

D. Wild

## Verbesserte mikrobiologische Bestimmung heterozyklischer aromatischer Amine in erhitzten Nahrungsmitteln

### Improved microbiological assay of heterocyclic aromatic amines in cooked food

**Zusammenfassung** Beim Erhitzen von Protein, besonders Muskelfleisch und Fleischextrakten, können heterozyklische aromatische Amine (HA) entstehen, die im Tierkanzerogen sind. Daher und aus Gründen der Vorsorge sind sie in der Nahrung unerwünscht. Hier wird über eine verbesserte Methode zum mikrobiologischen Nachweis von HA berichtet; sie basiert auf dem Nachweis der mutagenen Wirkung der HA mit dem Ames-Test und dem neuen *Salmonella typhimurium*-Stamm YG1024 anstelle des Stammes TA98. Dieser neue Stamm verdankt seine hohe Empfindlichkeit seiner hohen Acetyl-

transferase-Aktivität, die eine verstärkte Bildung der gentoxischen Metaboliten der HA zur Folge hat. Die mutagene Wirkung 3 ausgewählter HA ist in YG1024 10–20-fach höher als in TA98. Die Methode eignet sich für die Untersuchung von Nahrungsmitteln auf HA. Die Untersuchung von Frikadellen zeigte große Unterschiede der Mutagenität zwischen Kern und Kruste sowie zwischen selbstgebratenen und fertig gekauften Frikadellen; in beiden ist die mutagene Aktivität in der Kruste lokalisiert.

**Summary** Heating of protein, especially muscle meat and meat extracts, can result in the formation of heterocyclic aromatic amines (HA) which are carcinogenic in animals. They are therefore undesirable in human food. Here, an improved method for the microbiological assay of HA is reported; it makes use of the high mutagenic potency of HA in the Ames test and of the new *Salmonella typhimurium* strain YG1024 instead of strain TA98. The high sensitivity of the new strain is a consequence

of its high acetyltransferase activity which results in a more efficient formation of genotoxic HA metabolites. The mutagenic activity of three selected HA in YG1024 is 10–20 times higher than that in TA98. This method can be used for the analysis of the HA content of food. A study of meat patties revealed significant differences in the mutagenic activity in the center and crust and of home-made and commercial patties; in both, the mutagenic activity was localized in the crust.

**Schlüsselwörter** heterozyklisches aromatisches Amin – Bestimmung – Mutagen – *Salmonella typhimurium* – Fleisch – Frikadelle

**Key words** Heterocyclic aromatic amine – assay – mutagen – *Salmonella typhimurium* – meat patty

**Abkürzungen** IQ = 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin  
MeIQ = 2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]chinolin · MeIQx = 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin

Eingegangen: 24. August 1994  
Akzeptiert: 31. Oktober 1994

PD Dr. D. Wild  
Bundesanstalt für Fleischforschung  
Institut für Mikrobiologie und Toxikologie  
E.-C.-Baumann-Straße 20  
95326 Kulmbach

### Einleitung

In den letzten 15 Jahren wurden zahlreiche heterozyklische aromatische Amine (HA) entdeckt, die beim Erhitzen von Muskelfleisch, Fisch und Fleischextrakt entstehen. Die wichtigsten HA, z.B. IQ, MeIQ, MeIQx, PhIP tragen

die Amino-Gruppe an einem heterozyklischen Imidazochinolin-, Imidazochinoxalin- oder Imidazopyridin-Ring. Für die Bewertung der HA ist entscheidend ihre Fähigkeit, Mutationen, d.h. Veränderungen der Erbsubstanz DNA, bei zahlreichen Organismen und maligne Tumoren bei Mäusen, Ratten und Affen zu erzeugen (5–7,

14, 15). Da HA auch in der normalen menschlichen Nahrung enthalten sind und obwohl die Mengen sehr klein sind, nämlich im ppb-Bereich (ppb = parts per billion,  $\mu\text{g/kg}$ ; (1)), werden sie für Tumorerkrankungen beim Menschen verantwortlich gemacht (17). Auch wenn die kanzerogene Wirkung der HA beim Menschen bisher nicht bewiesen ist, ist man doch aus Vorsicht bestrebt, den HA-Gehalt der Nahrung zu kontrollieren und womöglich zu senken.

