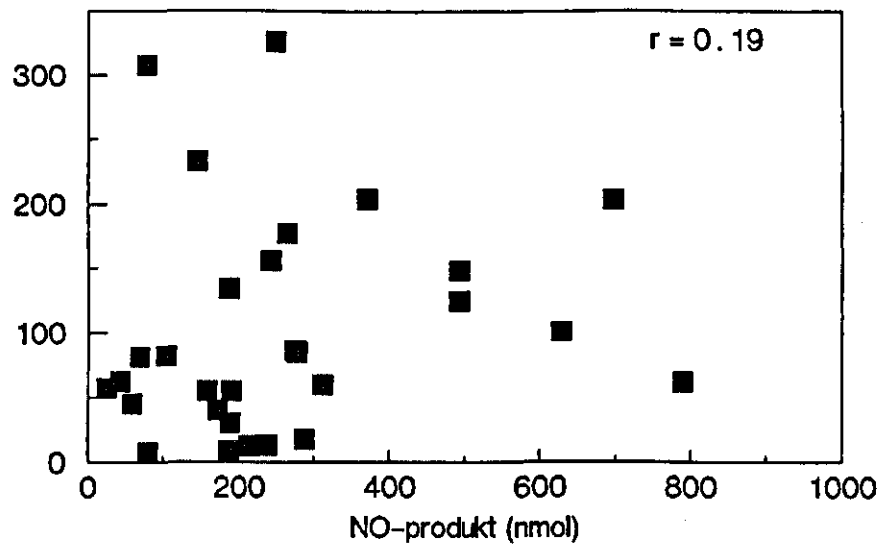
groente	per 25 mg droge stof			25 mg vers
	+ NO_2^-	- NO_2^-	verschil	verschil
bloemkool*	213 $\pm$ 2	37 $\pm$ 18	176 $\pm$ 16	15 $\pm$ 1
spruiten*	116 $\pm$ 0	54 $\pm$ 2	61 $\pm$ 2	12 $\pm$ 0
savoie kool*	176 $\pm$ 71	75 $\pm$ 67	101 $\pm$ 3	14 $\pm$ 0
broccoli*	183 $\pm$ 47	35 $\pm$ 30	148 $\pm$ 18	22 $\pm$ 3
rode kool*	157 $\pm$ 77	33 $\pm$ 37	124 $\pm$ 39	13 $\pm$ 4
groene kool*	282 $\pm$ 6	78 $\pm$ 49	203 $\pm$ 55	27 $\pm$ 7
spitskool	184 $\pm$ 4	100 $\pm$ 17	84 $\pm$ 21	8 $\pm$ 2
witte kool*	302 $\pm$ 3	99 $\pm$ 15	203 $\pm$ 18	17 $\pm$ 2
koolrabi*	217 $\pm$ 25	83 $\pm$ 25	134 $\pm$ 50	10 $\pm$ 4
Chinese kool*	445 $\pm$ 17	120 $\pm$ 48	326 $\pm$ 30	20 $\pm$ 2
knolraap*	401 $\pm$ 9	94 $\pm$ 4	307 $\pm$ 13	26 $\pm$ 1
spercieboon	72 $\pm$ 9	43 $\pm$ 1	30 $\pm$ 10	3 $\pm$ 1
snijboon	84 $\pm$ 11	44 $\pm$ 1	40 $\pm$ 10	4 $\pm$ 1
tuinboon	124 $\pm$ 9	63 $\pm$ 15	62 $\pm$ 5	11 $\pm$ 1
doperwt	49 $\pm$ 11	29 $\pm$ 3	20 $\pm$ 8	7 $\pm$ 3
capucijner	115 $\pm$ 110	76 $\pm$ 38	39 $\pm$ 2	9 $\pm$ 0
andijvie*	99 $\pm$ 18	18 $\pm$ 23	81 $\pm$ 42	5 $\pm$ 2
witlof	151 $\pm$ 4	92 $\pm$ 12	59 $\pm$ 8	3 $\pm$ 0
spinazie*	129 $\pm$ 75	43 $\pm$ 17	85 $\pm$ 58	5 $\pm$ 4
sla*	77 $\pm$ 18	25 $\pm$ 19	55 $\pm$ 37	3 $\pm$ 2
ui	57 $\pm$ 56	49 $\pm$ 52	8 $\pm$ 4	1 $\pm$ 1
prei	40 $\pm$ 12	27 $\pm$ 16	12 $\pm$ 5	1 $\pm$ 0
rode biet*	92 $\pm$ 20	11 $\pm$ 3	81 $\pm$ 17	12 $\pm$ 2
waspeen*	59 $\pm$ 19	2 $\pm$ 1	57 $\pm$ 18	6 $\pm$ 2
radijs*	266 $\pm$ 34	34 $\pm$ 29	233 $\pm$ 63	9 $\pm$ 3
rettich	130 $\pm$ 18	75 $\pm$ 13	55 $\pm$ 5	2 $\pm$ 0
gr. paprika	41 $\pm$ 2	35 $\pm$ 2	7 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
rode paprika	62 $\pm$ 38	49 $\pm$ 46	13 $\pm$ 8	1 $\pm$ 1
tomaat*	74 $\pm$ 28	30 $\pm$ 22	45 $\pm$ 6	3 $\pm$ 0
komkommer	123 $\pm$ 6	106 $\pm$ 3	17 $\pm$ 9	1 $\pm$ 1
champignon	354 $\pm$ 69	199 $\pm$ 70	155 $\pm$ 1	12 $\pm$ 0

* Het aantal revertanten is gecorrigeerd voor spontane revertanten (=aantal revertanten in blanco (40 mmol/l NO_2^- met 48 mmol/l sulfamaat)). ++S. typhimurium TA100, - S9 mix, -preïncubatie.

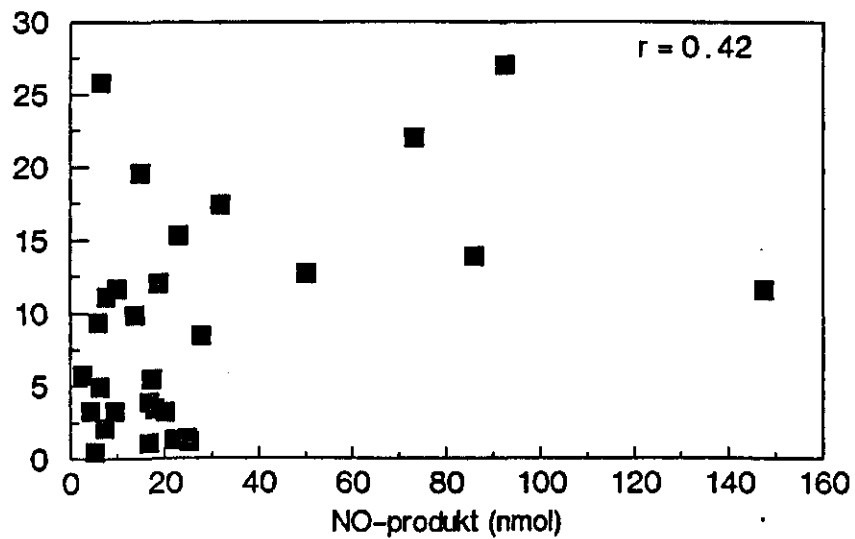
Tabel 4. Gemiddelde specifieke activiteit van de gevormde N-nitroso-verbindingen, uitgedrukt als het aantal geïnduceerde revertanten per μmol gevormd N-nitroso-produkt.

groente	activiteit	
bloemkool	669 $\pm$	62
spruiten	78 $\pm$	7
savoie kool	162 $\pm$	14
broccoli	301 $\pm$	4
rode kool	250 $\pm$	25
groene kool	309 $\pm$	151
spitskool	303 $\pm$	15
witte kool	565 $\pm$	156
koolrabi	715 $\pm$	230
Chinese kool	1342 $\pm$	317
knolraap	3249 $\pm$	1501
spercieboon	157 $\pm$	49
snijboon	239 $\pm$	100
tuinboon	1476 $\pm$	259
doperwt	851 $\pm$	146
capucijner	382 $\pm$	94
andijvie	1078 $\pm$	129
witlof	190 $\pm$	22
spinazie	296 $\pm$	64
sla	323 $\pm$	112
ui	44 $\pm$	21
prei	57 $\pm$	14
rode biet	1230 $\pm$	255
waspeen	2592 $\pm$	907
radijs	1157 $\pm$	588
rettich	287 $\pm$	18
gr. paprika	89 $\pm$	32
rode paprika	53 $\pm$	31
tomaat	775 $\pm$	152
komkommer	60 $\pm$	31
champignon	648 $\pm$	72

aantal revertanten



aantal revertanten



Figuur 3. De hoeveelheid gevormd N-nitroso (NO)-produkt uitgezet tegen het aantal revertanten geïnduceerd door de nitriet-behandeling, uitgaande van:
A. 25 mg droge stof
B. 25 mg vers materiaal

Uit tabel 4 blijkt dat de biologische activiteit van de gevormde N-nitroso-verbindingen sterk varieert. Bij de Brassica's springen de niet tot de oleracea behorende, namelijk Chinese kool en knolraap, eruit. Van de overige groentes hebben tuinboon, andijvie, biet, waspeen en radijs een hoge activiteit.

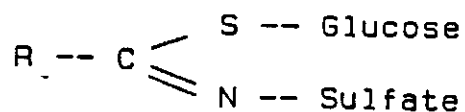
Glucosinolaatgehalte

Wakabayashi et al. (1985) vonden in met NO_2^- behandelde Chinese kool het indool-3-acetonitril (IAN) als dé precursor van de gevormde N-nitroso-verbindingen. Bij tuinbonen werd het 4-chloro-6-methoxyindool als de belangrijkste precursor gevonden (Yang et al. 1984). Indoolverbindingen komen in een plant voor in de vorm van een glucosinolaatverbinding. Tabel 5 toont de structuren van de meest voorkomende glucosinolaten in groentes.

Tabel 6 geeft de gehalten van deze glucosinolaat-componenten in de droge stof van de in dit onderzoek geteste groentes. In tabel 6 zijn slechts de crucifere groentes (Brassica's, radijs en rettich) opgenomen. De overige groentes gaven bij HPLC-analyse van gedesulfateerde glucosinolaten geen of in enkele gevallen een kleine respons. Omdat de retentietijden van deze responsen niet overeenkwamen met die van componenten genoemd in tabel 6, werd getwijfeld aan de identiteit van de responsgevende componenten. De verantwoordelijke groentes zijn derhalve niet in tabel 6 opgenomen.

Uit tabel 6 blijkt dat bepaalde glucosinolaten specifiek zijn voor bepaalde klassen van groentes. Glucoberin (component 1) komt b.v. alleen voor in Brassica oleracea en 4-methylthiobutenyl (component 8) alleen in radijsachtigen. Verder valt het op dat in de Brassica's het indolyl-glucosinolaatgehalte hoog is en dat een groot deel hiervan (30-90 %) bestaat uit glucobrassicin (component 11). Omdat afbraakprodukten van indolylglucosinolaten precursors van de N-nitroso-verbindingen kunnen zijn, werd onderzocht of een relatie bestond tussen glucosinolaatgehalten aan de ene kant en gevormde N-nitroso-verbindingen, geïnduceerde revertanten aan de andere kant. In tabel 7 zijn de berekende correlatiecoëfficiënten weergegeven.

Tabel 5. Structuur van de meest voorkomende glucosinolaten in groentes.

