

Bildung von IQ-Verbindungen in Fleisch und Fleischprodukten

E. Schuermann und K. Eichner

Institut für Lebensmittelchemie der Westfälischen Wilhelms-Universität
Münster, Münster

Zusammenfassung: Bei der Herstellung von Fleischprodukten können sich aus den darin enthaltenen reduzierenden Zuckern, Aminosäuren und Kreatin/Kreatinin im Rahmen einer Maillard-Reaktion Imidazoquinoline und Imidazochinoxaline („IQ-Verbindungen“) bilden; diese haben sich als mutagen erwiesen.

Die aus wasserarmen Modellsystemen und Fleischextrakt mittels Flüssig-Flüssig-Verteilung isolierten IQ-Verbindungen wurden an einer Kationenaustauschersäule vorfraktioniert und anschließend durch HPLC an einer RP-Phase getrennt. Die Identifizierung der vorher acetylierten Verbindungen erfolgte mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie aufgrund der charakteristischen Massenzahlen ihrer Fragmentionen.

Bereits beim Erhitzen der Modellsysteme auf 100 °C setzt die Bildung von IQ-Verbindungen ein und nimmt bei weiterer Temperaturerhöhung stark zu. Auch in käuflichem Fleischextrakt können IQ-Verbindungen in unterschiedlichen Mengen nachgewiesen werden.

Summary: During meat processing mutagenic imidazoquinolines and imidazochinoxalines (“IQ-compounds”) may be formed by Maillard reaction of reducing sugars, amino acids, and creatine/creatinine.

IQ-compounds isolated from low-moisture model systems and meat extract by liquid-liquid-distribution were fractionated on a cation exchanger and separated on an RP phase. After acetylation the separated compounds were identified by gas chromatography/mass spectrometry based on their characteristic mass fragment ions.

During heating the model systems at 100 °C the formation of IQ-compounds begins and greatly increases by further raising the temperature. In different amounts IQ-compounds could also be detected in commercially available meat extracts.

Schlüsselwörter: Analyse, IQ-Verbindungen, Erhitzen, Fleischextrakt, Maillard-Reaktion, Mutagenität

Key words: analysis, IQ-compounds; heating; meat extract; Maillard reaction; mutagens

1 Einleitung

Die bisher in Lebensmitteln gefundenen mutagenen Substanzen lassen sich in drei Gruppen einteilen (20):

- natürlich vorkommende,

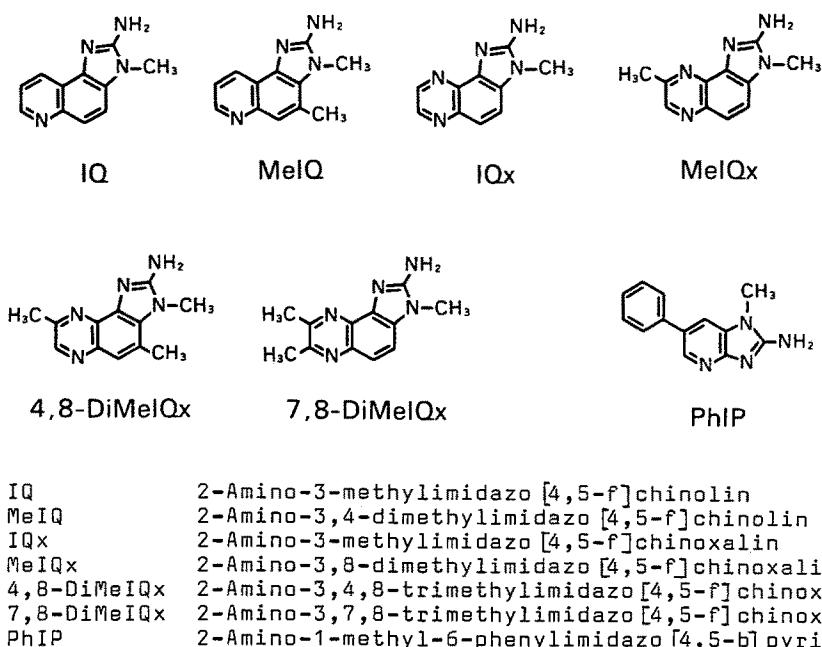


Abb. 1. Strukturformeln von heterozyklischen Aminen aus erhitzen Lebensmitteln.