Zur chemischen Analytik der HA wird nach der Probenaufbereitung meist eine HPLC-Trennung und spezifische Detektion durch UV-Spektrometrie, Fluoreszenzspektrometrie oder Massenspektrometrie benutzt; auch GC-Methoden sowie eine immunologische Technik wurden berichtet (2–4, 11). Die meisten dieser Techniken stellen hohe Anforderungen an die instrumentelle Ausrüstung. Hier wird eine relativ einfache mikrobiologische Analysenmethode vorgestellt, die die mutagene Wirkung der HA ausnutzt. Grundlage der Methode ist der Ames-Test zum Nachweis mutagener Stoffe mit Teststämmen von *Salmonella typhimurium* (9); dabei wird ein neuer, empfindlicherer Salmonellastamm benutzt.

## Material und Methoden

IQ wurde von Wako Chemicals GmbH (Neuss) bezogen, MeIQ und MeIQx von Toronto Research Chemicals (Downsview, Ontario, Canada). Frikadellen wurden entweder aus handelsüblichem Hackfleisch hergestellt und mit Backfett in einer eisernen Bratpfanne beidseitig gebraten (Endgewicht 80–89 g) oder fertig zubereitet im Metzgerfachgeschäft gekauft (Gewicht 139–153 g).

Aufarbeitung: Die Proben (20–40 g) wurden mit 100 ml Wasser mit einem Omni-Mixer homogenisiert, das Homogenat wurde mit HCl auf pH 2 angesäuert und mit Ammoniumsulfat gesättigt. Nach Filtration wurde das Filtrat mit Ether extrahiert, die wässrige Phase mit konz. Ammoniak alkalisiert (pH ca. 9,5), die alkalische Lösung mit Ether extrahiert, der basische Extrakt wurde am Rotationsverdampfer eingetrocknet. Der Rückstand wurde in 100  $\mu\text{l}$  sterilem Wasser gelöst.

Mutagenitätstest nach Ames (9): Die *S. typhimurium*-Stämme TA98 und YG1024 wurden von B.N. Ames (Berkeley, CA, USA) bzw. T. Nohmi (Tokyo, Japan) erhalten und nach Maron und Ames kultiviert und auf die charakteristischen Merkmale geprüft. Versuchskulturen im Nährmedium „Oxoid Nr. 2“ wurden durch 10stündiges Schütteln im Wasserbad bei 37 ° hergestellt, YG1024 mit einem Zusatz von Ampicillin (25  $\mu\text{g/ml}$ ) und Tetracyclin (6  $\mu\text{g/ml}$ ). Die Behandlung mit Testsubstanzen erfolgte nach der früher beschriebenen Präinkubationstechnik (30 min, 37 °; (18)); S9-Mix (1,33 mg Protein/ml) zur Metabolisierung wurde aus der Leber Aroclor-induzierter Ratten nach Maron und Ames hergestellt (9). Nach 2tägiger Bebrütung der Petriplatten bei 37 ° wurde die Zahl der Revertantenkolonien pro Platte gezählt.

## Ergebnisse

Die Ergebnisse mit den Reinsubstanzen IQ, MeIQ und MeIQx sind in Abb. 1 graphisch dargestellt. Die Konzentrations-Wirkungs-Geraden zeigen für alle 3 HA eine wesentlich größere Steigung, d.h. eine größere mutagene Potenz, im Stamm YG1024 als im Stamm TA98. Für IQ ergibt sich in YG1024 eine mutagene Potenz von 5860 rev/ng, in TA98 von 300 rev/ng; die entsprechenden Werte für MeIQ sind 3940 rev/ng bzw. 366 rev/ng, für MeIQx 1360 rev/ng bzw. 113 rev/ng. Aufgrund der so gezeigten höheren Empfindlichkeit des Stammes YG1024 wurde dieser Stamm auch für die Untersuchung von Frikadellen bzw. ihren Extrakten benutzt, in denen Gemische verschiedener HA vorliegen. Eine Frikadelle, die in der Pfanne bei 175–250 ° (gemessen zwischen Frikadelle und Pfanne) gebraten wurde, 5 min auf jeder Seite, wurde in 3 Teilen aufgearbeitet: ein Stück der ganzen Frikadelle (mit Kruste und Kern) sowie Kruste und Kern getrennt. Die Mutagenität der Extrakte ist in Abb. 2 gezeigt. Im Kern, wo die Temperaturen beim Braten kaum 100 ° erreichen, ist die mutagene Aktivität sehr schwach, 20 rev/g-Äquivalent; wesentlich höhere Aktivität, 296 rev/g-Äquivalent, findet sich in der Kruste, mittlere Aktivität im Gemisch.

