

Rotterdam 1967/II

231

E 2

13. Europäisches Treffen der Fleischforscher Rotterdam
20. - 26. August 1967

Nachweis und Bestimmung von Alkylnitrosaminen in
Fleischerzeugnissen

Klement M ö h l e r und Otto L. M a y r h o f e r
Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie München

Die unmittelbare Bildung von Nitrosaminen in Fleischerzeugnissen mit Zusatz von Nitrat oder Nitrit ist unwahrscheinlich, da nicht Nitrit sondern HNO_2 mit sekundären Aminen reagiert. Eine andere Bildungsmöglichkeit ist die Reaktion mit NO. Da wir aus den Arbeiten von W a l t e r s und T a y l o r (1) wissen, dass bei der Behandlung von Fleisch mit Nitrit das Stickoxyd nicht nur gebunden im Pökelfarbstoff, sondern auch frei auftritt, muss diese Möglichkeit in Erwägung gezogen werden. Aus Bilanzversuchen(2) hatte sich der Hinweis ergeben, dass nur sehr geringe Mengen an Nitrosaminen gebildet werden können, die Grössenordnung müsste unter 1 p.p.M. liegen.

Für Nachweis und Bestimmung der Nitrosamine war die Feststellung von R. P r e u s s m a n n (3) sehr wichtig, dass nämlich die Nitrosamine bei Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht in Stickoxyd und das entsprechende Amin gespalten werden. Führt man z.B. auf Kieselgel-Dünnschichtplatten mit Hexan, Äther, Dichlormethan (4:3:2) eine Trennung durch, so können nach einer 15 min. dauernden Bestrahlung der Platten mit intensivem, kurzwelligem UV-Licht die Nitrosamine über das abgespaltene NO mit dem G r i e s s - Reagens identifiziert werden. Auf diese Weise sind z.B. 2/µg Dimethylnitrosamin gut zu erkennen. Die photochemische Spaltung lässt sich auch in 0,5%iger Natriumcarbonatlösung vornehmen, die colorimetrische Messung der Griess-Reaktion ergibt für 5/µg Dimethylnitrosamin in 20 ml Messlösung eine Extinktion von 0,1, ist also sehr empfindlich.

Eine interessante Möglichkeit bietet die Reduktion der Nitrosamine zu den entsprechenden Hydrazinen. G. N e u r a t h und Mitarb. (4) haben die Nitrosamine mit Lithiumalanat reduziert und durch Kondensation mit 5-Nitro-2-hydroxybenzaldehyd nachgewiesen. Leider verläuft die Reduktion, die auf anderem Wege in der Industrie in grosstechnischem Umfang durchgeführt wird, bei den Mikromengen der Analyse nur mit einer Ausbeute von 10% und erreicht daher nicht die Empfindlichkeit der anderen Verfahren. Die technische Nitrosaminverarbeitung war im übrigen der Ausgangspunkt für die Erkennung der Toxizität der Nitrosamine und im Zusammenhang mit diesen Arbeiten haben H e a t h und J a r v i s (5) die ersten polarographischen Nitrosaminbestimmungen durchgeführt. Wir halten diesen Weg für ausbaufähig, konnten ihn aber aus apparativen Gründen selbst nicht weiter verfolgen.

Die Nitrosamine sind, zumindest in den niedermolekularen Gliedern, leicht flüchtig, sie können daher nur in der Lösungsphase gewonnen oder angereichert werden. Eine einfache Überlegung der Mengenverhältnisse zeigt, dass bei Einsatz von 50-200 g Untersuchungsmaterial auf den allgemein üblichen Verarbeitungswegen (Wasserdampfdestillation, Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, Reinigung der Extrakte, Konzentrieren auf möglichst kleines Endvolumen) Mengen unter 1 p.p.M. mittels der Dünnschichtchromatographie nicht erfasst werden können, dagegen verspricht die colorimetrische Messung Erfolg.

Man kann Dimethyl- und Diäthylnitrosamin in wässriger Lösung auch direkt durch Messung der Extinktion bei 230 nm bestimmen. Diese Messung erreicht zwar nur 1/4 der Empfindlichkeit der colorimetrischen Methode, würde aber manche ihrer Nachteile vermeiden. Extrakte aus Lebensmitteln enthalten jedoch auch nach den üblichen Reinigungsverfahren Neutralstoffe, die ebenfalls bei 230 nm absorbieren und die Bestimmung unmöglich machen. Ähnliche Störungen treten auch bei der colorimetrischen Methode auf, wenn man mit Mikromengen arbeitet, schon der Gehalt der Laboratoriumsluft an nitrosen Gasen (Gasbrenner, Tabakrauch) kann Blindwerte

in Höhe der Messwerte verursachen. Weiterhin mussten wir bei Eichversuchen feststellen, dass im Verlauf der Isolierung hohe Verluste an zugesetztem Nitrosamin auftreten, die maximal 80% erreichen können. Diese Fehler haben wir bei der Auswertung berücksichtigt.

