

A. Mirna

1. Einleitung

Von den Umsetzungsprodukten des Nitrits in Fleischerzeugnissen ist in erster Linie das Nitrosomyoglobin (NOMB) von Interesse, dessen Bildung allerdings nur ein verhältnismässig geringer Anteil des zugesetzten Nitrits verbraucht wird. Ein Teil verbleibt als sogenanntes "freies" Nitrit zurück, der andere Teil setzt sich mit verschiedenen reaktionsfähigen Gruppen des Fleisches um; über verschiedenartige Reaktionsprodukte findet man in der Literatur nur wenige Angaben.

2. Allgemeine Betrachtungen

Von den in Fleisch vorkommenden, mit Nitrit reaktionsfähigen Gruppen wären vor allem Amino-, Imino- und SH-Gruppen in Betracht zu ziehen:

- a)  $-NH_2 + HONO \rightarrow -OH + N_2 + H_2O$  Van Slyke-Reaktion
- b)  $NH + HONO \rightarrow N - NO + H_2O$  N-Nitrosamine bzw. N-Nitrosamide
- c)  $R-OOC-CH_2-NH_2 + HONO \rightarrow R-OOC-CH=N=N + 2 H_2O$  Diazoverbindungen
- d)  $-SH + HONO \rightarrow -SNO + H_2O$  Nitrosothiole

a): bei 0° und einem pH-Wert von etwa 4 findet vorwiegend Desaminierung entsprechend der von Slyke-Reaktion statt; die dabei entstehenden Reaktionsprodukte der Proteine sind stets etwas gelblich gefärbt, ein Zeichen, dass sich dabei auch Nebenreaktionen unter Bildung von Nitro-, Nitroso- und Diazo-Verbindungen abspielen (5). Diese Umsetzungen sind pH-abhängig. Nach den üblichen Verfahren wird in einem heterogenen Gemenge, wie es auch ein so fein zerkleinertes Brät

darstellt, nur ein "mittlerer" pH-Wert gemessen. Ob in intracellulären Bereichen pH-Werte auftreten, die von diesem mittleren pH-Wert beträchtlich abweichen und die daher eine Umsetzung nach van Slyke bzw. die Bildung von Diazokörper verursachen, ist nicht bekannt.

Zu b): ENDER und CEH (2) geben an, dass in eiweisshaltigen Materialien Nitrit mit Methylaminen schon bei pH 6,5 unter Bildung carcinogener N-Nitrosamine zu reagieren vermag. Sie fanden in Fleischwaren 0,6 bis 5,7 g/kg niedermolekulare, relativ leicht lösliche N-Nitrosamine. Auf die Problematik der quantitativen Erfassung solcher Stoffe weisen insbesondere NEURATH (12) und MÖHLER und MAYRHOFER (11) hin. Die Art der <sup>erf. Methylaminen</sup> Isolierung (Extraktion mit Wasser bei 90°C, mehrfache Destillation aus 3 M NaOH) kann zu Verlusten und Artefakten führen; <sup>Hydrolyse</sup> ausserdem werden <sup>Hydrolyse</sup> unlösliche, an fibrilläre Proteine gebundene Nitrosamine nicht mit erfasst. Es ist bekannt, dass N-Nitrosamine und N-Nitrosamide Proteine und Nucleotide alkylieren können (1, 7). Die Alkylierung von Proteinen konnte mit C-14 markierten Dimethyl-N-Nitrosamin durch den biochemischen Nachweis von methyliertem <sup>in vitro</sup> Histidin <sup>in vivo</sup> erbracht werden; desgleichen wurde in vivo die Methylierung von Nukleinsäuren (durch Bildung von 7-Methylguanin) beobachtet (9).

Zu c): Untersuchungen über die Bildung von Diazo-Körpern in Fleischwaren wurden unseres Wissens bisher nicht durchgeführt. Diese Frage ist wegen deren besonderen Reaktionsfähigkeit, z.B. zu Azoproteinen, von grossem Interesse. In diesem Zusammenhang wäre auf die umfangreichen Untersuchungen von LANDSTEINER (8) hinzuweisen, der gezeigt hat,

dass die serologische Spezifität von Proteinen je nach der Art der Kupplungskomponenten in weitem Umfange modifiziert werden kann.