In gleicher Weise wurden 3 weitere Frikadellen gebraten und untersucht; die Ergebnisse sind als Säulendiagramme dargestellt; die Säulenhöhe entspricht der Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Geraden (Abb. 3). Bei allen untersuchten Frikadellen ist die Aktivität in der Kruste mindestens 13fach höher als im Inneren, sie liegt im Bereich von 191 bis 296 rev/g-Äquivalent Kruste; im Kern liegen die Werte im Bereich von < 5 (nicht nachweisbar) bis 20 rev/g-Äquivalent Kruste und damit im untersten Meßbereich.

Abb. 4 zeigt einen Vergleich der selbst gebratenen Frikadellen (Nr. 46–49) mit 4 Frikadellen, die als Fertiggericht aus dem Fachgeschäft bezogen wurden (Nr. 50–53). Diese Frikadellen enthalten deutlich weniger mutagene Aktivität in der Kruste, zwischen 30 und 56 rev/g-Äquivalent. Die entsprechenden Werte im Kern waren auch bei diesen im Bereich der Nachweisbarkeitsgrenze. Beide Arten von Frikadellen, die selbstgebratenen wie die gekauften, waren im Rahmen des Küchenüblichen zubereitet, nicht verkohlt; jedoch waren die selbstgebratenen dunkler gebraten.

## Diskussion

Zum Nachweis der HA vermittels ihrer mutagenen Wirkung wurde bisher meist der Ames-Test mit dem Stamm TA98 von *Salmonella typhimurium* benutzt. Auf diese Weise wurden HA nicht nur in gebratenem Fleisch, sondern z.B. auch in Fleischextrakt und Fleischaromen nachgewiesen (8, 10, 12, 13). Der ebenfalls benutzte Stamm

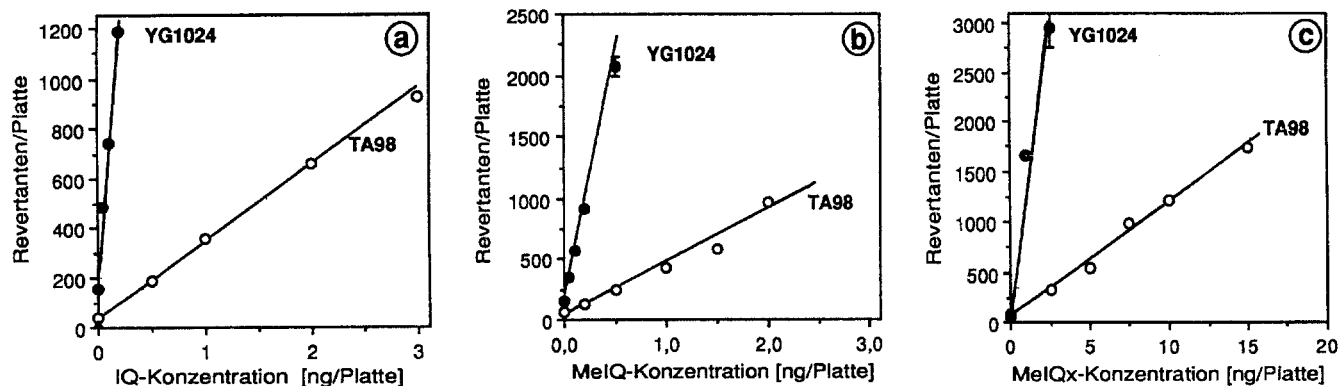


Abb. 1 Mutagene Wirkung von heterozyklischen aromatischen Aminen in den *S. typhimurium*-Stämmen TA98 und YG1024; a: IQ, b: MeIQ, c: MeIQx