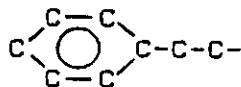


R=alkyl

sinigrin	C=C-C-
progoitrin	C=C-C-C- OH
gluconapin	C=C-C-C-
glucoiberin	C-SO-C-C-C-
glucoraphanin	C-SO-C-C-C-C-
glucoalyssin	C-SO-C-C-C-C-C-
4-methylthiobutenyl-GSL	C-S-C=C-C-C-

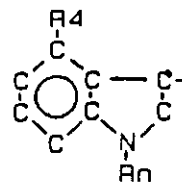
R=aryl

glucosturtiin



R=indolyl

	R4=	Rn=
glucobrassicin	H	H
4-hydroxy-glucobrassicin	OH	H
4-methoxy-glucobrassicin	OCH3	H
neoglucobrassicin	H	OCH3



Tabel 6. Glucosinolaatgehaltes in de groentes, uitgedrukt in μmol en per gram droge stof. Componenten: 1=glucoiberin, 2=progroitrin, 3=sinigrin, 4=glucoalyssin, 5=glucoraphanin, 6=gluconapin, 7=glucosturtiin, 8=4-methylthiobutenylglucosinol, 9=rest, 10=4-hydroxyglucobrassicin, 11=glucobrassicin, 12=4-methoxyglucobrassicin, 13=neoglucobrassicin.

groente	aryl/alkylglucosinolaten component									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1-9
bloemkool	0,2	--	0,2	--	0,3	--	--	--	--	0,7
spruiten	3,1	7,6	8,2	2,1	0,3	7,0	0,3	--	--	28,3
savoie kool	4,3	0,3	4,3	0,4	0,3	0,4	--	--	--	10,0
broccoli	0,5	6,2	--	5,9	0,3	0,6	--	--	--	13,5
rode kool	1,6	1,2	2,7	0,3	0,1	0,4	--	--	--	6,2
groene kool	7,3	0,2	10,2	--	0,2	--	--	--	--	17,9
spitskool	0,7	0,3	0,1	0,9	0,3	--	--	--	--	2,3
witte kool	6,8	0,2	4,2	0,1	0,2	--	--	--	--	11,5
koolrabi	0,2	--	--	0,2	0,1	--	--	--	--	0,5
Chinese kool	--	--	--	--	--	--	0,5	--	--	0,5
knolraap	--	2,3	--	--	0,7	--	2,9	--	0,5	6,4
radijs	--	0,2	--	--	0,2	--	--	4,9	0,7	6,0
rettich	--	--	--	--	0,2	--	--	9,6	0,4	10,2

groente	indolylglucosinolaten component					totaal gluco- sinolaten
	10	11	12	13	10-13	
bloemkool	0,1	0,7	0,2	0,1	1,1	1,8
spruiten	1,2	4,5	0,9	--	6,6	34,9
savoie kool	0,4	2,4	1,8	0,1	4,7	14,7
broccoli	--	2,1	0,2	0,9	3,2	16,7
rode kool	0,1	3,8	0,3	--	4,2	10,4
groene kool	--	6,8	1,3	--	8,1	26,0
spitskool	0,1	1,1	0,1	--	1,3	3,6
witte kool	--	3,4	0,4	0,1	3,9	15,4
koolrabi	0,1	1,3	0,1	0,5	2,0	2,5
Chinese kool	--	1,3	1,5	0,1	2,9	3,4
knolraap	0,2	0,9	0,3	0,9	2,3	8,7
radijs	0,2	0,3	0,5	--	1,0	7,0
rettich	0,3	0,3	0,1	--	0,7	10,9

Tabel 7. Correlatiecoëfficiënten tussen glucosinolaatcomponenten en gevormd N-nitroso-produkt, geïnduceerd aantal revertanten, berekend op basis van droge stof (d.s.) en versgewicht. Significant bij + $p < 0,05$, ++ $p < 0,02$, +++ $p < 0,01$ *n.b.=niet berekend, i.v.m. te kleine hoeveelheden.

		N-nitroso		revertanten	
		d.s.	vers	d.s.	vers
component	1	0,67+	0,73++	0,08	0,35
	2	0,50	0,73++	0,24	0,09
	3	0,85+++	0,88+++	0,20	0,23
	4	0,35	0,50	0,26	0,18
	5	0,13	0,56+	0,12	0,40
	6	0,60+	0,74+++	0,39	0,13
	7	n.b.*	n.b.	n.b.	n.b.
	8	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	9	0,58+	0,46	n.b.	n.b.
	1-9	0,78+++	0,93+++	0,36	0,17
component	10	0,50	n.b.	0,47	0,46
	11	0,84+++	0,90+++	0,12	0,36
	12	0,52	0,75+++	0,22	0,27
	13	0,28	0,74+++	0,31	0,19
	10-13	0,88+++	0,95+++	0,07	0,35
component 1-13		0,84+++	0,95+++	0,31	0,21

Uit tabel 7 blijkt dat de glucosinolaatgehaltes meer gecorreleerd zijn met de hoeveelheid gevormd N-nitroso-produkt dan met het aantal geïnduceerde revertanten. De beste resultaten worden verkregen wanneer uitgegaan wordt van vers materiaal. In figuur 4 zijn de concentraties aryl/alkyl-, indolyl- en totaal glucosinolaat uitgezet tegen het gevormde N-nitroso-produkt.

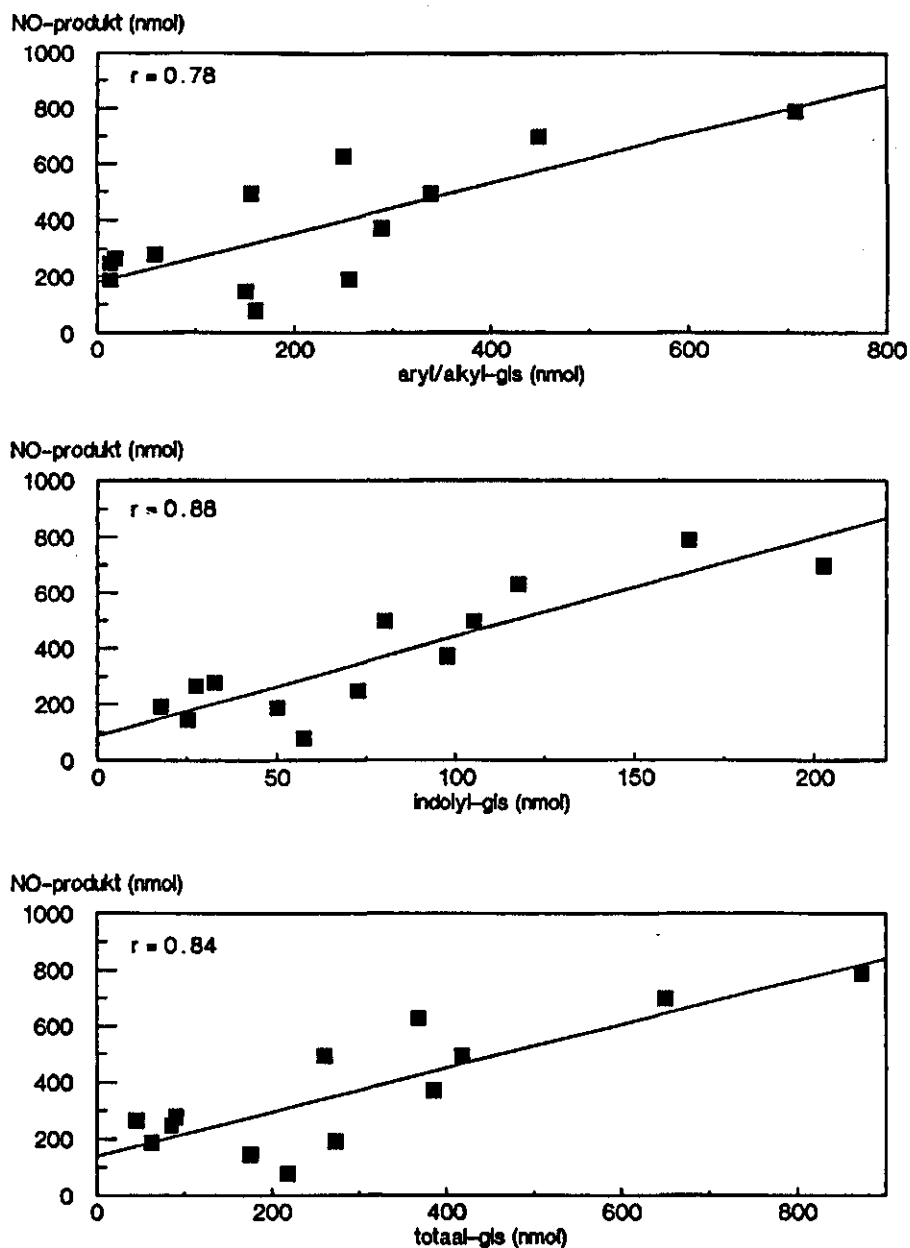
Uit figuur 4 blijkt dat het totaal glucosinolaatgehalte en het N-nitroso-produkt op basis van molaire hoeveelheden met elkaar overeenkomen. Vijftien tot 94 % (gemiddeld 64 %) van het totaal glucosinolaatgehalte bestaat uit aryl/alkyl componenten.

Eén van de mogelijke verklaringen voor de afwezigheid van een correlatie tussen het glucosinolaatgehalte en de mutageniteit is het feit dat intacte glucosinolaten worden genitroseerd. Intacte genitroseerde glucosinolaten worden in de totaal N-nitroso-bepaling wel gemeten, maar hun eventueel mutagene werking kan in een *S. typhimurium*-test niet worden gedetecteerd. Het genitroseerde glucosinolaatmolecuul zal te groot zijn om de bacterie te kunnen binnen te dringen, waardoor geen genetische schade aangebracht kan worden. In dit onderzoek werd echter gecontroleerd of in de groente-extracten intacte dan wel gehydrolyseerde glucosinolaten voorkwamen.

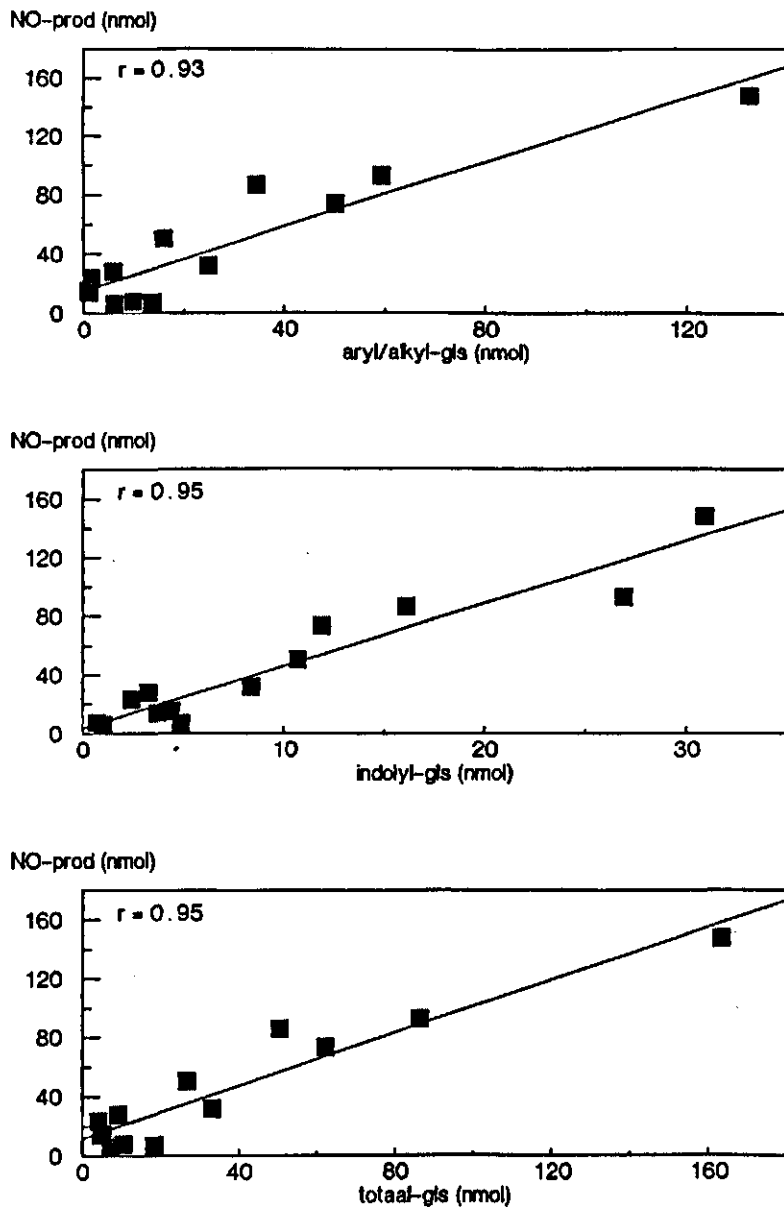
Hiertoe werden spruitenextracten, direct na centrifugeren en na incubatie (zonder NO_2^- , pH 2 en 8) geanalyseerd op glucosinolaten. In geen van de extracten konden intacte glucosinolaten worden aangetoond. In het niet-geïncubeerde extract werd zelfs de interne standaard glucotropaeolin niet meer teruggevonden. Dit wijst op de aanwezigheid van het enzym myrosinase, welke in waterig milieu glucosinolaten hydrolyseert. Omdat de interne standaard wel in de geïncubeerde spruitenextracten kon worden aangetoond, lijkt het erop dat door incubatie bij 37 °C het myrosinase werd geïnactiveerd.