- aus Kontaminationen von Lebensmitteln und Futtermitteln stammende sowie
 - bei der Lebensmittelzubereitung (-verarbeitung) sich bildende Mutagene (26).

Hier sollen nur Substanzen aus der dritten Gruppe näher besprochen werden, und zwar durch Erhitzung von Fleisch und Fleischerzeugnissen induzierte Mutagene.

Verschiedene Autoren (2, 7, 8, 12, 22, 24) konnten aus Fleischextrakt und gebratenem Rindfleisch verschiedene Imidazochinoline und -chinoxaline (IQ-Verbindungen, s. Abb. 1), insbesondere IQ, MeIQx und 4,8-DiMeIQx, isolieren und identifizieren. In gegrilltem Rindfleisch konnte auch PhIP nachgewiesen werden.

Die in Abbildung 1 aufgeführten, beim Erhitzen von Fleisch gebildeten Verbindungen haben sich im Ames-Test als mutagen erwiesen (21).

Wie Modelluntersuchungen ergeben haben, entstehen diese Mutagene bereits bei relativ niedrigen Temperaturen durch die Maillard-Reaktion von Aminosäuren, Glucose oder Fructose und Kreatin/Kreatinin (4, 5, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 21, 29). Zur Bildung von IQ-Verbindungen kann man annehmen, daß im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildete methylsubstituierte Pyridine und Pyrazine durch Kondensation mit jeweils einem durch Strecker-Abbau von Aminosäuren gebildeten Aldehyd und Kreatinin reagieren, wie Abbildung 2 in allgemeiner, schematischer Form zeigt.

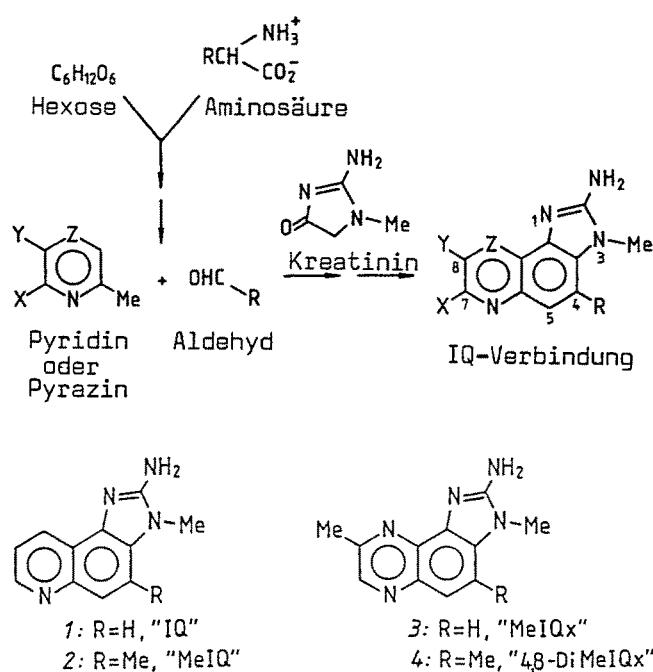


Abb. 2. Reaktionsschema für die Bildung von IQ-Verbindungen (R, X und Y = H oder Me; Z = CH oder N).

Einfluß auf die Bildung der in Abbildung 1 dargestellten Mutagene haben neben der Temperatur auch die Konzentrationen an Zucker und Kreatinin (16).