Zu d): im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Reaktion von SH-Gruppen mit Nitrit konnte die Bildung von Nitrosothiolen in Fleischwaren wahrscheinlich gemacht werden (10). Neben den Reaktionen der salpetrigen Säure bzw. des Nitrosyl-Ions wären auch Umsetzungen mit daraus entstehenden Reduktionsprodukten (Hydroxyl-amin, untersalpetrige Säure) in Betracht zu ziehen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Verteilung des Nitrits und dessen Reaktionsprodukten - sofern sie unter den gewählten Fällungsbedingungen eine positive Griess'sche Reaktion geben - in Rohwurstbräten, den daraus gewonnenen Myofibrillen sowie im Actomyosin.

### 3. Verfahren

Zur Ausfällung der Proteine und anderer fleischeigener Stoffe wurde das Verfahren nach GRAU-MIRNA (4), die AOAC-Methode (13) bzw. eine Kombination der beiden Verfahren verwendet. Durch Zusatz von  $Hg^{2+}$ -Ionen wurden die Proteine gefällt und die an Schwefel gebundene NO-Gruppe der Nitrosothiole R-SNO abgespalten und als Nitrit mit erfasst (14).

#### Methode a)

10 g Probe werden in einem 150 ml Becherglas (hohe Form) mit 40 ml  $H_2O$  und 10 ml ges. Boraxlösung angeteigt, 15 Minuten bei Zimmertemperatur unter öfterem Umrühren extrahiert und dann

I) 5 ml 5%  $HgCl_2$  bzw.

II) 2 ml Carrez II (300 g  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O/1000$  ml)

tropfenweise zugesetzt. Nach 15 Minuten Stehen spült man in einen

200 ml Messkolben über, füllt zur Marke auf und filtriert durch ein Faltenfilter. Die Fällung mit  $\text{Hg}^{2+}$  liefert das sogenannte Gesamt-NO, die mit  $\text{Zn}^{2+}$  das freie NO.

In einigen Versuchen haben wir auch basische Ferriacetat-Lösung zur Klärung verwendet, mit dem Ergebnis, dass im Mittel mehr Nitrit als bei der Klärung mit Carrez II gefunden wurde. Somit erhält man je nach der Art des Klärungsmittels eine variable Menge an Griess-positiven Stoffen, die letztlich als Nitrit erfasst werden.

#### Methode b)

Da nach den zuvor angegebenen Verfahren eine zuverlässige Differenzierung zwischen den verschiedenen Bindungsformen bzw. Reaktionsprodukten des Nitrits nicht möglich schien, wurde versucht, eine Trennung von echt gelösten und in irgendeiner Form an Protein gebundenem NO vorzunehmen. Dazu bietet sich die bekannte Methode von HORNSEY zur Bestimmung des Nitrosomyoglobins (NOMB) an, die wir in der von GANTNER (3) angegebenen Modification verwendet haben.

Durch die Extraktion mit wässrigem Aceton werden "freies" Nitrit sowie NOMB entfernt und die Proteine mit dem daran gebundenen NO gefällt. In dem Rückstand kann nach Klärung mit  $\text{Hg}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  das abspaltbare NO bestimmt werden. Im einzelnen wurde wie folgt verfahren:

10 g Probe werden in einem 100 ml Zentrifugenglas mit 3,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  angeteigt und nach 5 Minuten Stehen tropfenweise unter gutem Durchwischen 40 ml Aceton zugesetzt. Man belässt 1 Stunde im Kühlschrank und zentrifugiert dann bei 2000 Upm (2 Min.) ab. Den Überstand kann man nach Filtration zur Bestimmung des NOMB verwenden. Der Rückstand wird noch zweimal in der angegebenen Weise extra-

hiert und jeweils eine halbe Stunde im Kühleschrank belassen; durch Auspressen des Rückstands mit einem Glasstab wird versucht, die flüssige Phase möglichst weitgehend zu entfernen. Dem so erhaltenen Rückstand setzt man 10 ml ges. Boraxlösung zu, spült mit etwa 40 ml H<sub>2</sub>O in ein 150 ml Becherglas (hohe Form) und verkocht das Aceton im siedenden Wasserbad. Nach dem Abkühlen wird tropfenweise 5 ml 5% HgCl<sub>2</sub>- und 2 ml Carrez II-Lösung zugegeben, in einem 200 ml Kolben gespült, zur Marke aufgefüllt und filtriert.