Aminozuren

In de gevriesdroogde groentes werden de gehalten aan vrije aminozuren bepaald. Voor een uitgebreide weergave van de aminozuursamenstelling in de groentes wordt verwezen naar Appendix 2. In tabel 8 zijn slechts de gehalten weergegeven van aminozuren met een secundaire aminegroep, de som van deze en de som van alle aminozuren.



Figuur 4. Het aryl/alkyl-, indolyl- en totaal-glucosinolaatgehalte in Crucifere groentes uitgezet tegen het N-nitroso(NO)-produkt gevormd in extracten van deze groentes door behandeling met nitriet.
A. uitgaande van 25 mg droge stof,
B. uitgaande van 25 mg vers.



Figuur 4. Het aryl/alkyl-, indolyl- en totaal-glucosinolaatgehalte in Crucifere groentes uitgezet tegen het N-nitroso(NO)-produkt gevormd in extracten van deze groentes door behandeling met nitriet.
A. uitgaande van 25 mg droge stof,
B. uitgaande van 25 mg vers.

Tabel 8. Het histidine-(his), arginine-(arg), proline-(pro) en tryptofaan-(tryp)gehalte, alsmede de som van deze en het totaal aminozuurgehalte (som aminozuren) in de groentes, uitgedrukt in mmol.

	PER 25 MG DROGE STOF						PER 25 MG VERS					
	his	arg	pro	tryp	his, arg pro, tryp	som amino- zuren	his	arg	pro	tryp	his, arg pro, tryp	som amino- zuren
bloemkool	4,4	15,24	7,98	1,03	28,65	366,89	0,38	1,32	0,69	0,09	2,48	31,77
spruiten	2,8	7,84	150,74	0,92	162,3	280,3	0,52	1,47	28,17	0,17	30,33	52,39
Sve kool	5,44	50,84	143,76	1,73	201,77	456,83	0,74	6,96	19,68	0,24	27,62	62,54
broccoli	0	43,02	148,3	4,28	195,6	646,39	0,00	6,38	22,01	0,64	29,03	95,92
rode kool	0	32,35	75,86	2,22	110,43	435,77	0,00	3,29	7,71	0,23	11,22	44,27
gr. kool	16,48	74,01	144,55	5,33	240,37	596,25	2,19	9,81	19,17	0,71	31,87	79,06
spitskool	7,36	26,98	33,2	4,36	71,9	328,64	0,73	2,68	3,30	0,43	7,15	32,70
witte kool	11,09	27,83	48,17	1,73	88,82	314,09	0,95	2,38	4,11	0,15	7,59	26,82
koolrabi	0	28,31	14,39	2,41	45,11	419,82	0,00	2,08	1,06	0,18	3,31	30,81
Ch. kool	9,12	45,16	32,89	1,46	88,63	541,73	0,55	2,71	1,97	0,09	5,32	32,50
knolraap	7,37	104,41	4,6	2,14	118,52	354,81	0,62	8,75	0,39	0,18	9,93	29,73
spiercieboon	4,49	2,32	3,94	0	10,75	291,29	0,48	0,25	0,42	0,00	1,14	30,85
snijboon	4,67	2,56	0,94	0	8,17	320,95	0,45	0,25	0,09	0,00	0,79	30,91
tuinboon	0	43,15	4,55	0,07	47,77	263,36	0,00	7,74	0,82	0,01	8,57	47,25
doperwt	0	29,36	0	0	29,36	94,72	0,00	10,37	0,00	0,00	10,37	33,46
capucijner	0	60,61	1,55	0,36	62,52	215,79	0,00	14,34	0,37	0,09	14,79	51,06
andijvie	0,78	6,98	5,31	1,16	14,23	190,02	0,05	0,42	0,32	0,07	0,85	11,40
witlof	5,2	25,52	31,49	1,5	63,71	317,18	0,30	1,45	1,79	0,09	3,63	18,08
spinazie	0	6,3	1,49	1,31	9,1	163,31	0,00	0,40	0,09	0,08	0,57	10,26
sla	3,67	5,67	5,36	2,33	17,03	197,63	0,22	0,34	0,32	0,14	1,01	11,68
ui	1,8	53,52	2,72	3,09	61,13	216,98	0,24	7,17	0,36	0,41	8,19	29,05
prei	2,45	10,57	4,37	1,39	18,78	201,57	0,25	1,08	0,45	0,14	1,92	20,62
rode biet	0	2,17	3,01	0	5,18	138,52	0,00	0,31	0,43	0,00	0,75	19,99
waspeen	0	5,37	6,13	0	11,5	56,97	0,00	0,54	0,62	0,00	1,16	5,74
radijs	0	5,58	3,68	0,8	10,06	156,45	0,00	0,22	0,15	0,03	0,40	6,27
rettich	4,71	17,56	6,14	1,94	30,35	222,93	0,18	0,67	0,23	0,07	1,16	8,49

	PER 25 MG DROGE STOF					PER 25 MG VERS						
	his	arg	pro	tryp	som his, arg pro, tryp	som amino- zuren	his	arg	pro	tryp	som his, arg pro, tryp	som amino- zuren
g.paprika	0	10,47	6,88	0	17,35	260,38	0,00	0,68	0,45	0,00	1,13	16,98
r.paprika	2,83	10,41	28,41	0,4	42,05	251,36	0,29	1,08	2,95	0,04	4,37	26,14
tomaat	0	1,17	6,05	0,68	7,9	334,38	0,00	0,08	0,44	0,05	0,57	24,21
komkommer	0	26,36	3,13	2,12	31,61	354,46	0,00	1,52	0,18	0,12	1,82	20,45
champignon	7,9	2,27	7,93	56,16	74,26	386,44	0,61	0,18	0,61	4,34	5,73	29,83

De in tabel 8 genoemde aminozuren komen in principe in aanmerking om precursor te zijn van de N-nitroso-verbindingen van de groente-extracten. Daarom werden correlatiecoëfficiënten berekend tussen de in tabel 8 genoemde componenten en het N-nitroso- produkt en de geïnduceerde revertanten (tabel 9).

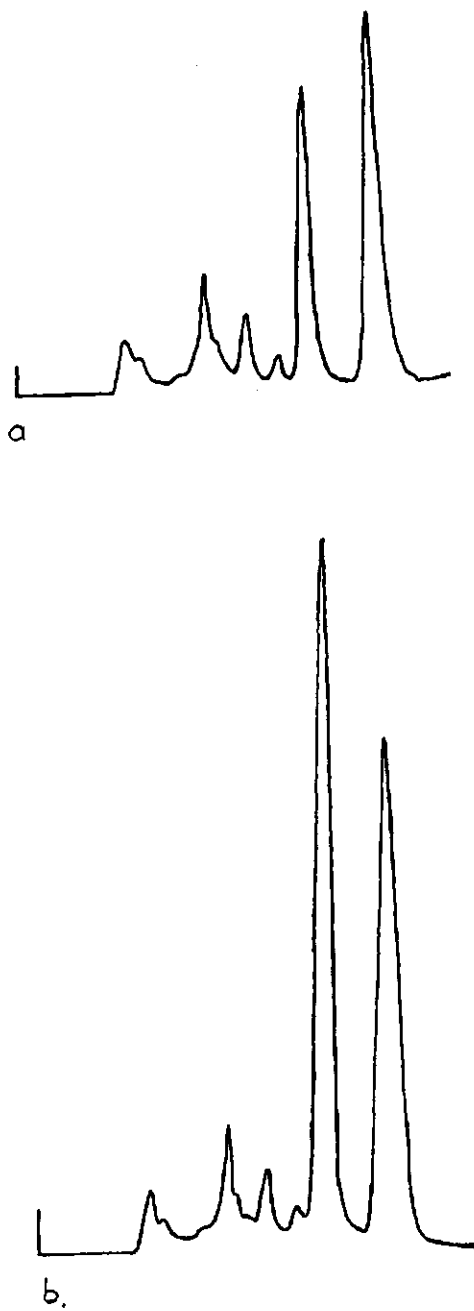
Tabel 9. Correlatiecoëfficiënten tussen het totaal N-nitroso-produkt en het histidine-, arginine-, proline- en tryptofaangehalte, alsmede de som hiervan en het totaal aminozuur (a.z.)-gehalte, op basis van droge stof (d.s.) en vers. Significant bij + $p < 0,02$, ++ $p < 0,01$.

	d.s.	vers
histidine	0,43+	0,48++
arginine	0,20	0,24
proline	0,91++	0,96++
tryptofaan	0,07	0,08

som	0,82++	0,88++
totaal a.z.	0,61++	0,71++

Uit tabel 9 blijkt dat het proline-gehalte gecorreleerd is met het N-nitroso-produkt. Tengevolge van de grote bijdrage die proline levert aan de som van de nitroseerbare aminozuren (4-93 %, gemiddeld 48 %), is ook deze som gecorreleerd met het N-nitroso-gehalte.

Met HPLC gekoppeld aan een fotohydrolyse detector werd gecontroleerd of het proline in de groentes ook werkelijk bijdraagt aan het N-nitroso-produkt. Hiertoe werd eerst een groente-extract van spruiten, welk 2 uur geïncubeerd was, geanalyseerd. Daarna werd ditzelfde extract in aanwezigheid van een N-nitroso-proline standaard geanalyseerd. Zie figuur 5.



Figuur 5. HPLC-chromatogram van:
A. een genitroseerd spruiten-extract en
B. een genitroseerd spruiten-extract in aanwezigheid van N-nitrosoproline.

Uit figuur 5 blijkt dat de pieken van N-nitroso-proline samenvallen met de 2 laatste pieken van het groente-extract. Dit geeft aan dat proline één van de precursors van de N-nitroso-verbindingen in groentes kan zijn.