2 Isolierung, Trennung und chemisch-analytischer Nachweis von IQ-Verbindungen

Für die Isolierung der IQ-Verbindungen aus Modellsystemen und Lebensmitteln wird meist die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan angewandt (1).

Bei neueren Untersuchungen wird vielfach mit kovalent gebundenen Trisulfo-Kupfer-phthalocyanin-Resten versehene Baumwolle (3, 8) als selektives Extraktionsmittel („Blue Cotton“) verwendet.

Die Reinigung der Extrakte erfolgt in der Regel über Säulenchromatographie. Zur Anwendung kommen die Kationenaustauscherchromatographie (17), die CMC-Säulenchromatographie (3), die XAD-2-Säulenchromatographie (14), die Gelchromatographie (14) sowie eine Behandlung mit C18-RP-Kartuschen (17). Weiterhin wurde die Reinigung und Anreicherung durch Säulenchromatographie mit monoklonalen Antikörpern beschrieben (25).

Die Trennung und die quantitative Bestimmung von IQ-Verbindungen in erhitzten Lebensmitteln kann durch HPLC (6), durch HPLC-MS-Kopplung (28) sowie mittels GC-MS (13, 19) erfolgen.

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen über die Bedingungen für die Bildung von IQ-Verbindungen in bestimmten Lebensmitteln wurden wasserarme Modellsysteme mit Fructose/Glucose, Glycin und Kreatinin als Reaktanden und mikrokristalliner Cellulose (Avicel) als Trägermaterial sowie Fleischextrakt untersucht.

Für die Isolierung von IQ-Verbindungen wurden die in Wasser aufgenommenen Methanolextrakte mit Methylenchlorid zuerst im Sauren (pH 2), dann im Alkalischen (pH 12) ausgeschüttelt. Der alkalische Methylenchlorid-Extrakt wurde nach dem Eindampfen mit Methanol aufgenommen und durch HPLC an einer Sulfopropyl-Kationenaustauschersäule mit Ammoniumacetat (NH_4Ac) pH 4,5/Acetonitril (CH_3CN) als Fließmittel fraktioniert.

Abbildung 3 zeigt die Trennung einer Standardmischung von IQ-Verbindungen. Die Detektion erfolgte bei der im Bereich der UV-Absorptionsmaxima der interessierenden IQ-Verbindungen liegenden Wellenlänge von 265 nm.

Die auf die beschriebene Weise vorfraktionierten, aus Modellsystemen und Fleischextrakt isolierten und im entsprechenden Chromatogramm-Ausschnitt (vgl. Abb. 3) erscheinenden IQ-Verbindungen wurden anschließend mittels HPLC an einer RP-select-B-Phase (Merck) weiter aufgetrennt und quantifiziert.

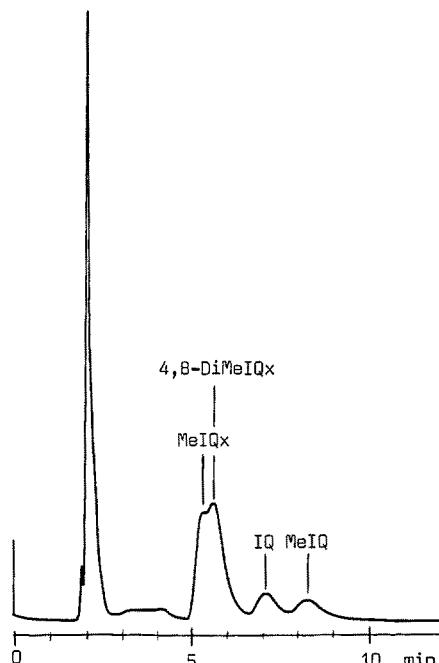


Abb. 3. HPLC-Chromatogramm von IQ-Verbindungen (Reinsubstanzen) – Sulfo-propyl-Si 100 (5 μm), 125 \times 4,6 mm. Lsg. A: 0,15 m NH_4Ac , pH 4,5 – Lsg. B: CH_3CN (7 Teile A + 3 Teile B).