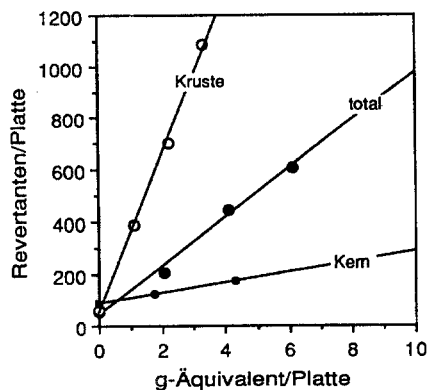


Abb. 2 Mutagene Wirkung basischer Extrakte aus Kern, Kruste und Kern + Kruste einer Frikadelle in *S. typhimurium* YG1024

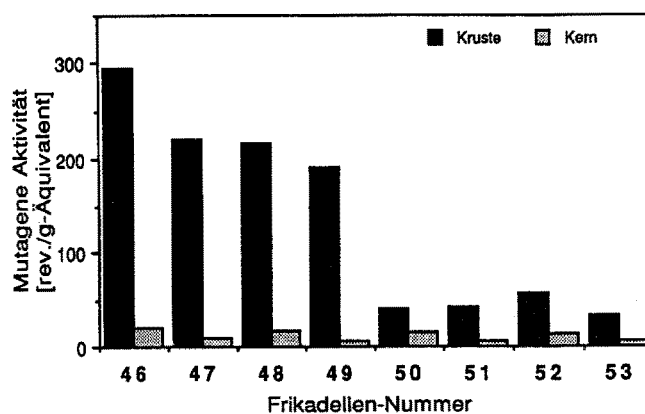
TA1538 ist mit TA98 eng verwandt und etwa gleich empfindlich.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß die Empfindlichkeit dieser mikrobiologischen HA-Nachweismethode um eine Größenordnung erhöht wird, wenn der Stamm YG1024 anstelle von TA98 benutzt wird. YG1024 wurde von Watanabe et al. (16) von TA98 abgeleitet; er unterscheidet sich von TA98 durch seine besonders hohe Aktivität des Enzyms *O*-Acetyltransferase (OAT). Dieses Enzym besitzt eine Schlüsselrolle bei der metabolischen Aktivierung von aromatischen Aminen (Abb. 5). HA werden wie eine Reihe anderer aromatischer Amine im Stoffwechsel enzymatisch verändert und dadurch in reaktive Metaboliten überführt, d.h. aktiviert: durch Oxidation der Aminogruppe (*N*-Oxidation) unter Bildung des Hydroxylamins und anschließende *O*-Acetylierung unter Bildung von Acetoxylaminen. Letztere reagieren über Nitreniumionen mit DNA. Dies ist Voraussetzung für die Mutations-

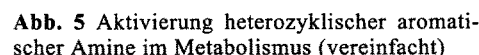
und Tumorauslösung. Beim Ames-Test wird die *N*-Oxidation *in vitro* durch das aus Leber gewonnene S9-Mix katalysiert, die *O*-Acetylierung durch die Salmonella-eigene OAT. Die Ergebnisse mit den reinen HA IQ, MeIQ und MeIQx (Abb. 1) zeigen, daß im Stamm YG1024 mit hoher OAT-Aktivität diese metabolische Aktivierung um ein Vielfaches ergiebiger ist als im Stamm TA98 mit normaler OAT-Aktivität.

Aus den Daten der Abb. 1 ergeben sich die minimalen noch sicher nachweisbaren HA-Mengen: sie betragen für IQ ca. 10 pg/Platte, für MeIQ ca. 15 pg/Platte, für MeIQx ca. 44 pg/Platte. Diese Mengen bewirken jeweils eine signifikante Steigerung der Revertanzahlen pro Platte um 60. Die errechnete Nachweisgrenze für MeIQx in einer Lebensmittelprobe (bei einer angenommenen Probenmenge von 10 g und einer Vierfachbestimmung) ergibt sich zu 0,02 ng/g Probe, d.h. 0,02 ppb. In der Praxis wird die Nachweisgrenze infolge von Verlusten bei der Probenaufarbeitung höher liegen. Dennoch zeigt ein Vergleich mit der Nachweisgrenze der chemisch-analytischen Methode von etwa 0,5 ppb (4) die hohe Leistungsfähigkeit der mikrobiologisch-analytischen Methode. Bei diesem Vergleich ist zu beachten, daß die mikrobiologische Methode wirkungsorientiert und nicht primär substanzorientiert ist; sie erfaßt die Summe der mutagenen Aktivität der HA in den Proben. Da die mutagene Aktivität der HA sehr eng mit ihrer unerwünschten Wirkung zusammenhängt, ist diese Methode relevant für die vergleichende Bewertung von HA enthaltenden Produkten und für die Minimierung der HA-Bildung.