Alle Versuche in den angedeuteten Richtungen bestätigen lediglich die frühere Beobachtung, dass ein Gehalt an Nitrosaminen in Fleischerzeugnissen nur in der Grössenordnung von 1 p.p.M. und darunter auftreten kann. Das Problem von Nachweis und Bestimmung der Nitrosamine in Lebensmittel liegt daher in der Isolierung.

Ein wesentlicher Fortschritt konnte durch Einsatz der Gaschromatographie erzielt werden. Mit einer 1,8 m Säule mit DEGS-Füllung liess sich bei 160°C eine gute Trennung erzielen. Gleichlaufend haben wir das Extraktionsverfahren erweitert. Wir extrahieren zunächst das Untersuchungsmaterial bei Zimmertemperatur mit Dichlormethan, trennen die Miscella durch Zentrifugieren oder Filtrieren und arbeiten den Extrakt in mehreren Stufen durch Einengen, Wasserdampfdestillation, Ausschütteln usw. auf. Aus 1 kg rohem, unbehandeltem Rindfleisch erhielten wir am Ende 1 ml Extrakt, der im Gaschromatogramm einen mit Dimethylnitrosamin identischen kleinen Peak zeigte. Die quantitative Auswertung würde unter Berücksichtigung aller Fehlermöglichkeiten einem Gehalt von 0,25 p.p.M. Dimethylnitrosamin entsprechen, die Identität ist auf diesem Wege jedoch nicht erwiesen. Wenn wir ein Vorkommen von Dimethylnitrosamin in rohem, unbehandeltem Fleisch als unwahrscheinlich betrachten, so gibt dieser Befund den Anlass, alle bisherigen Befunde über Nitrosamingehalte in Fleischerzeugnissen, Käse oder Mehl mit grösster Vorsicht zu bewerten. Die Störungsmöglichkeiten sind vielseitig. Wir haben bei den letztgenannten Versuchen keine Blindwerte erhalten, wenn wir analysenreines Dichlormethan verwendeten. Bei einer Probe von gewöhnlichem Dichlormethan für technische Zwecke erhielten wir dagegen an der Stelle des Dimethylnitrosamins einen starken Peak. Wir sind daher im Augenblick damit beschäftigt, die im Gaschromatographen getrennten Substanzen präparativ anzureichern und dann zu identifizieren. Meinem Mitarbeiter ist diese anreicherung durch unmittelbaren Ein-

satz von Dünnschichtplatten gelungen. Damit kann im Anschluss an die gaschromatographische Trennung eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt werden, die eine weitere Isolierung und Identifizierung erlaubt. Wir hoffen damit in den p.p.B.-Bereich vordringen zu können.

Literatur:

- 1) Walters, C.L. u. A.McM. Taylor: Biochimica Biophysica Acta 86, 448 (1964)
- 2) Möhler, Kl.: Vortrag 11. Europ. Treffen der Fleischforscher 16.-21.8.1965 Belgrad
- 3) Preussmann, R.: Nature 201, 502 (1964), Daiber, D.u.R.
Preussmann: Z. analyt. Chemie 206, 344 (1964)
- 4) Neurath, G. und Mitarb.: Chem.Ber.97, 1631 (1964)
- 5) Heath, D.F. und J.A.E. Jarvis: Analyst 80, 613 (1955)
- 6) Mayrhofer, O.L. u. Kl. Möhler: Ztschr.Lebensm. Unters. Forsch. im Druck.

Zusammenfassung:

Die Prüfung auf das Vorkommen von Dimethyl- und Diäthylnitrosamin in Fleischerzeugnissen mit Hilfe colorimetrischer, spektroskopischer und gaschromatographischer Methoden ergab bisher keinen einwandfreien positiven Beweis, da ein eventueller Gehalt bei 1 p.p.M. und darunter liegen muss. Zur einwandfreien Bestimmung von Nitrosaminen in Lebensmitteln in dieser Grössenordnung wurden geeignete Methoden erarbeitet, die nunmehr zur Untersuchung von Lebensmitteln herangezogen werden.

Summary:

In testing meat products by colorimetric, spectrophotometric and gas-liquid-chromatographic methods no evidence of presence of dimethyl- and diethylnitrosamin was obtained, since a possible content must lie near 1 p.p.M. and below. For testing alkyl-nitrosamines in food in the p.p.B. region suitable methods are recommended for future investigations.