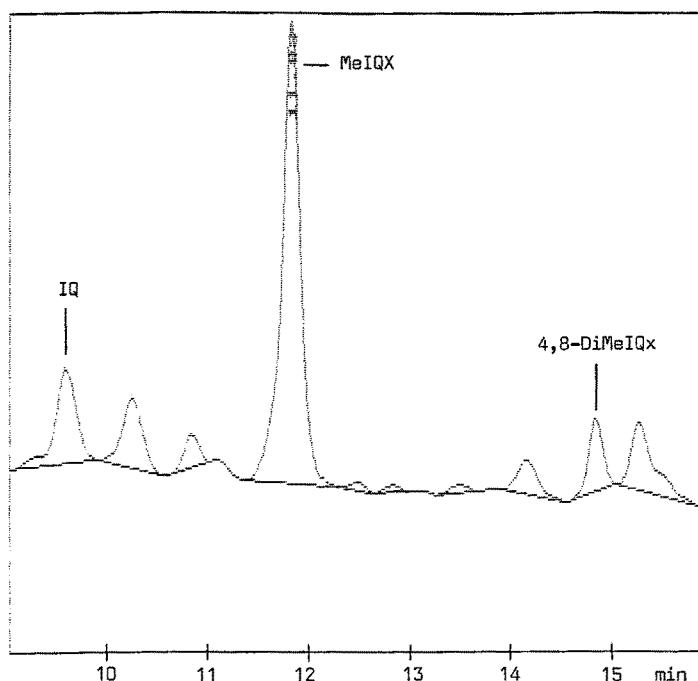


Abb. 4. HPLC-Trennung der mittels einer Sulfopropyl-Si-100-Säule vorfraktionierten IQ-Verbindungen (vgl. Abb. 3) aus Fleischedtrakt (Chromatogramm-Ausschnitt). LiChrospher 60 RP-select B (Merck, 5 μ m), 250 \times 4 mm. Lsg. A: 0.01 m Triethylamin, mit Phosphorsäure auf pH 3,3 eingestellt – Lsg. B: CH_3CN -Gradient (Teile B + Teile A): Start: 5 + 95; 20 min: 25 + 75; 25 min: 45 + 55; 27–40 min: 5 + 95.

In Abbildung 4 ist der die gesuchten IQ-Verbindungen enthaltende Ausschnitt des HPLC-Chromatogramms dargestellt. Die Zuordnung der Peaks aufgrund der Retentionszeiten erfolgte durch Co-Chromatographie mit entsprechenden Vergleichssubstanzen, wobei auch die chromatographischen Bedingungen verändert wurden.

Für die Identifizierung der durch HPLC getrennten IQ-Verbindungen wurde die Kapillargaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (ION-TRAP-Detektor) eingesetzt. Zunächst wurden zu Vergleichszwecken die Massenspektren der entsprechenden, vorher mit Essigsäure-anhydrid/Pyridin acetylierten Reinsubstanzen aufgenommen. In Abbildung 5 ist beispielhaft das Massenspektrum von acetyliertem MeIQx dargestellt (Molmasse = 255).

Nachfolgend sind die für die Identifizierung geeigneten charakteristischen Massenzahlen der mittels Elektronenstoßionisation (EI) erhaltenen Fragmentionen der acetylierten IQ-Verbindungen (geordnet nach abnehmenden Intensitäten) aufgeführt.