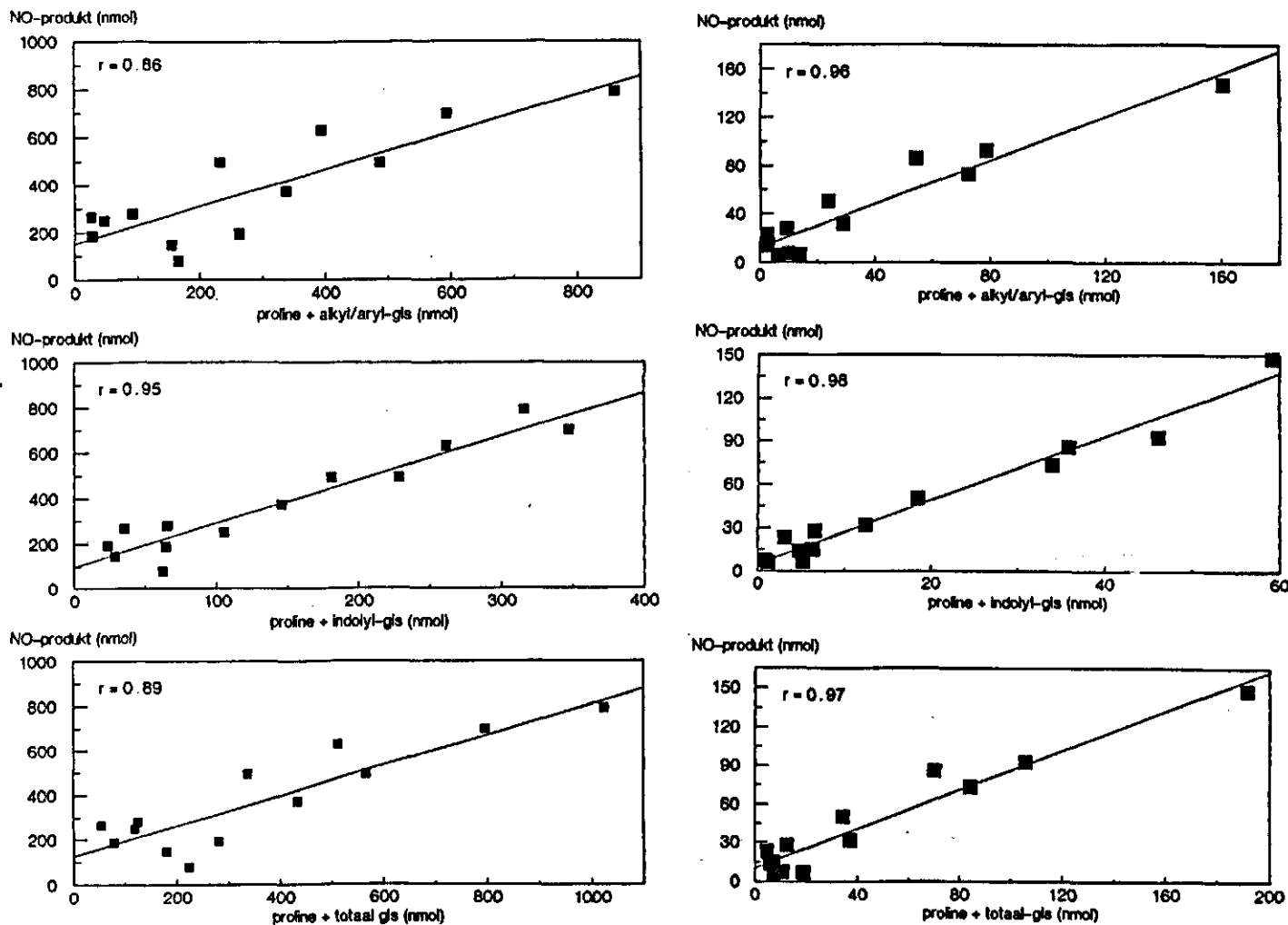
Om te controleren of het prolinegehalte in de Crucifere groentes nog invloed had op de correlatie gevonden tussen het gehalte aan glucosinolaten en de hoeveelheid gevormd N-nitroso-produkt, werden de gesommeerde glucosinolaat- en prolinegehalten uitgezet tegen het totaal N-nitroso-produkt. Zie figuur 6.

De in figuur 6 gevonden correlatiecoëfficiënten zijn hoger dan degene die gevonden werden tussen glucosinolaten en proline afzonderlijk versus gevormd N-nitroso-produkt.

Nitriet-, nitraat- en totaal stikstofgehalte

In dit onderzoek werden de groente-extracten geïncubeerd met 40 mM NO_2^- . Het was niet uitgesloten, dat de werkelijke NO_2^- -concentratie tijdens de incubatie hoger was, door NO_2^- afkomstig van de groentes zelf. Daarom werd het NO_2^- - gehalte in de gevriesdroogde groentes bepaald. Echter in geen van de groentes werd een detecteerbare hoeveelheid aangetoond.

In de in-vivo situatie draagt NO_3^- meer bij aan de NO_2^- -concentratie in de maag dan NO_2^- zelf. NO_3^- zal daarom een belangrijke rol spelen bij de endogene vorming van N-nitroso-verbindingen. Bij patiënten met atrofische gastritis draagt NO_3^- zelfs extra bij aan de NO_2^- -concentratie in de maag. Bij deze patiënten is de pH van het maagsap verhoogd, waardoor bacteriëngroei kan ontstaan. Tenminste een deel van de in de maag aangetroffen bacteriën is ook in staat om NO_3^- te reduceren (Correa 1975). Zie tabel 10 voor de NO_3^- -gehalten van de gevriesdroogde groentes.



Figuur 6. De gehaltes aan proline + alkyl/aryl-glucosinolaten (gl's), proline + indolyl-gls en proline + totaal-gls in Crucifere groentes uitgezet tegen het N-nitroso(NO)-produkt gevormd in extracten van deze groentes door behandeling met nitriet.
A. uitgaande van 25 mg droge stof,
B. uitgaande van 25 mg vers.

Tabel 10. Nitraatgehalte in mg per g droge stof (d.s.) en in µg per g vers en het totaal stikstofgehalte in mg per g droge stof.

groente	NO ₃		N-totaal
	d.s.	vers	d.s.
bloemkool	0,07	6,1	49,0
spruiten	0,01	1,9	30,7
savoie kool	0,35	47,9	41,8
broccoli	0,48	71,2	55,2
rode kool	0,74	75,2	35,0
groene kool	0,08	10,6	46,6
spitskool	5,28	525,4	49,5
witte kool	0,79	67,5	27,1
koolrabi	6,10	447,7	40,3
Chinese kool	5,67	340,2	46,1
knolraap	4,00	335,2	33,7
spercieboon	1,35	143,0	34,0
snijboon	0,88	84,7	36,1
tuinboon	0,02	3,6	54,6
doperwt	0,02	7,1	42,7
capucijner	0,14	33,1	46,3
andijvie	7,47	448,2	43,0
witlof	0,23	13,1	36,5
spinazie	8,91	559,5	64,8
sla	3,60	212,8	43,9
ui	0,03	4,0	16,4
prei	0,99	101,3	49,5
rode biet	0,76	109,7	13,7
waspeen	0,10	10,1	8,3
radijs	8,02	321,6	36,3
rettich	11,90	453,4	40,0
gr. paprika	0,20	13,0	27,4
rode paprika	0,01	1,0	22,8
tomaat	0,04	2,9	26,3
komkommer	1,97	113,7	40,1
champignon	0,18	13,9	50,7

Uit tabel 10 blijkt dat de NO₃⁻-gehalten van de groentes sterk variëren, maar dat alle groentes ver beneden de wettelijke norm van 3500 mg/kg (geldend van 1 april-1 november) liggen (Warenwet 1982).

Volledigheidshalve werd van de gevriesdroogde groentes het totaal stikstofgehalte gemeten. In deze bepaling wordt alle aanwezige stikstof gemeten, ook gebonden stikstof in de vorm van b.v. NO₂⁻ en NO₃⁻. Het totale stikstof gehalte zegt dus niets over de nitroseerbare hoeveelheid stikstof. Het totale stikstofgehalte is meestal een maat voor de kwaliteit van een gewas. Het is dus niet onverwacht dat geen significante correlatie tussen totaal stikstofgehalten en gevormd N-nitroso-produkt bestaat. (De

correlatiecoëfficiënten zijn bij uitgang van ~~droge~~ stof respectievelijk 0,22 en 0,26 en bij uitgang van vers materiaal respectievelijk 0,28 en 0,28). Zie tabel 10.

4. Discussie

Het primaire doel van dit onderzoek was een indruk te krijgen van de aanwezigheid dan wel afwezigheid van precursors van direct mutagene N-nitroso-verbindingen in Nederlandse groentes. Hiertoe werden in-vitro waterige extracten van een dertigtal Nederlandse groentes onder zure condities geïncubeerd met NO_2^- . In alle op deze wijze behandelde groente-extracten konden N-nitroso-verbindingen worden aangetoond. Dit wijst erop dat precursors van de N-nitroso-verbindingen in de groentes aanwezig zijn. In een S. typhimurium-test werd de direct mutagene activiteit van de gevormde N-nitroso-verbindingen gemeten. Alle groente-extracten behandeld met nitriet hadden meer revertanten dan niet behandelde extracten. Er bestond echter geen verband tussen de hoeveelheid gevormd N-nitroso-produkt en de mate van mutageniteit. Dit is niet geheel onverklaarbaar, gezien:

1. Een variatie in het patroon van gevormde N-nitroso-verbindingen per groente.
2. Een variatie in de mutagene activiteit van verschillende N-nitroso-verbindingen. Zo is bijvoorbeeld van N-nitrosoproline bekend dat dit in meerdere testsystemen niet mutageen (en carcinogeen (Mirvish et al. 1980)) is. Genitroseerd 4-chloro-indool daarentegen bleek uiterst mutageen in de S. typhimurium test, bij gebruik van een TA100 stam.
3. Een deel van de gevormde N-nitroso-verbindingen kunnen N-nitrosaminen zijn (vluchtige componenten, welke metabool geactiveerd moeten worden alvorens zij een mutagene werking kunnen uitoefenen). Het is echter zeer de vraag of het aandeel gevormde N-nitrosaminen in de groente-extracten niet te verwaarlozen is ten opzichte van de gevormde N-nitrosamiden. N-nitrosamiden worden sneller gevormd dan N-nitrosaminen, zeker bij de in dit onderzoek gebruikte pH (pH 2). De vormingssnelheid van N-nitrosaminen is afhankelijk van de pKa-waarde van het amine. De pH, waarbij deze snelheid optimaal is ligt in ieder geval boven pH 3. Beneden pH 3.4 verloopt de vorming uiterst langzaam. Voor de vorming van N-nitrosamiden geldt echter geen optimale pH. Hoe lager de pH hoe sneller de vorming (Mirvish 1975).
4. De totaal N-nitroso- bepaling en de S. typhimurium-test bij verschillende pH's werden uitgevoerd. De totaal N-nitroso-bepaling werd uitgevoerd met monsters getrokken bij pH 2, omdat bepaalde componenten de bepaling bij pH 8 verstoorden. De S. typhimurium-test werd echter uitgevoerd met monsters, die op pH 8 waren gebracht. Uit eerder onderzoek was gebleken dat enkele genitroseerde groente-extracten en

tevens een aantal genitroseerde indoolverbindingen meer stabiel waren bij pH 8 dan bij pH 2. Echter nadat het praktische gedeelte van dit onderzoek was afgerond bleek dat genitroseerd 4-chloro-indool, een verbinding qua structuur en eigenschappen gelijkend op het in tuinbonen voorkomende 4-chloro-6-methoxyindool (Yang et al. 1984), juist meer stabiel is bij lagere pH's. Mogelijk zijn er meerdere N-nitroso-verbindingen in groente-extracten, waarvan de stabiliteit bij pH 2 groter is dan bij pH 8. Deze N-nitroso-verbindingen zullen in dit onderzoek niet hebben bijgedragen aan de mutagene activiteit in de S. typhimurium-test, maar wel aan het totaal N-nitroso gehalte.

In dit onderzoek werd mutageen gedefinieerd als een tenminste twee maal zo hoog aantal revertanten in het te testen monster t.o.v. de bijbehorende blanco. Ongeveer de helft van de groentes werd na behandeling met NO_2^- mutageen bevonden. Opvallend was dat van de 11 Brassica's er 10 mutageen waren. Ook andijvie, rode bieten en wortelen werden na nitrosering mutageen bevonden. Zij bezaten echter zeer lage N-nitroso-gehaltenes, zodat geconcludeerd kan worden dat in deze groentes precursors aanwezig zijn, welke na behandeling met nitiet uiterst mutageen zijn. De tuinboon werd in dit onderzoek na nitrosering niet mutageen bevonden, dit in tegenstelling tot onderzoek van Piacek-Llanes en Tannenbaum (1982) en van der Hoeven et al. (1984). Dit zou verklaard kunnen worden door de instabiliteit van het door Yang et al. (1984) beschreven 4-chloro-6-methoxy-indool bij pH 8. Zoals bovengenoemd zal de mutagene activiteit van deze component niet in de S. typhimurium-test zijn vastgesteld. Een andere verklaring is dat in de onderzoeken van Piacek-Llanes en Tannenbaum en van der Hoeven et al. de tuinbonen genitroseerd werden in aanwezigheid van de droge stof, terwijl in dit onderzoek een waterextract van tuinbonen werd genitroseerd. Van der Hoeven et al. (1984) toonden bovendien aan dat de mutagene respons van een 16-tal verschillende tuinboonrassen meer dan een 15-voud verschillenden. Dit geeft aan dat bij de interpretatie van de resultaten van dit onderzoek, de nodige voorzichtigheid moet worden betracht. Immers van elke groente werd slechts 1 (onbekend) ras onderzocht.

