

Reaktionen von Nitrit mit Blut und Muskelfleisch

Kl. Möhler, M. Baumann und H. Ebert

Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie,  
München, Analytische Abteilung

Reaktionen mit Blut

Versetzt man Citratblut vom Rind mit Natriumnitrit, so tritt eine rasche Oxydation des Hämoglobins (Hb) zu Methämoglobin ein und gleichzeitig entsteht Nitrat. Durch Erwärmen wird die Reaktion beschleunigt und erreicht schließlich einen Endpunkt, von dem ab auch bei längerem Erhitzen kein Nitrat mehr gebildet wird. Wie Tabelle 1 zeigt, schwankt das Verhältnis von Nitratbildung zum Gesamtpigment (Mol Nitrat : Mol Hb·Fe Äquivalent) etwa zwischen 0,4 - 1,2 : 1 und nimmt mit der Zeit, die zwischen Schlachtung und Versuch liegt, zu (1).

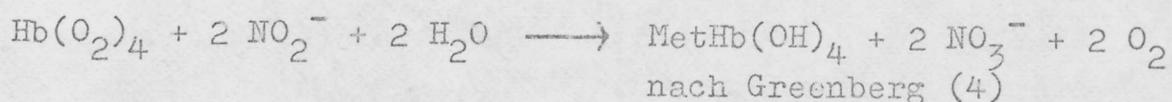
Tabelle 1: Zusammenhang zwischen Lagerzeit und Nitratbildung in Blut. Versuchsbedingungen: Zusatz von 150 mg NaNO<sub>2</sub> zu 100 g Blut, pH 6 mit Citronensäure eingestellt, Erhitzung 90 min bei 75°C.

Zeit zwischen Schlachtung u. Versuch in Tagen	Probenzahl	Bildung von x Mol Nitrat pro Mol Hämoglobin-Eisenäquivalent	
		Grenzwerte	Mittel
0	5	0,56 - 0,81	0,67
1	10	0,43 - 0,99	0,71
2	11	0,48 - 1,05	0,77
6	4	1,00 - 1,16	1,07

Die Erhöhung des Nitratwertes hängt vermutlich mit dem Sauerstoffgehalt des Blutes zusammen, der nach Bunn u. Mitarbeitern (2) während der Lagerung zunimmt. In unseren Modellversuchen

wurde der Nitratwert nach Sättigung des Blutes mit Sauerstoff um etwa 50 % vermehrt. Die Nitratmenge ist von der Höhe der Nitritzufuhr nur wenig abhängig und bleibt stets innerhalb der Grenzwerte von Tabelle 1.

Die Reaktion kann durch die folgenden beiden Formeln umgrenzt werden:



Häufig, jedoch nicht immer, wird bereits in der Kälte etwas Stickoxidhämoglobin - (NO)Hb - gebildet. Ein Zusatz von Ascorbinsäure fördert diese Entwicklung. Die Hauptreaktion tritt beim Erwärmen auf 75°C innerhalb von 30 min ein und fällt etwa mit der Koagulation des Blutes zusammen. Mit einem Zusatz von 150 mg NaNO<sub>2</sub> zu jeweils 100 g Blut von 40 Tieren ergab sich eine Umrötung (= prozentuale Bildung von Stickoxidhämoglobin, bezogen auf Gesamtpigment des nitritfrei erhitzten Blutes, Bestimmung nach Hornsey (5) ) zwischen 20 und 50 %, eine Häufung der Werte ist zwischen 27 - 32 % zu erkennen. Der Zusatz von 150 mg NaNO<sub>2</sub>/100 g Blut war in unseren Versuchen optimal, Erhöhung des Nitritzusatzes auf 600 mg / 100 g Blut führte zu einer Verminderung des NO-Hb. In Verbindung damit trat eine Zerstörung des Blutfarbstoffes ein, die an einer Grünfärbung unter Bildung von Verdiglobin zu erkennen war.

Einen bemerkenswerten Einfluß hat die Verdünnung von Blut mit Wasser oder physiologischer NaCl-Lösung. Wird Blut mit mehr als dem gleichen Teil Wasser vermischt und nach Zusatz von Nitrit der üblichen Wärmebehandlung unterworfen, so nimmt mit zunehmender Verdünnung die Umrötung ab und erreicht z.B. beim Verhältnis 10 Teile Blut + 90 Teile Wasser nur mehr 30 % des Wertes im unverdünnten Blut. Die Nitratbildung wird nicht beeinflusst.

C3

Der Verbrauch an Nitrit, der nicht zur Nitratbildung dient, nimmt mit steigendem Nitritzusatz zu. Er liegt bei Zugaben von 100 - 300 mg  $\text{NaNO}_2$  bei 20 - 40 % des Einsatzes. Eine Abnahme ist mit der Dauer der Lagerung zwischen Schlachtung und Versuch angedeutet. Unter günstigsten Bedingungen konnte mit Zusatz von Ascorbinsäure (siehe nächster Abschnitt) mit 2 Mol Nitrit pro Mol Hb-Fe-Äquivalent eine 100%ige Bildung von (NO)Hb erzielt werden, wobei 1 Mol als Nitrat und 1 Mol als (NO)Hb in Erscheinung traten.