IQ: 198/225/240

MeIQx: 240/255/213

4,8-DiMeIQx: 269/254

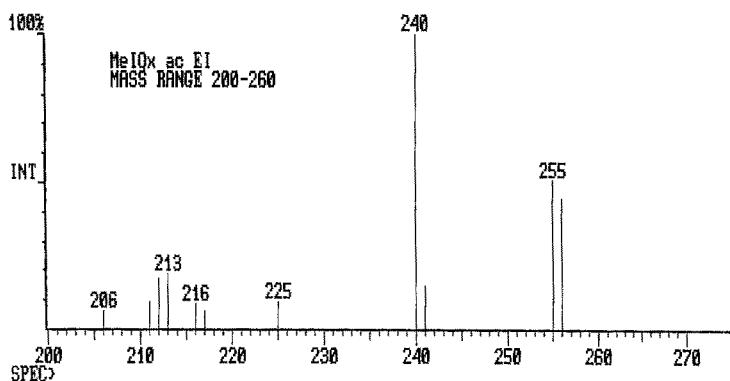


Abb. 5. Massenspektrum von acetyliertem MeIQx (Elektronenstoßionisation).

3 Ergebnisse und Diskussion

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden zunächst die Bedingungen für die Bildung von IQ-Verbindungen in besser überschaubaren Modellsystemen mit Fructose/Glucose, Glycin und Kreatinin (Molverhältnis 0,5:1:1) auf mikrokristalliner Cellulose (Avicel) als Trägermaterial (0,49 g Avicel/mmol Glycin) bei einer (die Maillard-Reaktion fördernden) erniedrigten Wasseraktivität (a_w -Wert) von 0,75 studiert. Dieser a_w -Wert würde sich in Fleischextrakt nach Kochsalzzusatz einstellen. Die Wahl der

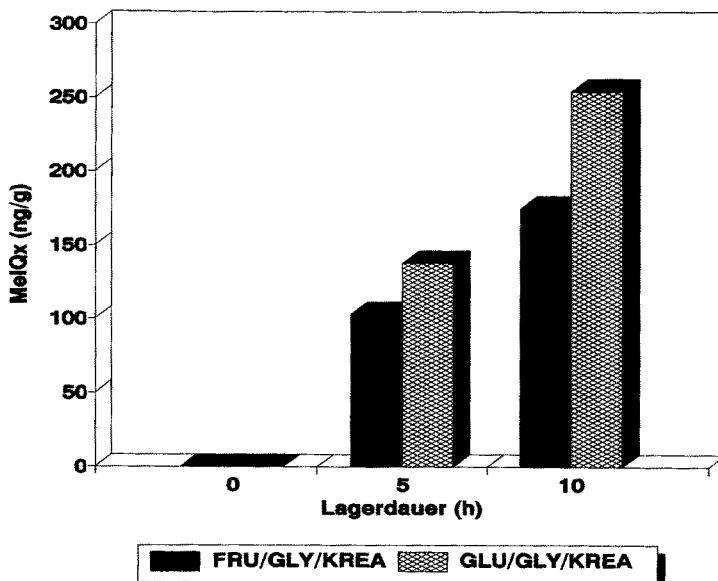


Abb. 6. Bildung von MeIQx in einem Modellsystem mit Fructose/Glucose, Glycin und Kreatinin (Molverhältnis 0,5:1:1) auf Avicel bei 100 °C und einem a_w -Wert von 0,75.