Rasverschillen werden ook gevonden t.a.v. glucosinolaatgehaltes. Tijdens een onderzoek bij het Rikilt in 1985 werd van enkele groentes het glucosinolaatgehalte gemeten. Bij diverse groentes week het glucosinolaatgehalte enorm af van de gehaltenes gevonden in dit onderzoek. Met name voor bloemkool was het verschil meer dan een factor 10 (persoonlijk commentaar B.G. Muuse). In de literatuur worden meerdere factoren genoemd die het

glucosinolaatgehalte van een gewas beïnvloeden. Enkele van deze factoren zijn: ras, seizoen, temperatuur, neerslag, kwaliteit van de grond, groeifase, deel van de plant, beplantingsdichtheid en bemesting (Fenwick et al. 1983).

In dit onderzoek konden alleen glucosinolaten worden aangetoond in Crucifere groentes. De gehalten die in de gevriesdroogde groentes gevonden werden komen waarschijnlijk goed overeen met die van het verse uitgangsmateriaal. Het snijden van verse groentes heeft namelijk slechts kleine verliezen tot gevolg, aangezien relatief zeer weinig cellen beschadigd worden. Het beschadigen van cellen heeft tot gevolg dat myrosinase vrijkomt, waardoor het een interactie kan aangaan met glucosinolaten. Hierdoor worden biologisch actieve metabolieten gevormd (Fenwick et al. 1983). In dit onderzoek werden gevriesdroogde groentes vermalen. Aangezien myrosinase inactief is in afwezigheid van water, zal dit niet tot het verlies van glucosinolaten hebben bijgedragen. In dit onderzoek wees een glucosinolaatbepaling in een extract van spruiten echter wel uit dat myrosinase in de gevriesdroogde groentes geactiveerd wordt door toevoeging van water. Door incubatie van het spruitenextract bij 37 °C kan myrosinase vervolgens weer geïnactiveerd worden. Dit was af te leiden uit het feit dat de interne standaard voor de HPLC-bepaling van glucosinolaten, glucotropaeolin wel in het geïncubeerde extract was terug te vinden maar niet in het niet-geïncubeerde extract. Opslag bij -20 °C had geen verlies van glucosinolaten tot gevolg. In enkele groentes werd het glucosinolaatgehalte 3 maanden na de eerste analyse nogmaals gemeten. Er werden geen significante afnames gevonden.

In dit onderzoek werd een correlatie gevonden tussen glucosinolaatgehalten en gevormd N-nitroso-produkt. Of deze correlatie een causaal verband weergeeft is niet duidelijk. Voor indolylglucosinolaten is dit in principe mogelijk, immers de hydrolyseprodukten zijn indoolverbindingen, welke een goed nitroseerbaar stikstofmolecuul bevatten. De niet-indolylglucosinolaten daarentegen hebben een alkyl- of arylgroep als restgroep. Bij hydrolyse zullen daaruit over 't algemeen thiocyanaten, isothiocyanaten en nitrillen worden gevormd, welke niet nitroseerbaar zijn (Fenwick et al. 1983). Slechts het hydrolyseprodukt van progoitrin, oxazolidine-2-thione (Fenwick 1983) en 2-oxazolidine (Lüthy et al. 1984) bevatten een stikstofmolecuul, wat genitroseerd kan worden. Het is daarom niet erg waarschijnlijk dat de correlatie tussen de alkyl/aryl-glucosinolaten en gevormd N-nitroso-produkt een causaal verband weergeeft. Toch zullen gezien de goede correlatie en het feit dat op molaire basis de

hoeveelheden van deze 2 parameters overeenstemmen de alkyl/aryl-glucosinolaten waarschijnlijk wel een rol spelen bij de nitrosering. Mogelijk verloopt dit via gevormde thiocyanaten, welke de nitroseringsreactie kunnen katalyseren (Fan & Tannenbaum 1973). Identificatie van de gevormde N-nitroso-verbindingen zal mogelijk uitsluitel kunnen geven over de aard van de precursors en dus ook over de betrokkenheid van de glucosinolaten in de nitroseringsreactie. Door identificatie zal tevens duidelijk worden of en welke rol de indolen spelen bij de vorming van N-nitroso-verbindingen en welke indoolverbindingen verantwoordelijk zijn voor mutageniteit.

Het glucosinolaatgehalte van de groentes bleek niet gecorreleerd te zijn met het aantal revertanten geïnduceerd door de nitrietbehandeling. De afwezigheid van deze correlatie was in ieder geval niet te wijten aan het feit dat intacte glucosinolaten werden genitroseerd. Intacte glucosinolaten kunnen door hun molecuulgrootte waarschijnlijk niet in contact kunnen komen met het bacteriële DNA. Zoals eerder genoemd bleken glucosinolaten zo gauw water aan de droge stof werd toegevoegd gehydrolyseerd te worden.

Naast de glucosinolaten werd in dit onderzoek ook een goede correlatie gevonden tussen het prolinegehalte van de groentes en de hoeveelheid gevormd N-nitroso-produkt. Deze correlatie bleek wel een causaal verband te kunnen weergeven. Bij analyse met HPLC, welke gekoppeld was aan fotohydrolyse detector, bleek dat een extract van spruiten pieken gaf, met retentietijden overeenkomend met die van N-nitrosoproline. Omdat de component(en) die deze pieken veroorzaakten niet aan massaspectrometrie zijn blootgesteld kan niet met volledige zekerheid gezegd worden of het hier gaat om N-nitrosoproline. Maar gezien het feit dat 2 pieken van N-nitrosoproline worden teruggevonden en dat deze pieken bij verlengde incubatieduur toenemen (een amine reageert langzamer met nitriet dan een amide, zeker bij pH 2), kan dit wel worden aangenomen. Waarom N-nitrosoproline onder de gebruikte meetcondities 2 pieken gaf is niet duidelijk. Gecontroleerd werd of één van de pieken het gedecarboxyleerde N-nitrosoproline (=N-nitrosopyrrolidine) was. Dit bleek echter niet het geval te zijn. Mogelijk worden de 2 pieken veroorzaakt door een cis en trans vorm van het N-nitrosoproline.

Het feit dat de correlatiecoëfficiënt tussen het prolinegehalte gesommeerd met het indolylglucosinolaatgehalte versus het N-nitroso-produkt op basis van vers gewicht 0,98 is, doet sterk vermoeden dat deze correlatie niet op toeval berust. Daarbij moet worden bedacht dat zowel proline als de afbraakprodukten van de indolylglucosinolaten nitroseerbare produkten zijn.

De gevonden correlatie kan dus een causaal verband weergeven. Indien de hydrolyseprodukten van de indolylglucosinolaten werkelijk precursor zijn, voor proline is dit al min of meer aangetoond, dan zou dit de afwezigheid van de correlatie tussen de hoeveelheid gevormd N-nitroso-produkt en de geïnduceerde mutageniteit kunnen verklaren. N-nitrosoproline draagt wel bij aan het N-nitroso-produkt, maar niet aan de mutageniteit. Genitroseerde indoolverbindingen dragen aan beide parameters bij, maar de mutagene activiteit van verschillende genitroseerde indoolverbindingen varieert sterk (zie tabel 11).

Tabel 11. Mutageniteit van enkele indoolverbindingen na nitrosering in de *S. typhimurium* test*.

- geen,
+ zeer lichte,
++ lichte,
+++ matige,
++++ sterke en
+++++ zeer sterke mutagene activiteit.

Indool	+++
Indool-3-carbinol	++
Indool-3-acetonitril	++
Indool-3-carboxylzuur	+
5-OH-indool-3-azijnzuur	-
4-chloro-indool	+++++
Oxyndool	-

**S. typhimurium* TA100, zonder S9 mix.

5. Conclusies

Tot slot worden de conclusies die uit dit onderzoek getrokken kunnen worden nog eens op een rijtje gezet.

1. Nederlandse groentes bevatten precursors van N-nitroso-verbindingen.
2. Tenminste een deel van de gevormde N-nitroso-verbindingen hebben een direct mutageen karakter.
3. Crucifere groentes namen een belangrijke plaats in in dit onderzoek. In vergelijking met andere groentes bezaten zij meer N-nitroso-verbindingen en induceerden zij meer revertanten na nitrosering. Bovendien konden in deze groentes glucosinolaten worden aangetoond, waarvan de gehaltes gecorreleerd waren met het totaal N-nitroso-produkt. Bij splitsing van de glucosinolaten in alkyl/aryl- en indolylcomponenten bleef de correlatie bestaan. Dit doet vermoeden dat alle glucosinolaten betrokken zijn bij de vorming van N-nitroso-verbindingen in groentes.
4. Proline bleek als enig nitroseerbaar aminozuur ook gecorreleerd te zijn met het gevormde N-nitroso-produkt. Bovendien werd aangetoond dat N-nitrosoproline in een spruitenextract aanwezig was. In groentes kan proline dus één van de precursors van de N-nitroso-verbindingen zijn.

Verder mogen uit dit onderzoek geen conclusies getrokken worden aangaande de in-vivo situatie (de endogene vorming van N-nitroso-verbindingen uit groentemateriaal). In dit onderzoek werd immers onder zeer extreme condities gewerkt, die sterk van de in-vivo situatie afwijken. Zoals blijkt uit de volgende punten:

1. De NO_2^- concentratie (40 mmol/l) was vele malen hoger dan de concentratie in de maag (14 $\mu\text{mol/l}$ -0,3 mmol/l. De NO_2^- concentratie in de maag bereikt een maximum 30 minuten na het consumeren van een NO_3^- -rijke maaltijd (Walters et al. 1979)). Nagahara et al. (1986) vonden dat de mutageniteit van soya-saus afhing van de hoeveelheid NO_2^- waarmee de saus was geïncubeerd. Beneden 250 ppm NO_2 (± 5 mmol/l) was het aantal S. typhimurium TA100 revertanten niet verhoogd t.o.v. de blanco. Boven de 250 ppm was een vrijwel lineair verband tussen de NO_2^- concentratie en de mutageniteit. Ook bij de nitrosering van indool-3-acetonitril hing de mutageniteit af de gebruikte NO_2^- concentratie (pers. comm. Dr. W.M.F. Jongen). Hieruit blijkt dat de NO_2^- concentratie waarschijnlijk slechts invloed heeft op de kwantiteit van de gevormde N-nitroso-verbindingen en niet op de kwaliteit.

2. De pH tijdens de incubatie was constant (pH 2). In de maag varieert de pH van circa 1 tot 4,5. De hoogste pH waarde wordt gevonden binnen één uur na een maaltijd (Walters et al. 1979). Hoe lager de pH, hoe sneller de nitroseringsreactie verloopt. Van der Hoeven et al. (1984) behandelden tuinbonen met 2,5 mM NO_2^- . Het aantal revertanten bij pH 1,5 was drie keer zo hoog als het aantal bij pH 2.
3. Er werd geen rekening gehouden met mogelijke aanwezigheid van stoffen die de nitroseringsreactie katalyseren (o.a. thiocynaat) dan wel remmen (o.a. ascorbinezuur).
4. De groentes werden in afwezigheid van andere produkten geïncubeerd. De mens zal zijn groentes in 't algemeen in combinatie met andere produkten consumeren. Hierdoor vindt in de maag verdunning plaats van de nitroseerbare verbindingen afkomstig van de groentes.
5. In dit onderzoek is uitgegaan van gevriesdroogde groentes, terwijl verre weg de meeste groentes vers worden geconsumeerd. Hierbij moet ook opgemerkt worden dat voor consumptie de meeste groentes worden gekookt. Het is mogelijk dat de precursors van de N-nitroso-verbindingen in het kookvocht terecht komen en daardoor niet worden geconsumeerd. Of dat door koken een zodanige modificatie optreedt, waardoor nitrosering niet mogelijk is.