Zeit und Temperatur wurden konstant gehalten. Der Einfluß einer Änderung des pH-Wertes ist gering, es gibt aber offenbar ein Optimum bei pH 6, weshalb dieser Wert bei allen Versuchen durch Zusatz von Citronensäure eingestellt wurde.

Überraschend stark war die Wirkung von zugesetztem Reduktionsmitteln. Ascorbinsäure (400 mg/100 g Blut) führte in allen Fällen, auch bei den mit Wasser verdünnten Proben, zu einer 100%igen Umwandlung des Hb in (NO)Hb. Gleichzeitig wurde die Zerstörung von Hb bei höheren Nitritzusätzen verhindert. Ähnlich wirkten Zusätze von SH-haltigen Verbindungen wie Cystein und Thioglykolsäure und in geringerem Umfang Thioacetamid sowie  $\text{H}_2\text{S}$ . Auch proteingebundene SH-Gruppen können wirksam werden. Ein Zusatz von 1 Teil rohem Muskelfleisch zu 1 Teil Blut erhöhte die Bildung von (NO)Hb auf etwa das Zweifache.

Blut spaltet beim Erhitzen Schwefelwasserstoff ab, durch Zusatz von Nitrit wird diese Reaktion unterbunden,  $\text{H}_2\text{S}$  ist nicht mehr nachweisbar.

Die Affinität von Hb zu NO ist so groß, daß es selbst Stickoxidmyoglobin zerstören kann. Mischt man 100 Teile erhitztes, mit Nitrit gepökelttes Fleisch mit 30 Teilen rohem Blut, so kann man durch Acetonextraktion kein (NO)Mb mehr nachweisen. Acetonlösungen von Pökelfarbstoff werden durch Zugabe von Blut entfärbt. Daß es sich hierbei um keine Adsorptionserscheinungen handeln kann, ergibt sich aus der Beobachtung, daß Blut, das mit Nitrit oxydiert und durch Dialyse von  $\text{NaNO}_2$  befreit wurde, die genannten Reaktionen nicht gibt.

Reaktionen mit Muskelfleisch

Die Bildung von Nitrat bei Zusatz von Nitrit zu Muskelfleisch im Verhältnis 1 Mol Myoglobin (Mb) : 1 Mol Nitrat wurde bereits früher beschrieben (6). Im Gegensatz zu Blut tritt bei Muskelfleisch in der Kälte (4 - 20°C) in den ersten Stunden nach Zusatz von Nitrit kein Stickoxydmyoglobin - (NO)Mb - auf. Bei den durch Hitze katalysierten weiteren Reaktionen, die zu (NO)Mb führen, werden bei optimaler Nitritdosierung (15 mg NaNO<sub>2</sub>/100 g Rindfleisch) etwa 2 Mol Nitrit pro Mol Mb verbraucht. Mit steigender Nitritzufuhr nimmt der Nitritverbrauch zu, eine Verminderung der Umrötung oder Zerstörung von Mb ist bei der vierfachen Versuchsdosis (60 mg NaNO<sub>2</sub>/100 g Fleisch) nicht zu beobachten. Die Umrötung von Rindfleisch erreichte in den Modellversuchen im Mittel 64 %. In Suspensionen von 10 Teilen Fleisch mit 90 Teilen Wasser trat zwar Nitrat auf, nicht dagegen aber (NO)Mb. Die Förderung der Umrötung durch Ascorbinsäure ist bekannt, sie führte jedoch nie zu einer 100%igen Bildung von (NO)Mb. Die Wirkung von SH-Verbindungen ist unterschiedlich. Thioglykolsäure reagiert wie Ascorbinsäure, mit Cystein ist dagegen in der Regel keine Förderung der Umrötung zu erkennen, vor allem wenn der pH-Wert nicht verändert wird. Eine Veränderung in der Abspaltung von H<sub>2</sub>S durch Zusatz von Nitrit war bisher analytisch nicht erfaßbar. Dem niedrigeren Pigmentgehalt entsprechend konnte erst mit 3 Teilen rohem Fleisch auf 1 Teil gepökelttes, erhitztes Fleisch eine Zerstörung von (NO)Mb gefunden werden.