Das im Filtrat mit Griess'schem Reagenz bestimmbare Nitrit ist im folgenden als Rest-NO bezeichnet.

Die Bestimmung des Nitrits ohne vorhergehende Extraktion mit Aceton liefert das Gesamt-NO.

#### 4. Versuche und Ergebnisse

Zur Bestimmung der Reaktionsprodukte des Nitrits ist es notwendig, das Verhalten gegenüber den angewandten Klärungsmitteln (Zn<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>) und der Extraktionstemperatur zu kennen.

Zuerst haben wir den Einfluss der Temperatur auf das Ausmass der Extraktion von Nitrit untersucht. Dazu wurde Rindfleisch umgerötet, das freie Nitrit weitgehend durch Dialyse entfernt und im Rückstand nach Fällung mit Zn<sup>2+</sup> bzw. Hg<sup>2+</sup> (Methode a) jeweils das Nitrit bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigt Tab.1.

Tabelle 1

Bestimmung des freien- und des Gesamt-NO in umgerötetem, dialysiertem Rindfleisch. Klärung nach Methode a)

Temperatur (°C):	20°	30°	50°	70°	100°
Fällung mit Zn <sup>2+</sup> :	4,2	4,7	9,5	14,8	18,1 mg NO/kg
Fällung mit Hg <sup>2+</sup> :	29,9	31,0	25,1	20,3	19,7 mg NO/kg

Wie daraus ersichtlich, variieren die erhaltenen Werte stark mit der Temperatur. Zur Differenzierung des unterschiedlich gebundenen NO ist es erforderlich, die Extraktion bei Zimmertemperatur vorzunehmen.

Als nächstes prüften wir die Möglichkeit der Entstehung Griess-positiv reagierender Stoffe aus

- Dimethyl-N-Nitrosamin (DMNA)\*)
- N-Nitroso-sarkosinathylester (NSAE)\*)
- N-Nitroso-methylharnstoff (NMH)\*) und
- Hydroxylamin

in Phosphatpuffer pH 5,5 bei Zimmertemperatur. Der Berechnung der Umsatzungsrate (in %) wurde die Annahme zugrunde gelegt, dass aus diesen Verbindungen pro Mol je ein Mol Nitrit gebildet wird. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tab.2 zusammengefasst.

Tabelle 2

Umsatzungsraten (%) ca. 1 mM Lösungen in Phosphatpuffer pH 5,5. Klärung nach Methode b), Bestimmung als Gesamt-NO

Bezeichnung	0	1	2	5 Tage
				% Umsetzung
Dimethyl-N-nitrosamin	0,2	0,5	1,5	2,3
N-Nitroso-sarkosinathylester	0,4	0,7	2,2	2,2
N-Nitroso-methylharnstoff	3,6	6,1	9,6	15,9
Hydroxylamin	58	-	59	58

\*) Die angegebenen Verbindungen wurden uns freundlicherweise von Doz. Dr. R. Preussmann, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg i.Br., zur Verfügung gestellt.

Demnach ist unter den Bedingungen der Klärung nach Methode b) je nach der Konzentration der betreffenden Stoffe, eine Störung der Nitritbestimmung durch NMI und Hydroxylamin, nicht aber durch DMNA oder NSAE zu erwarten.

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss des pH-Wertes auf das Ausmass der Bildung von Nitrosierungsprodukten in Myofibrillen studiert.

Myofibrillen (hergestellt nach 6) aus Rindfleisch wurden mit  $\text{NaNO}_2$ -Lösung versetzt und mit verdünnter Essigsäure auf pH-Werte von 5,8 bis 3,8 eingestellt. In den Ansätzen wurde unmittelbar danach, dann nach 1, 2 und 3 Tagen die NO-Werte nach Klärung mit  $\text{Zn}^{2+}$  bzw.  $\text{Hg}^{2+}$  bestimmt. In der Abb.1 ist das durch  $\text{Hg}^{2+}$  abspaltbare NO in %, berechnet aus der Differenz ( $\text{NO}_{\text{Hg}} - \text{NO}_{\text{Zn}}$ ) aufgetragen. Daraus ist ersichtlich, dass mit fallendem pH und zunehmender Einwirkungsdauer ein beträchtlicher Anstieg des durch  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen freiwerdenden NO eintritt. Bei pH-Werten über 6 ist dagegen nur mehr ein geringer Unterschied zwischen den Werten der  $\text{Hg}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -Fällung zu erwarten.