Zoals uit bovenstaande blijkt, blijft de in-vivo vorming van N-nitroso-verbindingen in-vivo, na consumptie van groentes onderwerp voor verder onderzoek. Alvorens tot in-vivo onderzoek over te gaan is het raadzaam om eerst het hier besproken onderzoek nogmaals gedeeltelijk uit te voeren onder condities, die meer gelijken op de in-vivo situatie. Daarbij zal tevens aanvullende informatie omtrend de mutageniteit van afzonderlijke N-nitroso-componenten moeten worden verkregen, bijvoorbeeld door zoogdier-cellen als testsysteem te gebruiken.

Het moge duidelijk zijn dat door dit onderzoek groentes geenzins in een kwaad daglicht mogen worden gesteld. Groentes blijven voor de mens noodzakelijke voedingsmiddelen. Immers zij zijn belangrijke leveranciers van o.a. vitamine C, een voor de mens essentieel vitamine. Van groentes is verder bekend dat zij in aanwezigheid van genitroseerde vleesprodukten, de mutagene activiteit van deze vleesprodukten verlagen (Münzer 1986). Verder staan de Crucifere groentes al geruime tijd in de belangstelling, vanwege hun anti-mutagene werking. Uit epidemiologisch onderzoek is gebleken dat regelmatige consumptie van Crucifere groentes een aanzienlijke verlaging van het risico op colonkanker bewerkstelligde (Graham et al. 1978). Bij proefdieren bleek dat de consumptie van Crucifere groentes en met name de

daarin voorkomende indolen een beschermende werking had t.a.v. chemisch geïnduceerde tumoren (Wattenberg en Loub 1978). Deze beschermende werking wordt in verband gebracht met de inductie van het "mixed- function oxidase" (MFO) systeem in de lever en de dunne darm, door indool-3-carbinol, indool-3-acetonitril en di-indolylmethaan (Loub et al. 1975). Aan de vakgroep Toxicologie van de Landbouwniversiteit werd ook de beschermde werking van indool-3-acetonitril en indool-3-acetonitril onderzocht. De beschermende werking werd niet direct toegeschreven aan de inductie van het cytochroom P450 systeem, maar meer aan een veranderd evenwicht in de enzymsystemen betrokken bij de biotransformatie van indolen en aan enzymsystemen betrokken bij conjugatiereacties (Jongen et al. 1987).

6. Referenties

- Ames, B.N., J. McCan, E. Yamasaki, 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research* 31, 347-364.
- Bartsch, H., R. Montesano, 1984. Relevance of nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis* 5, 1381-1393.
- Correa, P., W. Haenszel, C. Cuello, S. Tannenbaum, M. Archer, 1975. A model for gastric cancer epidemiology. *The Lancet* ii, 58-59.
- Ellen, G., P.L. Schuller, 1983. Nitrate, origin of continuous anxiety. In: R. Preussmann (Ed.), *Das nitrosamin-problem*. Verlag Chemie GmbH, Weinheim (BRD), 97-134.
- Fan, T.Y., S.R. Tannenbaum, 1973. Factors influencing the rate of formation of nitrosomorpholine from morphine and nitrite: Acceleration by thiocyanate and other anions. *J. Agr. Food Chem.* 21, 237-240.
- Fenwick, G.R., R.K. Heaney, W.J. Mullin, 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 18, issue 2, 123-201.
- Gough, T.A., M.F. McPhail, K.S. Webb, B.J. Wood, R.F. Coleman, 1977. An examination of some foodstuffs for presence of volatile nitrosamines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28, 345-351.
- Graham, S., H. Dayal, M. Swanson, A. Mittleman, G. Wilkinson, 1978. Diet in the epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Journal of the National Cancer Institute* 61, 709-714.
- Groenen, P.J., Cock-Bethbeder M.W., Beek E.J. van der, Dokkum W. van, Prins L.A., Wesstra J.A. & Bussink E., 1984. Vorming van nitrosaminen in het lichaam van de mens na het eten van nitraatrijke groenten, CIVO-TNO rapport, nr. 84.108/020311, CIVO-TNO, Zeist, Nederland.
- Hoeven, J.C.M. van der, W.J. Lagerweij, I.M. Bruggeman, F.G. Voragen, J.H. Koeman, 1983. Mutagenicity of extracts of some vegetables commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31, 1020-1026.
- Hoeven, J.C.M. van der, W.J. Lagerweij, A. van Gastel, J. Huitink, R. de Dreu, L.W. van Broekhoven, 1984. Intercultivar difference with respect to mutagenicity of fava beans (*Vicia faba* L.) after incubation with nitrite. *Mutation Research* 130, 391-394.
- Institute of Food Technologists' Expert Panel on Food Safety and Nutrition, 1987. Nitrate, nitrite and nitroso compounds in foods. *Food Technology* 41, 127-136.

- Jongen, W.M.F., R.J. Topp, H.G.M. Tiedink, E.J. Brink, 1987. A Co-cultivation system as a model for in-vitro studies of modulating effects of naturally occurring indoles on the genotoxicity of model compounds. *Toxicology in vitro* 2, 105-110.
- Loub, W.D., L.W. Wattenberg, D.W. Davis, 1975. Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in rat tissues by naturally occurring indoles of cruciferous plants. *Journal of the National Cancer Institute* 54, 985-....
- Lüthy, J., Carden B., Bachmann M., Friederich U., Slatter Ch., 1984. Nitrosierbare Stoffe in Lebensmitteln: Identifizierung und mutagenität des Reaktionsproduktes von Goitrin und Nitrit. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 75, 101.
- Mirvish, S.S., 1975. Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and in-vivo occurrence. *Toxicology and Applied Pharmacology* 31, 325- 351.
- Muuse, B.G., H.J. van der Kamp, 1987. Determination of glucosinolates in crucifer vegetables for human consumption and rapeseed. In: J.P. Wathélet (Ed.), *Glucosinolates in rapeseed: analytical aspects* proceedings of a seminar in the CEC programme of research on plant productivity, held in Gembloux, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht (NL), 38-49.
- Münzer, R., 1986. Modifying action of vegetable juice on the mutagenicity of beef extract and nitrosated beef extract. *Food and Chemical Toxicology* 24, 847-849.
- Nagahara, A., K. Ohsita, S. Nasuno, 1986. Relation of nitrite concentration to mutagen formation in soy sauce. *Food and Chemical Toxicology* 24, 13-15.
- Piacek-Llanes, B.G., S.R. Tannenbaum, 1982. Formation of an activated N-nitroso compound in nitrite treated fava beans (*Vicia faba*). *Carcinogenesis* 3, 1379-1384.
- Pignatelli, B., I. Richards, M.C. Bourgade, H. Bartsch, 1987. An improved method for analysis of total N-nitroso compounds in gastric juice. In: H. Bartsch, I O'Neill, R. Schulte- Hermann, *The relevance of N-nitroso compounds to human cancer, exposures and mechanisms*, IARC Sci. Publ. no. 84, 209-215. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Preussmann, R., 1984. Carcinogenic N-nitroso compounds and their environmental significance. *Naturwissenschaften* 71, 25-30.
- Shuker, D.E., S.R. Tannenbaum, 1983. Determination of nonvolatile N-nitroso compounds in biological fluids by liquid chromatography with postcolumn photohydrolysis detection. *Analytical Chemistry* 55, 2152-2155.

- Spiegelhalder, B., G. Eisenbrand, R. Preussmann, 1976. Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in-vivo formation of N-nitrosocompounds. Food and Chemical Toxicology 14, 545-548.
- Spiegelhalder, B., 1983. Vorkommen von N-nitroso-verbindungen. In: R. Preussmann (ed.), Das Nitrosamin-problem, Verlag Chemie GmbH, Weinheim (BRD), 27-40.
- Wakabayashi, K., M. Nagao, T. Ho Chung, M. Yin, I. Karai, M. Ochiai, T. Tahira, T. Sugimura, 1984. Appearance of direct-acting mutagenicity of various foodstuffs produced in Japan and South-East Asia on nitrite-treatment. Mutation Research 158, 119-124.
- Wakabayashi, K., M. Nagao, M. Ochiai, T. Tahira, Z. Yamaizumi, T. Sugimura, 1985. A mutagen precursor in Chinese cabbage, indole-3-acetonitril, which becomes mutagenic on nitrite-treatment. Mutation Research 143, 17-21.
- Walters, C.L., M.J. Downes, M.W. Edwards, P.L.R. Smith, 1978. Determination of a non-volatile N-nitrosamine in a food matrix. Analyst London 103, 1127.
- Walters, C.L., F.P.A. Carr, C.S. Dyke, M.J. Saxby, P.L.R. Smith, 1979. Nitrite source and nitrosamine formation in-vitro and in-vitro. Food Cosmetical Toxicology 17, 473-479.
- Warenwet 1982.
- Wattenberg, L.W., W.B. Loub, 1978. Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon induced neoplasia by naturally occurring indoles. Cancer Research 38, 1410-1413.
- Yang, D., S.R. Tannenbaum, G. Büchi, G.C.M. Lee, 1984. 4-chloro-6-methoxyindole is the precursor of a potent mutagen (4-chloro-6-methoxy-2-hydroxy-1-nitroso-indolin-3-oxime) that forms during nitrosation of faba beans (*Vicia faba*). Carcinogenesis 5, 1219-1224.

Appendix A

	Latijnse naam	% droge	stof
	<i>Brassica oleracea</i>		
bloemkool	var. botrytis L., subvar. cauliflora DC.	8,66	
spruiten	var. gemmifera DC.	18,69	
savoie kool	var. sabauda L.	13,69	
broccoli	var. botrytis L., subvar. cymosa Lam.	14,84	
rode kool	var. capitata L.	10,16	
groene kool	var. sabauda L.	13,26	
spitskool	var. alba DC.	9,95	
witte kool	var. capitata L.	8,54	
koolrabi	var. gongyldodes L.	7,34	
Chinese kool	<i>Brassica pekinensis</i> (Lour.) Rupr.	6,00	
knolraap	<i>Brassica napus</i> L., var. napobrassica (L.) Rehb.	8,38	
spercieboon	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	10,59	
snijboon	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	9,63	
tuinboon	<i>Vicia faba</i> L.	17,94	
doperwt	<i>Pisum sativa</i> L.	35,33	
capucijner	<i>Pisum arvense</i> L.	23,66	
andijvie	<i>Chicorium endivia</i> L.	6,00	
witlof	<i>Chicorium intybus</i> L.	5,70	
spinazie	<i>Spinacia oleracea</i> L.	6,28	
sla	<i>Lactuca sativa</i> L.	5,91	
ui	<i>Allium cepa</i> L.	13,39	
prei	<i>Allium porrum</i> L.	10,23	
rode biet	<i>Beta vulgaris</i> L.	14,43	
waspeen	<i>Daucus carota</i> L.	10,07	
radijs	<i>Raphanus sativa</i> L.	4,01	
rettich	<i>Amoracia lapathifolia</i> Gilib	3,81	
gr. paprika	<i>Capsicum annuum</i> L.	6,52	
rode paprika	<i>Capsicum annuum</i> L.	10,40	
tomaat	<i>Lycopersicon lycopersicum</i> L.	7,24	
komkommer	<i>Cucumis sativus</i> L.	5,77	
champignon	<i>Agaricus campestris</i> L.	7,72	

Appendix B

Aminozuren in de onderzochte groentes weergegeven:

1e regel gemeten waarde in pmol

2e regel in nmol/25 mg droge stof

3e regel in nmol/25 mg vers

asp - aspartaat,

glu - glutamaat,

aad -,

ser - serine,

asn - asparagine,

gly - glycine,

gln - glutamine,

his - histidine,

thr - threonine,

ala - alanine,

arg - arginine,

sum - som asp t/m arg,

pro - proline,

tyr - tyrosine,

val - valine,

met - methionine,

2xcys - cysteine,

ile - isoleucine,

leu - leucine,

phe - phenylalanine,

trp - tryptofaan,

lys - lysine

AMINOZUREN IN DE ONDERZOCHE GROENTES

weergegeven: 1. gemeten waarde in pmol
 2. per 25 mg d.s. (=200) in nmol
 3. per 25 mg vers (=200*% d.s.) in nmol
 sum = som gehalten asp-arg of pro-lys
 tot. az = som gehalten asp-lys

groente	asp	glu	aad	ser	asn	gly	gln	his	thr	ala	arg	sum
blkl	146,13 29,23 2,53	228,555 45,71 3,96	7,10588 1,42 0,12	207,78 41,56 3,60	94,1597 18,83 1,63	25,6379 5,13 0,44	264,351 52,87 4,58	21,982 4,40 0,38	59,5534 11,91 1,03	431,1 86,22 7,47	76,2173 15,24 1,32	1562,57 312,51 27,06
and	90,9354 18,19 1,09	115,841 23,17 1,39	0 0,00 0,00	76,144 15,23 0,91	222,614 44,52 2,67	0 0,00 0,00	186,797 37,36 2,24	3,92271 0,78 0,05	36,5736 7,31 0,44	77,4241 15,48 0,93	34,9126 6,98 0,42	845,16 169,03 10,14
spr	93,5428 18,71 3,50	123,163 24,63 4,60	4,20565 0,84 0,16	78,6154 15,72 2,94	29,8378 5,97 1,12	12,1017 2,42 0,45	65,0274 13,01 2,43	14,0104 2,80 0,52	28,7346 5,75 1,07	60,1292 12,03 2,25	39,2098 7,84 1,47	548,58 109,72 20,51
tom	216,941 43,39 3,14	737,674 147,53 10,68	0 0,00 0,00	69,0382 13,81 1,00	96,6746 19,33 1,40	6,14695 1,23 0,09	352,348 70,47 5,10	0 0,00 0,00	30,0991 6,02 0,44	27,7131 5,54 0,40	5,8312 1,17 0,08	1542,47 308,49 22,33
ui	24,5105 4,90 0,66	57,1834 11,44 1,53	0 0,00 0,00	20,4168 4,08 0,55	60,7862 12,16 1,63	4,28055 0,86 0,11	308,48 61,70 8,26	8,97625 1,80 0,24	17,639 3,53 0,47	77,2058 15,44 2,07	267,599 53,52 7,17	847,08 169,42 22,68
rpap	111,34 22,27 2,32	38,4554 7,69 0,80	0 0,00 0,00	90,2283 18,05 1,88	455,272 91,05 9,47	0 0,00 0,00	148,768 29,75 3,09	14,1268 2,83 0,29	74,6807 14,94 1,55	34,874 6,97 0,73	52,0679 10,41 1,08	1019,81 203,96 21,21
witlof	60,1856 12,04 0,69	48,1252 9,63 0,55	0 0,00 0,00	130,576 26,12 1,49	351,002 70,20 4,00	7,291 1,46 0,08	255,44 51,09 2,91	26,0067 5,20 0,30	39,0752 7,82 0,45	186,669 37,33 2,13	127,609 25,52 1,45	1231,98 246,40 14,04

spboon	95,99	50,9476	0	310,592	481,228	15,0325	84,9347	22,4647	75,32	186,585	11,582	1334,68
	19,20	10,19	0,00	62,12	96,25	3,01	16,99	4,49	15,06	37,32	2,32	266,94
	2,03	1,08	0,00	6,58	10,19	0,32	1,80	0,48	1,60	3,95	0,25	8,27
chk1	143,08	297,675	0	192,83	158,697	36,6207	758,029	45,6124	99,3805	333,768	225,781	2291,47
	28,62	59,54	0,00	38,57	31,74	7,32	151,61	9,12	19,88	66,75	45,16	458,29
	1,72	3,57	0,00	2,31	1,90	0,44	9,10	0,55	1,19	4,01	2,71	27,50
wasp	24,2695	36,7744	0	10,1725	45,5025	0	19,1885	0	7,1706	49,1121	26,8558	219,05
	4,85	7,35	0,00	2,03	9,10	0,00	3,84	0,00	1,43	9,82	5,37	43,81
	0,49	0,74	0,00	0,20	0,92	0,00	0,39	0,00	0,14	0,99	0,54	4,41
grpap	143,696	58,6947	0	158,81	356,499	25,2613	243,908	0	46,2928	85,8895	52,354	1171,41
	28,74	11,74	0,00	31,76	71,30	5,05	48,78	0,00	9,26	17,18	10,47	234,28
	1,87	0,77	0,00	2,07	4,65	0,33	3,18	0,00	0,60	1,12	0,68	15,28
svkl	196,847	211,657	7,95349	153,844	108,505	10,7251	206,398	27,211	52,3304	164,569	254,193	1394,23
	39,37	42,33	1,59	30,77	21,70	2,15	41,28	5,44	10,47	32,91	50,84	278,85
	5,39	5,80	0,22	4,21	2,97	0,29	5,65	0,75	1,43	4,51	6,96	38,17
broc	91,2765	163,257	10,4351	256,416	264,162	35,521	509,758	0	147,923	227,649	215,101	1921,50
	18,26	32,65	2,09	51,28	52,83	7,10	101,95	0,00	29,58	45,53	43,02	384,30
	2,71	4,85	0,31	7,61	7,84	1,05	15,13	0,00	4,39	6,76	6,38	57,03
rdkl	149,012	193,845	0	226,957	128,989	15,0589	385,27	0	63,7282	161,502	161,759	1486,12
	29,80	38,77	0,00	45,39	25,80	3,01	77,05	0,00	12,75	32,30	32,35	297,22
	3,03	3,94	0,00	4,61	2,62	0,31	7,83	0,00	1,29	3,28	3,29	30,20
grkl	227,96	193,199	0	189,312	183,269	1,48657	410,417	82,3879	60,2373	183,11	370,063	1901,44
	45,59	38,64	0,00	37,86	36,65	0,30	82,08	16,48	12,05	36,62	74,01	380,29
	2,97	2,52	0,00	2,47	2,39	0,02	5,35	1,07	0,79	2,39	4,83	24,79
klrp	135,917	182,8	0	29,4317	146,407	0	281,222	36,8613	145,895	36,8299	522,067	1517,43
	27,18	36,56	0,00	5,89	29,28	0,00	56,24	7,37	29,18	7,37	104,41	303,49
	2,28	3,06	0,00	0,49	2,45	0,00	4,71	0,62	2,45	0,62	8,75	25,43

spkl	119,687	108,865	0	162,785	119,902	8,33796	272,632	36,823	78,6955	131,388	134,919	1174,03
	23,94	21,77	0,00	32,56	23,98	1,67	54,53	7,36	15,74	26,28	26,98	234,81
	2,38	2,17	0,00	3,24	2,39	0,17	5,43	0,73	1,57	2,61	2,68	23,36
wtkl	151,497	147,718	0	127,713	130,896	4,63195	305,929	55,4299	23,2651	105,437	139,167	1191,68
	30,30	29,54	0,00	25,54	26,18	0,93	61,19	11,09	4,65	21,09	27,83	238,34
	2,59	2,52	0,00	2,18	2,24	0,08	5,23	0,95	0,40	1,80	2,38	20,35
rbiet	62,5764	38,8501	0	84,2608	54,0199	4,29799	235,058	0	11,3897	89,6241	10,8386	590,92
	12,52	7,77	0,00	16,85	10,80	0,86	47,01	0,00	2,28	17,92	2,17	118,18
	1,81	1,12	0,00	2,43	1,56	0,12	6,78	0,00	0,33	2,59	0,31	17,05
spin	79,5578	75,7754	2,20435	51,9681	97,9469	3,8813	179,063	0	19,7967	67,0522	31,5175	608,76
	15,91	15,16	0,44	10,39	19,59	0,78	35,81	0,00	3,96	13,41	6,30	121,75
	1,00	0,95	0,03	0,65	1,23	0,05	2,25	0,00	0,25	0,84	0,40	7,65
prei	36,5789	113,031	0	93,1191	129,711	14,1323	239,322	12,2742	31,163	89,4016	52,8348	811,57
	7,32	22,61	0,00	18,62	25,94	2,83	47,86	2,45	6,23	17,88	10,57	162,31
	0,75	2,31	0,00	1,91	2,65	0,29	4,90	0,25	0,64	1,83	1,08	16,60
radijs	39,4198	38,0519	0	66,3538	62,6086	16,352	248,443	0	38,3946	83,9281	27,8891	621,44
	7,88	7,61	0,00	13,27	12,52	3,27	49,69	0,00	7,68	16,79	5,58	124,29
	0,32	0,31	0,00	0,53	0,50	0,13	1,99	0,00	0,31	0,67	0,22	4,98
champ	150,997	352,903	20,8476	92,4772	83,7935	84,7398	163,839	39,4772	72,3018	279,557	11,358	1352,29
	30,20	70,58	4,17	18,50	16,76	16,95	32,77	7,90	14,46	55,91	2,27	270,46
	23,31	54,49	3,22	14,28	12,94	13,08	25,30	6,10	11,16	43,16	1,75	208,79
klrb	150,915	115,188	0	74,8753	147,171	12,9458	1012,52	0	46,1667	112,561	141,532	1813,87
	30,18	23,04	0,00	14,98	29,43	2,59	202,50	0,00	9,23	22,51	28,31	362,77
	2,22	1,69	0,00	1,10	2,16	0,19	14,86	0,00	0,68	1,65	2,08	26,63
sla	66,0906	44,7627	0	58,9862	164,642	0	199,778	18,3268	35,7218	98,3843	28,3285	715,02
	13,22	8,95	0,00	11,80	32,93	0,00	39,96	3,67	7,14	19,68	5,67	143,00
	0,78	0,53	0,00	0,70	1,95	0,00	2,36	0,22	0,42	1,16	0,33	8,45

rett	48,0542	110,694	0	59,2476	47,688	29,2147	373,285	23,5266	51,0663	43,1065	87,7847	873,67
	9,61	22,14	0,00	11,85	9,54	5,84	74,66	4,71	10,21	8,62	17,56	174,73
	0,37	0,84	0,00	0,45	0,36	0,22	2,84	0,18	0,39	0,33	0,67	6,66
kom	44,4318	23,6562	3,47026	99,9627	94,3136	113,073	823,808	0	56,1294	127,626	131,792	1518,26
	8,89	4,73	0,69	19,99	18,86	22,61	164,76	0,00	11,23	25,53	26,36	303,65
	0,51	0,27	0,04	1,15	1,09	1,30	9,51	0,00	0,65	1,47	1,52	17,52
tuinb	95,0613	120,677	0	40,7674	222,051	10,9665	53,9045	0	24,3601	362,07	215,728	1145,59
	19,01	24,14	0,00	8,15	44,41	2,19	10,78	0,00	4,87	72,41	43,15	229,12
	4,29	5,45	0,00	1,84	10,03	0,50	2,44	0,00	1,10	16,36	9,75	51,76
snijb	104,848	39,6091	1,71651	287,043	565,524	6,93869	149,372	23,3337	100,761	185,056	12,8246	1477,03
	20,97	7,92	0,34	57,41	113,10	1,39	29,87	4,67	20,15	37,01	2,56	295,41
	1,19	0,45	0,02	3,26	6,41	0,08	1,69	0,26	1,14	2,10	0,15	16,75
erwt	18,8611	101,221	0	11,4185	20,2806	7,52955	8,41545	0	14,3617	129,803	146,808	458,70
	3,77	20,24	0,00	2,28	4,06	1,51	1,68	0,00	2,87	25,96	29,36	91,74
	1,33	7,15	0,00	0,81	1,43	0,53	0,59	0,00	1,01	9,17	10,37	32,41
capu	20,2514	129,018	0	39,5242	54,5203	16,1713	65,9514	0	84,7192	251,005	303,067	964,23
	4,05	25,80	0,00	7,90	10,90	3,23	13,19	0,00	16,94	50,20	60,61	192,85
	0,96	6,11	0,00	1,87	2,58	0,77	3,12	0,00	4,01	11,88	14,34	45,63
groente	pro	tyr	val	met	2xcys	ile	leu	phe	trp	lys	sum	tot, az
blk1	39,9215	18,0947	106,227	0	4,57064	42,9505	20,6653	23,4568	5,17097	10,8383	271,90	1834,47
	7,98	3,62	21,25	0,00	0,91	8,59	4,13	4,69	1,03	2,17	54,38	366,89
	0,69	0,31	1,84	0,00	0,08	0,74	0,36	0,41	0,09	0,19	4,71	31,77
and	26,5639	3,86175	20,4976	1,72115	5,70223	19,0202	6,11862	10,9795	5,81636	4,63805	104,92	950,08
	5,31	0,77	4,10	0,34	1,14	3,80	1,22	2,20	1,16	0,93	20,98	190,02
	0,32	0,05	0,25	0,02	0,07	0,23	0,07	0,13	0,07	0,06	1,26	11,40
spr	753,714	6,53697	41,6864	0	7,68604	20,0944	10,4814	5,11109	4,59274	3,00771	852,91	1401,49
	150,74	1,31	8,34	0,00	1,54	4,02	2,10	1,02	0,92	0,60	170,58	280,30
	28,17	0,24	1,56	0,00	0,29	0,75	0,39	0,19	0,17	0,11	31,88	52,39