Die HA-Gehalte in der Kruste der selbstgebratenen und der vom Fachgeschäft bezogenen Frikadellen unterscheiden sich um einen Faktor von etwa 5. Da beide Frikadellenarten uneingeschränkt genießbar waren, zeigt dieser Unterschied eine beträchtliche Variabilität der HA-Konzentrationen, gleichzeitig auch einen Weg zur Reduzierung der HA-Bildung. Die hier festgestellten Unterschiede sind wahrscheinlich eine Folge unterschiedlicher Brattemperatur und Bratdauer. Der Einfluß der Temperatur zeigt sich auch dadurch, daß im Kern der Frikadellen die Mutagenität an der Nachweisgrenze war. Außer Temperatur und Zeit spielen Parameter wie Portionsgröße, Zusammensetzung, Wassergehalt, Creatin/Creatiningehalt ver-



**Abb. 4** HA-Aktivität in selbstgebratenen (Nr. 46–49) und kommerziellen (Nr. 50–53) Frikadellen



fahren für die Bestimmung der mutagenen Aktivität und für das Ziel der HA-Minimierung vorzüglich eignet.

Für kompetente Mitarbeit danke ich Frau Doris Trapper.

1. Eisenbrand G, Tang W (1993) Food-borne heterocyclic amines. Chemistry, formation, occurrence and biological activities. A literature review. *Toxicol* 84:1-82
2. Felton JS, Knize MG (1990) Heterocyclic amine mutagens/carcinogens. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 94/1. Springer, Berlin, pp 471-502
3. Gross GA, Grüter A (1992) Quantitation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines in food products. *J Chromatogr* 592:271-278
4. Gross GA, Turesky RJ, Fay LB, Stillwell WG, Skipper PL, Tannenbaum SR (1993) Heterocyclic aromatic amine formation in grilled bacon, beef and fish and in grill scrapings. *Carcinogenesis* 14:2313-2318
5. IARC (1993a): IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; IQ (2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline), vol. 56, pp 165-195. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1993
6. IARC (1993b): IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; MeIQ (2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline), vol. 56, pp 197-209. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1993
7. IARC (1993c): IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; MeIQx (2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline), vol. 56, pp 211-228. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1993
8. Jackson LS, Hargraves WA, Stroup WH, Diachenko GW (1994) Heterocyclic aromatic amine content of selected beef flavors. *Mutation Res* 320:113-124
9. Maron DM, Ames BN (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res* 113:173-215
10. Nielsen PA, Vahl M, Gry J (1988) HPLC profiles of mutagens in lean ground pork fried at different temperatures. *Z Lebensm Unters Forsch* 187:451-456
11. Schuirmann E, Eichner K (1991) Bildung von IQ-Verbindungen in Fleisch und Fleischprodukten. *Z Ernährungswiss* 30:56-64
12. Skog K (1993) Cooking procedures and food mutagens: a literature review. *Food Chem Toxicol* 31:655-675
13. Stavric B, Matula TI, Klassen R, Downie RH (1993) Analysis of commercial bouillons for trace levels of

- 
- mutagens. *Fd Chem Toxicol* 31:981–987
14. Thorgeirsson UP, Dalgard DW, Reeves J, Adamson RH (1994) Tumor-incidence in a chemical carcinogenesis study of non-human primates. *Regulatory Toxicol Pharmacol* 19:130–151
15. Wakabayashi K, Nagao M, Esumi H, Sugimura T (1992) Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Res (suppl)* 52:2092s–2098s
16. Watanabe M, Ishidate M Jr, Nohmi T (1990) Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated *O*-acetyltransferase. *Mutation Res* 234:337–348
17. Weisburger JH (1993) Heterocyclic amines in cooked foods: possible human carcinogens. *Cancer Res* 53:2422–2424
18. Wild, Watkins BE, Vanderlaan M (1991) Azido- and nitro-PhIP, relatives of the heterocyclic arylamine and food mutagen PhIP – mechanism of their mutagenicity in *Salmonella*. *Carcinogenesis* 12:1091–1096