Nach 5 Tagen wurden aus den verschiedenen Ansätzen durch mehrfaches Waschen mit Wasser das freie NO weitgehend entfernt und der Rückstand nach der Methode a) analysiert. In allen Proben waren etwa 70% durch  $\text{Hg}^{2+}$  abspaltbares NO nachweisbar.

Um Verluste an Eiweiss beim Auswaschen mit Wasser bzw. Störungen der Griess'schen Reaktion durch NOMB herabzusetzen, wurde in den weiteren Untersuchungen zur Extraktion des freien NO nach der Methode b) verfahren. Als Modell dienten Rohwurstbräte aus Rindfleisch ohne bzw. mit Zusätzen an Glucono-d-Lacton bzw. Natriumascorbat.

Untersucht wurden nach 5-tägiger Reifung das Brät sowie die

daraus hergestellten Myofibrillen und das Actomyosin (15). Die Rohwurstbräte der einzelnen Versuchschargen enthielten folgende Zusätze:

- A) 2,8% Nitritpökelsalz (NPS)
- B) 2,9% Nitritpökelsalz + 0,48% Glucono-d-Lacton (GdL).
- C) 3,1% Nitritpökelsalz + 0,05% Na-Ascorbat (Na-AS).

In der Tab.3 finden sich die nach den verwendeten Verfahren erhaltenen Prozentanteile an Myofibrillen und Actomyosin, die prozentuelle Umrötung sowie die Verteilung des Gesamt-NO und des Rest-NO, bezogen auf das NO des ursprünglich zugesetzten Nitritis.

Tabelle 3

Verteilung des Gesamt- und Rest-NO im Brät, in Myofibrillen und im Actomyosin sowie des NO aus dem Nitrosomyoglobin in Rohwürsten aus Rindfleisch nach 5-tägiger Reifung

Nitritgehalt des ungeröteten Bräts: 177 mg NaNO<sub>2</sub>/kg=77 mg NO/kg

Bezeichnung	%		Umrötung %	%NO aus zugesetztem Nitrit		
	Myo- fibrillen im Brät	Acto- myosin		NOMB (ausser NOMB)	Brät Myo- fibril- len	Acto- myosin
A) (2,8% NPS)	44	21	53	9	-	-
Gesamt-NO					36	3
Rest-NO					15	4
B) (2,9% NPS+ 0,48% GdL)	48	30	53	9	-	-
Gesamt-NO					36	5
Rest-NO					9	6
C) (3,1% NPS+ 0,05% Na-AS)	53	23	41	6	-	-
Gesamt-NO					5	2
Rest-NO					6	5

Der Anteil des NO, der zur Umrötung benötigt wird, liegt zwischen 6-9% des eingesetzten NO. Die angewandten Verfahren zur Iso-

lierung der Myofibrillen und des Actomyosins sind an sich für Muskelgewebe ausgearbeitet worden; die hier aus den Bräten gewonnenen Fraktionen entsprechen in ihrer Zusammensetzung nur mit gewissen Einschränkungen den üblicherweise erhaltenen Eiweisskörpern. Bedingt durch unvermeidbare Fehler bei der Aufarbeitung können die Angaben über die NO-Gehalte grösseren Schwankungen unterliegen; sie sind daher nur als Richtwerte anzusehen. Beim Ansatz C) mit Na-Ascorbat ist das Gesamt-NO wie auch das Rest-NO niedriger als im Falle A) und B).

Die Differenz der NO-Werte zwischen Gesamt-NO und Rest-NO entspricht dem Anteil an freiem, vorwiegend im Sarkoplasma enthaltenem NO. Bei Verwendung von Nitritpökelsalz allein bzw. auch bei Zusatz von GdL findet man in dieser Fraktion einen wesentlichen Anteil an Nitrit; im Gegensatz dazu wird durch Ascorbat Nitrit in der Sarkoplasma-Fraktion völlig verbraucht. Im Brät des Versuchs C) sowie in den Myofibrillen und dem Actomyosin aller anderen Versuchsansätze wurde stets mehr Rest-NO als Gesamt-NO gefunden. Diese Zunahme kann damit erklärt werden, dass durch die Behandlung mit Aceton Lipoprotein-Komplexe in den Membranen zerstört werden, wodurch dann NO in Freiheit gesetzt wird. Die Werte für das Rest-NO der Myofibrillen und des Actomyosins unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander, den nachstehenden Berechnungen wurden daher die entsprechenden Werte für das Actomyosin zugrunde gelegt.