Es gelang nachzuweisen, daß bei der hitzekatalysierten Reaktion von Nitrit mit Muskelfleisch Distickstoffoxid (N<sub>2</sub>O) auftritt (8). Hierzu wurden die möglichst gasdicht erhitzten Proben leicht gefroren und dann in einem verschlossenen Mixgerät unter Zusatz von heißem Wasser zerkleinert. Durch einen Stickstoffstrom wurden die Gase in eine Vorlage geleitet, in der unter Kühlung auf -40°C das N<sub>2</sub>O spezifisch an Silicagel adsor-

biert wurde. Die Desorption erfolgte durch Erhitzen der Vorlage auf  $150^{\circ}\text{C}$  unter Durchleiten von Helium, im austretendem Gasgemisch wurde  $\text{N}_2\text{O}$  gaschromatographisch mit dem Wärmeleitfähigkeitsdetektor nach Ausschluß störender Reaktionsprodukte wie  $\text{NO}_2$  und  $\text{CO}_2$  bestimmt. Die Versuchsanordnung erlaubte die Bestimmung von  $\text{N}_2\text{O}$  erst bei Zusätzen von  $15 \text{ mg NaNO}_2/100 \text{ g}$  Fleisch und mehr, im Bereich von  $15 - 60 \text{ mg NaNO}_2$  war die  $\text{N}_2\text{O}$ -Menge proportional dem Nitritzusatz und entsprach etwa  $20 \%$  des bisher unbekanntes Nitritverbrauches. In gleichen Konzentrationsbereichen war dieser Nitritverbrauch proportional dem Zusatz.

### Diskussion

Die durch Hitze katalysierten Reaktionen des Nitrits mit Blut oder Muskelfleisch sind besser überschaubar als die lange dauernden Reaktionen in der Kälte, da sie von Enzymen - sei es aus dem Substrat oder aus Mikroorganismen - nicht beeinflußt werden. Auch für die erste Reaktionsstufe, die Oxydation von Hb oder Mb unter gleichzeitiger Bildung von Nitrat ist die Mitwirkung von Enzymen nicht erforderlich. Während bei Rindfleisch pro Mol Mb ein Mol Nitrat entsteht, kann die Quote bei Rinderblut zwischen  $0,5 - 1,2$  schwanken, wobei der Umfang der Sauerstoffbeladung eine wesentliche Rolle spielen dürfte. Bei Blut ist die eigene Reduktionskapazität zu gering um eine ausreichende Umwandlung von Hb in  $(\text{NO})\text{Hb}$  herbeizuführen, Reduktionsmittel wie Ascorbinsäure oder SH-Verbindungen können dieses Defizit ausgleichen. Die Unterbindung der  $\text{H}_2\text{S}$ -Bildung durch Nitrit beim Erhitzen von Blut und die Veränderungen der Reaktionen beim Verdünnen von Blut oder Fleisch mit Wasser ergänzen die bisherigen Befunde und Ansichten über die Natur der Reduktionsmittel bei der Pökellung. Demnach dürften bei der hitzekatalysierten Bildung von  $(\text{NO})\text{Hb}$  oder  $(\text{NO})\text{Mb}$  nur die SH-Gruppen der Proteine - vielleicht auch der daraus abspaltbare Schwefelwasserstoff - die Reduktion von Nitrit zu NO und von  $\text{Fe}^{\text{III}}$  zu  $\text{Fe}^{\text{II}}$  bewirken. Es bestehen keine Hinderungsgründe gegen die An-

nahme, daß auch in der Kälte die gleichen Reaktionen maßgebend sind, wenn man von der Tätigkeit von Mikroorganismen absieht.

Mit dem Nachweis und der Bestimmung von Distickoxid gelang ein wesentlicher Schritt zur Klärung der Frage, welche Stoffe auf Grund der Nebenreaktionen aus Nitrit entstehen. Es erscheint ziemlich sicher, daß durch Verbesserung der Methodik die analytische Ausbeute an  $N_2O$  erhöht werden kann und daß mit empfindlicheren Meßgeräten auch unter Bedingungen der Praxis der  $N_2O$ -Nachweis möglich wird. NO kann natürlich auch zu  $NO_2$  oxydiert werden und entweicht als solches oder führt zu einer weiteren sekundären Bildung von Nitrat. Da durch Modellreaktionen das Auftreten anderer Reaktionsprodukte wie Hydroxylamin und Ammoniak ausgeschlossen werden konnte, wird die Hypothese aufgestellt, daß - außer NO und  $NO_2$  -  $N_2O$  das überwiegende, wenn nicht alleinige Folgeprodukt der Nebenreaktionen des Nitrits darstellt.

Literatur:

- 1) Möhler, Kl. u. M.Baumann: erscheint in Z.Lebensmittel-Unters. u.-Forsch.
- 2) Bunn, H.F. u. Mitarb.: J.Clin.Invest. 48, 311 (1969).
- 3) Kakizaki, T. u. Mitarb.: Ind.Health 2, 124, 139 (1964).
- 4) Greenberg, L.A. u. Mitarb.: J.Biol.Chem. 151, 665 (1943).
- 5) Hornsey, H.C.: J.Sci.Food Agric. 8, 534 (1956).
- 6) Möhler, Kl.: Z.Lebensmittel-Unters.u.-Forsch. 142, 169 (1970).
- 7) Möhler, Kl.: Habil.-Schrift, Technische Universität München 1967, erscheint in Z.Lebensmittel-Unters.u.-Forsch.
- 8) Möhler, Kl. u. H.Ebert: erscheint in Z.Lebensmittel-Unters. u. -Forsch.