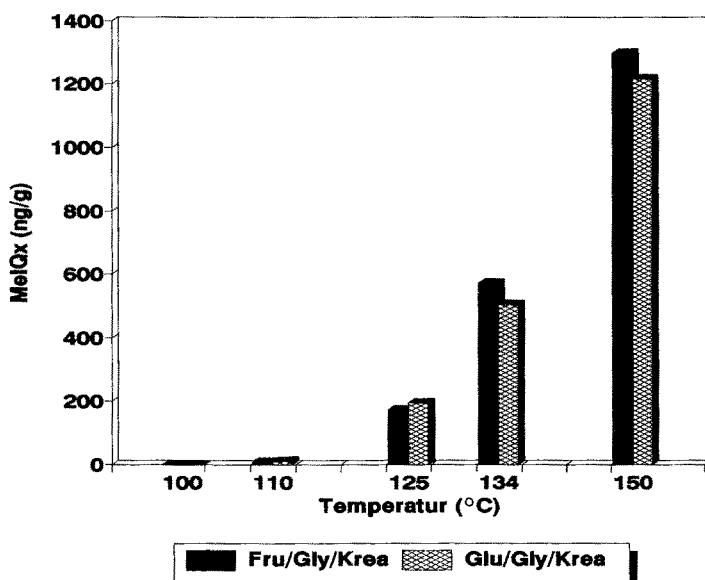


Abb. 7. Bildung von MeIQx in einem Modellsystem mit Fructose/Glucose, Glycin und Kreatinin (Molverhältnis 0,5:1:1) auf Avicel in Abhängigkeit von der Temperatur (a_w -Wert: 0,75; Reaktionszeit: 1 Stunde).

Erhitzungstemperaturen erfolgte in Anlehnung an die industrielle Verfahrensweise, wo Fleischextrakt mit einem Wassergehalt von im Mittel 22 % nach dem Vermischen mit Salz – zuletzt im Vollvakuum – bei Temperaturen um 100 °C auf einen Wassergehalt von 2–3 % heruntergetrocknet wird. Aus Abbildung 6 wird deutlich, daß in dem beschriebenen Modellsystem die Bildung von MeIQx als Hauptprodukt unter den gebildeten IQ-Verbindungen bereits bei 100 °C nach längerer Erhitzung einsetzt, während aus Abbildung 7 hervorgeht, daß erst ab einer Temperatur von 125 °C eine steile Zunahme von MeIQx erfolgt.

Aus den beschriebenen Modellversuchen ergibt sich, daß bereits bei den relativ niedrigen Temperaturen, wie sie bei der Zubereitung von Fleisch und der industriellen Herstellung von Fleischextrakt angewandt werden, IQ-Verbindungen gebildet werden können. Im Vergleich zu den in den Modellsystemen gebildeten Mengen an MeIQx sind die tatsächlich in Lebensmitteln nachgewiesenen Mengen dieser Verbindung wesentlich geringer. Wie eigene Untersuchungen und neuere Untersuchungen anderer Autoren (6, 25) ergeben haben, liegen die in Fleischextrakt nachgewiesenen Mengen an MeIQx im Bereich zwischen etwa 10 und 30 ng/g, während die übrigen IQ-Verbindungen in der Regel weit darunter liegen (vgl. Abb. 4).

Da eine endgültige Risikoabschätzung der Aufnahme von IQ-Verbindungen mit der Nahrung derzeit noch nicht möglich ist (23), müssen die weiteren Bemühungen dahin gehen, die Temperatur vor allem im Bereich der für die Maillard-Reaktion günstigen Wassergehalte abzusenken, was durch die Anwendung eines ausreichenden Vakuums bei der Durchfüh-

rung der Konzentrierungs- und Trocknungsverfahren sowie Trocknung in dünner Schicht möglich sein wird.

Eine Unterdrückung der Bildung von IQ-Verbindungen ist durch einen Zusatz von Antioxidantien, Soja-Protein, Prolin, Tryptophan und anderen Indolderivaten möglich, wie neuere Untersuchungen von J. H. Weisburger und R. C. Jones ergeben haben (27).

Die Untersuchungen wurden im Rahmen der industriellen Gemeinschaftsforschung aus Mitteln des Bundesministers für Wirtschaft gefördert. Hierfür sei an dieser Stelle verbindlich gedankt.