com	30,2523	5,30944	14,1028	0	5,21493	15,5866	19,0961	29,3094	3,42175	7,15967	129,45	1671,92
	6,05	1,06	2,82	0,00	1,04	3,12	3,82	5,86	0,68	1,43	25,89	334,38
	0,44	0,08	0,20	0,00	0,08	0,23	0,28	0,42	0,05	0,10	1,87	24,21
ui	13,5849	27,7522	29,5677	2,89637	4,12931	14,5544	70,82	18,4269	15,4341	40,6684	237,83	1084,91
	2,72	5,55	5,91	0,58	0,83	2,91	14,16	3,69	3,09	8,13	47,57	216,98
	0,36	0,74	0,79	0,08	0,11	0,39	1,90	0,49	0,41	1,09	6,37	29,05
rpap	142,051	2,361	31,6465	7,0414	6,63652	10,0928	15,512	9,43258	1,99295	10,2306	237,00	1256,81
	28,41	0,47	6,33	1,41	1,33	2,02	3,10	1,89	0,40	2,05	47,40	251,36
	2,95	0,05	0,66	0,15	0,14	0,21	0,32	0,20	0,04	0,21	4,93	26,14
witlof	157,47	12,1396	50,3952	0	1,85912	58,6092	25,7386	36,4596	7,50748	3,74432	353,92	1585,90
	31,49	2,43	10,08	0,00	0,37	11,72	5,15	7,29	1,50	0,75	70,78	317,18
	1,80	0,14	0,57	0,00	0,02	0,67	0,29	0,42	0,09	0,04	4,03	18,08
spboon	19,694	2,91247	45,2636	4,90168	4,65436	19,5919	20,0374	4,72125	0	0	121,78	1456,45
	3,94	0,58	9,05	0,98	0,93	3,92	4,01	0,94	0,00	0,00	24,36	291,29
	0,42	0,06	0,96	0,10	0,10	0,41	0,42	0,10	0,00	0,00	2,58	30,85
chk1	164,45	7,33387	98,4697	0	5,85377	54,835	32,2131	24,9192	7,29337	21,832	417,20	2708,67
	32,89	1,47	19,69	0,00	1,17	10,97	6,44	4,98	1,46	4,37	83,44	541,73
	1,97	0,09	1,18	0,00	0,07	0,66	0,39	0,30	0,09	0,26	5,01	32,50
wasp	30,6567	16,993	2,59012	1,06718	6,30696	2,9729	1,50552	3,72703	0	0	65,82	284,87
	6,13	3,40	0,52	0,21	1,26	0,59	0,30	0,75	0,00	0,00	13,16	56,97
	0,62	0,34	0,05	0,02	0,13	0,06	0,03	0,08	0,00	0,00	1,33	5,74
grpap	34,3825	3,3234	46,2002	3,48362	0	11,489	11,7281	12,7707	0	7,12595	130,50	1301,91
	6,88	0,66	9,24	0,70	0,00	2,30	2,35	2,55	0,00	1,43	26,10	260,38
	0,45	0,04	0,60	0,05	0,00	0,15	0,15	0,17	0,00	0,09	1,70	16,98
svk1	718,784	16,5523	67,7809	0	0	30,4937	15,9601	23,0153	8,64866	8,69997	889,93	2284,17
	143,76	3,31	13,56	0,00	0,00	6,10	3,19	4,60	1,73	1,74	177,99	456,83
	19,68	0,45	1,86	0,00	0,00	0,83	0,44	0,63	0,24	0,24	24,37	62,54

broc	741,49	41,045	185,543	0	7,06455	94,7961	87,9955	52,913	21,4016	78,2154	1310,46	3231,96
	148,30	8,21	37,11	0,00	1,41	18,96	17,60	10,58	4,28	15,64	262,09	646,39
	22,01	1,22	5,51	0,00	0,21	2,81	2,61	1,57	0,64	2,32	38,89	95,92
rdkl	379,292	14,3189	134,581	0	0	72,9656	41,5198	24,4742	11,1203	14,4684	692,74	2178,86
	75,86	2,86	26,92	0,00	0,00	14,59	8,30	4,89	2,22	2,89	138,55	435,77
	7,71	0,29	2,73	0,00	0,00	1,48	0,84	0,50	0,23	0,29	14,08	44,27
grkl	722,732	16,8056	144,766	1,70742	3,68717	70,2127	30,8879	43,8927	26,6376	18,4803	1079,81	2981,25
	144,55	3,36	28,95	0,34	0,74	14,04	6,18	8,78	5,33	3,70	215,96	596,25
	9,42	0,22	1,89	0,02	0,05	0,92	0,40	0,57	0,35	0,24	14,08	38,88
klrp	23,0049	28,5834	82,5454	0	2,97202	48,2516	8,72856	48,8736	10,7121	2,96908	256,64	1774,07
	4,60	5,72	16,51	0,00	0,59	9,65	1,75	9,77	2,14	0,59	51,33	354,81
	0,39	0,48	1,38	0,00	0,05	0,81	0,15	0,82	0,18	0,05	4,30	29,73
spkl	166,011	11,3177	107,608	0	3,99867	57,0736	34,0982	35,959	21,8143	31,277	469,16	1643,19
	33,20	2,26	21,52	0,00	0,80	11,41	6,82	7,19	4,36	6,26	93,83	328,64
	3,30	0,23	2,14	0,00	0,08	1,14	0,68	0,72	0,43	0,62	9,34	32,70
wtkl	240,863	6,45675	65,0705	0	3,68476	26,643	5,60342	15,5127	8,65601	6,2711	378,76	1570,45
	48,17	1,29	13,01	0,00	0,74	5,33	1,12	3,10	1,73	1,25	75,75	314,09
	4,11	0,11	1,11	0,00	0,06	0,46	0,10	0,26	0,15	0,11	6,47	26,82
rbiet	15,0519	30,5626	25,5286	0	0	15,292	10,7759	4,45688	0	0	101,67	692,58
	3,01	6,11	5,11	0,00	0,00	3,06	2,16	0,89	0,00	0,00	20,33	138,52
	0,43	0,88	0,74	0,00	0,00	0,44	0,31	0,13	0,00	0,00	2,93	19,99
spin	7,44331	19,4781	42,1198	2,36024	6,02806	32,4603	52,3844	23,8026	6,52775	15,1648	207,77	816,53
	1,49	3,90	8,42	0,47	1,21	6,49	10,48	4,76	1,31	3,03	41,55	163,31
	0,09	0,24	0,53	0,03	0,08	0,41	0,66	0,30	0,08	0,19	2,61	10,26
prei	21,8536	7,04656	32,1047	0	2,73117	16,142	79,8086	10,2415	6,9734	19,394	196,30	1007,86
	4,37	1,41	6,42	0,00	0,55	3,23	15,96	2,05	1,39	3,88	39,26	201,57
	0,45	0,14	0,66	0,00	0,06	0,33	1,63	0,21	0,14	0,40	4,02	20,62

radijs	18,4009	10,2016	60,8703	3,65335	0	26,1291	10,4297	14,9184	3,97712	12,2322	160,81	782,25
	3,68	2,04	12,17	0,73	0,00	5,23	2,09	2,98	0,80	2,45	32,16	156,45
	0,15	0,08	0,49	0,03	0,00	0,21	0,08	0,12	0,03	0,10	1,29	6,27
champ	39,6518	31,3697	54,5519	5,15935	4,06144	27,9559	61,8351	46,1164	280,815	28,4113	579,93	1932,22
	7,93	6,27	10,91	1,03	0,81	5,59	12,37	9,22	56,16	5,68	115,99	386,44
	0,61	0,48	0,84	0,08	0,06	0,43	0,95	0,71	4,34	0,44	8,95	217,75
klrb	71,9643	13,5883	85,1837	1,92914	0	52,8429	15,6441	11,3006	12,0692	20,7141	285,24	2099,11
	14,39	2,72	17,04	0,39	0,00	10,57	3,13	2,26	2,41	4,14	57,05	419,82
	1,06	0,20	1,25	0,03	0,00	0,78	0,23	0,17	0,18	0,30	4,19	30,81
sla	26,7869	30,5448	73,6783	1,53358	0	43,6188	46,4552	24,8944	11,6405	13,9951	273,15	988,17
	5,36	6,11	14,74	0,31	0,00	8,72	9,29	4,98	2,33	2,80	54,63	197,63
	0,32	0,36	0,87	0,02	0,00	0,52	0,55	0,29	0,14	0,17	3,23	11,68
rett	30,6857	11,7556	85,7101	3,27794	0	42,1924	12,7797	29,3005	9,69178	15,5656	240,96	1114,63
	6,14	2,35	17,14	0,66	0,00	8,44	2,56	5,86	1,94	3,11	48,19	222,93
	0,23	0,09	0,65	0,02	0,00	0,32	0,10	0,22	0,07	0,12	1,84	8,49
kom	15,6591	20,1371	40,59	32,4188	0	44,0714	48,8418	28,9756	10,6016	12,7595	254,05	1772,32
	3,13	4,03	8,12	6,48	0,00	8,81	9,77	5,80	2,12	2,55	50,81	354,46
	0,18	0,23	0,47	0,37	0,00	0,51	0,56	0,33	0,12	0,15	2,93	20,45
tuinb	22,7258	19,1531	52,5954	0,955342	0	20,2694	20,2105	5,22963	0,33048	29,7445	171,21	1316,80
	4,55	3,83	10,52	0,19	0,00	4,05	4,04	1,05	0,07	5,95	34,24	263,36
	1,03	0,87	2,38	0,04	0,00	0,92	0,91	0,24	0,01	1,34	7,74	59,49
snijb	4,68084	0	57,3538	12,7557	2,80803	19,6382	17,377	11,6435	0	1,46491	127,72	1604,75
	0,94	0,00	11,47	2,55	0,56	3,93	3,48	2,33	0,00	0,29	25,54	320,95
	0,05	0,00	0,65	0,14	0,03	0,22	0,20	0,13	0,00	0,02	1,45	18,20
erwt	0	0	6,03652	0	0	2,37385	2,98269	1,65919	0	1,84344	14,90	473,59
	0,00	0,00	1,21	0,00	0,00	0,47	0,60	0,33	0,00	0,37	2,98	94,72
	0,00	0,00	0,43	0,00	0,00	0,17	0,21	0,12	0,00	0,13	1,05	33,46

capu	7,74521	6,76405	46,6341	0	1,9592	21,1619	14,6472	4,81403	1,80358	9,17681	114,71	1078,93
	1,55	1,35	9,33	0,00	0,39	4,23	2,93	0,96	0,36	1,84	22,94	215,79
	0,37	0,32	2,21	0,00	0,09	1,00	0,69	0,23	0,09	0,43	5,43	51,06