Zusammenfassend ergibt sich nach 5-tägiger Reifung der Rohwurstbräte folgende Verteilung der ursprünglich eingesetzten Menge an Sickoxid: etwa 55%, bei Zusatz von Na-AS jedoch bis zu 88% werden zu Verbindungen umgesetzt, die mit Griess'schem Reagenz keine positive Reaktion mehr geben; ca. 6 - 9% liegen in Form von

Nitrosomyoglobin vor; in den Sarkoplasma-Fractionen sind in der genannten Reihenfolge 21%, 27% bzw. 0% NO enthalten, und nur 4 - 8% verbleiben verhältnismässig fest an Actomyosin gebunden.

### Literatur

- 1) V.M.GRADDOCK und P.N.MAGEE; Reaction of the Carcinogen Dimethylnitrosamine with Nucleic Acids in vivo. Biochem.j. 89, 32 (1963).
- 2) F.ENDER und L.CEH; Occurrence and Determination of Nitrosamines in Foodstuffs for Human and Animal Nutrition. Alkylierend wirkende Verbindungen. 2. Konferenz über aktuelle Probleme der Tabakforschung. Freiburg. Wissenschaftliche Forschungsstelle im Verband der Cigarettenindustrie, 1968.
- 3) G.GANTNER; Zur Bestimmung der Farbe von gepökeltem Fleisch und Fleischerzeugnissen. Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. 111, 277 (1960)
- 4) R.GRAU und A.MIRNA; Über die Bestimmung von Nitrit, Nitrat und Kochsalz in Fleischwaren und Laken; Z. analyt. Chem. 158, 182 (1957)
- 5) R.M.HERRIOTT; Reactions of Native Proteins with Chemical Reagents Advances in Protein Chemistry 3, 170 (1947)
- 6) K.HOFMANN; Untersuchungen des Einflusses der thermischen Behandlung von Fleisch auf die funktionellen Gruppen der strukturellen Muskelproteine. Diss. Giessen, 1964, S.105
- 7) E.KRIEK und EMMELOT; Alkylation and Breakdown of Nucleic Acids by Diazoalkanes. Alkylierend wirkende Verbindungen. 1. Konferenz über N-Nitroso-Verbindungen und Lactone. Hamburg. Wissenschaftliche Forschungsstelle im Verband der Cigarettenindustrie, 1964.
- 8) K.LANDSTEINER; The Specificity of Serological Reactions. Cambridge, Mass. Harvard Press, 1946; zit. in Hoppe-Seyler-Thierfelder; Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse,

10. Aufl., Springer Verlag, 1960, 4. Bd 1. Teil, S.131

9) P.N.MAGEE und T.HULTIN; Toxic Liver Injury and Carcinogenesis Methylation of Proteins of Rat-Liver Slices by Dimethylnitrosamine in vitro. Biochem. J. 83, 106 (1962)

10) A.MIRNA und K.HOFMANN; Über den Verbleib von Nitrit in Fleischwaren. I. Umsetzung von Nitrit mit Sulfhydryl-Verbindungen. Fleischwirtschaft 49, 1361 (1969)

11) K.MÖHLER und O.L.MAYRHOFER; Nachweis und Bestimmung von Nitrosaminen in Lebensmitteln. Z. Lebensmittel-Unters.u.-Forsch. 135, 313 (1968)

12) G.NEURATH; Zur Frage des Vorkommens von N-Nitroso-Verbindungen im Tabakrauch. Experientia 23, 400 (1967)

13) N.N; Methods of Analysis, A.O.A.C., 10<sup>th</sup> Ed., 1965, S.347

14) B.SAVILLE; A Scheme for the Colorimetric Determination of Microgram Amounts of Thiols. Analyst 83, 67 (1958)

15) A.SZENT-GYÖRGYI; Chemistry of Muscular Contraction; 2nd Ed., New York: 1951, zit. in Hoopé-Seyler-Thierfelder; Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Aufl., Springer Verlag 1960, 4. Bd. 1. Teil, S.532.