Literatur

1. Commoner B, Vithayathil AJ, Dolara P, Nair S, Madyasta P, Cuca GC (1978) *Science* 201:913–916
2. Felton JS, Knize MG, Wood C, Wuebels BJ, Healy SK, Stuermer DH, Bjeldanes LF, Kimble BJ, Hatch FT (1984) *Carcinogenesis* 5:95–102
3. Grivas S, Nyhammar T (1985) *Mutat Res* 142:5–8
4. Grivas S, Nyhammar T, Olsson K, Jägerstad M (1985) *Mutat Res* 151:177–183
5. Grivas S, Nyhammar T, Olsson K, Jägerstad M (1986) *Food Chem* 20:127–136
6. Gross GA, Philippoussian G, Aeschbacher HU (1989) *Carcinogenesis* 10:1175–1182
7. Hargraves WA, Pariza MW (1983) *Cancer Res* 43:1467–1472
8. Hayatsu H, Matsui Y, Ohara Y, Oka T, Hayatsu T (1983) *Gann* 74:472–482
9. Jägerstad M, Laser-Reuterswärd A, Olsson R, Grivas S, Nyhammar T, Olsson K, Dahlqvist A (1983) *Food Chem* 12:255–264
10. Jägerstad M, Olsson K, Grivas S, Negishi C, Wakabayashi K, Tsuda M, Sato S, Sugimura T (1984) *Mutat Res* 126:239–244
11. Jägerstad M, Grivas S (1985) *Mutat Res* 144:131–136
12. Kasai H, Yamaizumi Z, Shiomi T, Yokoyama S, Miyazawa T, Wakabayashi K, Nagao M, Sugimura T, Nishimura S (1981) *Chem Letters* 1981:485–488
13. Murray S, Gooderham NJ, Boobis AR, Davies DS (1988) *Carcinogenesis* 9:321–325
14. Negishi C, Wakabayashi K, Tsuda M, Sato S, Sugimura T, Saito H, Maeda M, Jägerstad M (1984) *Mutat Res* 140:55–59
15. Negishi C, Wakabayashi K, Yamaizumi J, Saito H, Sato S, Sugimura T, Jägerstad M (1985) *Mutat Res* 147:267–268
16. Nes IF (1986) *Mutat Res* 175:145–148
17. Nyhammar T, Grivas S, Olsson K, Jägerstad M (1986) In: Fujimaki M, Namiki M, Kato H (eds) *Amino-Carbonyl Reactions in Food and Biological Systems*. Elsevier, pp 323–334
18. Shioya M, Wakabayashi K, Sato S, Nagao M, Sugimura T (1987) *Mutat Res* 191:133–138
19. Sugimura T, Nagao M, Wakabayashi K (1981) *IARC Sci Publ* 40:251–267
20. Sugimura T, Sato S (1983) *Cancer Res (Suppl)* 43:2415s–2421s
21. Sugimura T (1985) *Mutat Res* 150:33–41
22. Sugimura T (1986) *Environmental Health Perspectives* 67:5–10
23. Sugimura T, Takayama S, Ohgaki H, Wakabayashi K, Nagao M (1990) In: Finot PA, Aeschbacher HU, Hurrell RF, Liardon R (eds) *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology*. Birkhäuser, Basel Boston Berlin, pp 323–334
24. Takahashi M, Wakabayashi K, Nagao M, Yamaizumi Z, Sato S, Kinae N, Tomita I, Sugimura T (1985) *Carcinogenesis* 6:1537–1539

25. Turesky RJ, Forster CM, Aeschbacher HU, Würzner HP, Skipper PL, Trudel LJ, Tannenbaum SR (1989) *Carcinogenesis* 10:151–156
26. Uhde WJ, Macholz R (1986) *Die Nahrung* 30:59–73
27. Weisburger JH, Jones RC (1990) In: Finot PA, Aeschbacher HU, Hurrell RF, Liardon R (eds) *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology*. Birkhäuser, Basel Boston Berlin, pp 385–389
28. Yamaizumi Z, Kasai H, Nishimura S (1986) *Mutat Res* 173:1–7

Eingegangen 10. Dezember 1990

Für die Verfasser:

Dr. K. Eichner, Institut für Lebensmittelchemie der Westfälischen Wilhelms-Universität, Piusallee 7, 4400 Münster