

ZUR FRAGE DER ENTSTEHUNG VON NITROSAMINEN
BEI DER REAKTION VON MONOSACCHARIDEN MIT AMINOSÄUREN
(MAILLARD - REAKTION)

K. Heyns und H. Koch

Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Hamburg

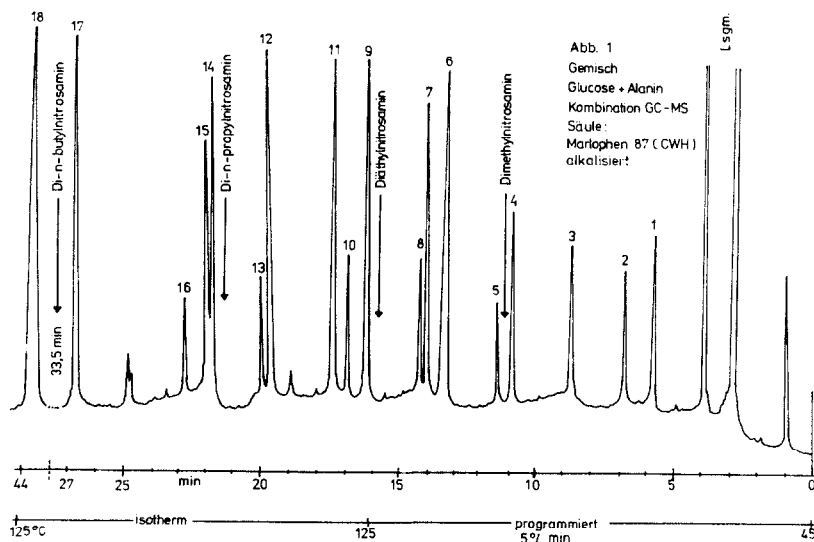
(Received in Germany 29 December 1969; received in UK for publication 26 January 1970)

Vor kurzem wurde von Devik¹⁾ die alarmierende Feststellung veröffentlicht, daß Nitrosamine wie Dimethyl-, Diäthyl-, Dipropyl- und Dibutyl-N-nitrosamin, die bekanntlich stark cancerogen sind²⁾, bei der Maillard-Reaktion durch einen in Naturstoffen und Nahrungsmitteln weitverbreiteten Reaktionsablauf entstehen.

Wir haben Untersuchungen an der Maillard-Reaktion mittels der Kombination von Kapillargaschromatographie und Massenspektrometrie³⁾ sowie mit polarographischen und dünnschichtchromatographischen Methoden durchgeführt.

Die Reaktionsansätze zwischen Glucose und Aminosäuren wurden unter Standardbedingungen durchgeführt. Die auf zwei Kartoffelstärken absorbierten Glucose/Alanin-, Glucose/Lysin- und Glucose/Glutaminsäure-Gemische (molares Verhältnis 1 : 2) wurden auf den erforderlichen pH-Wert eingestellt (Glaselektrode), gefriergetrocknet (Ausschluß von Pilzbefall), gleichen Zeiten einer Temperaturbehandlung von 100-105°C unterworfen und anschließend nach der Methode von Lydersen und Nagy⁴⁾ destilliert, bei zusätzlicher Kühlung des Rotationsverdampfers mit Eiswasser. Das Destillat wurde mit Methylendichlorid extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach vorsichtigem Abdampfen des Lösungsmittels wurden gelbe bis braune flüssige Rückstände erhalten. Es ist bekannt, daß bei der Maillard-Reaktion u. a. folgende Substanzklassen entstehen⁵⁾: Pyrazine^{6,7)}, Pyrrole, Furane, niedere Alkohole, Aldehyde, Ketone, Schiff'sche Basen. Die niedrig siedenden Alkohole werden bei der Temperaturbehandlung abdestilliert, die Aldehyde, Ketone und Schiff'schen Basen werden bei der Behandlung mit 3n NaOH zerstört - ebenso Furane und Pyrrole - außer den acetylierten Produkten. Damit reduziert sich das analytische Problem im wesentlichen auf die Fahndung nach Pyrazinen, acetylierten Pyrrolen und Furanen sowie den von Devik oben angegebenen Nitrosaminen. Da die zum Vergleich eingesetzten Pyrazin- und auch Nitrosamin-Gemische auf den gleichen Kapillarsäulen trennbar waren und mit Hilfe der Massenspektren eindeutig identifiziert werden konnten⁸⁾, ließen sich auch die gelben bis braunen Extrakte der oben

ausgeführten Variante der Maillard-Reaktion durch die bereits erwähnte neue Methode der Kombination GC - MS entsprechend untersuchen. Abb. 1 zeigt ein typisches Chromatogramm. Die beiden anderen Chromatogramme sind analog.



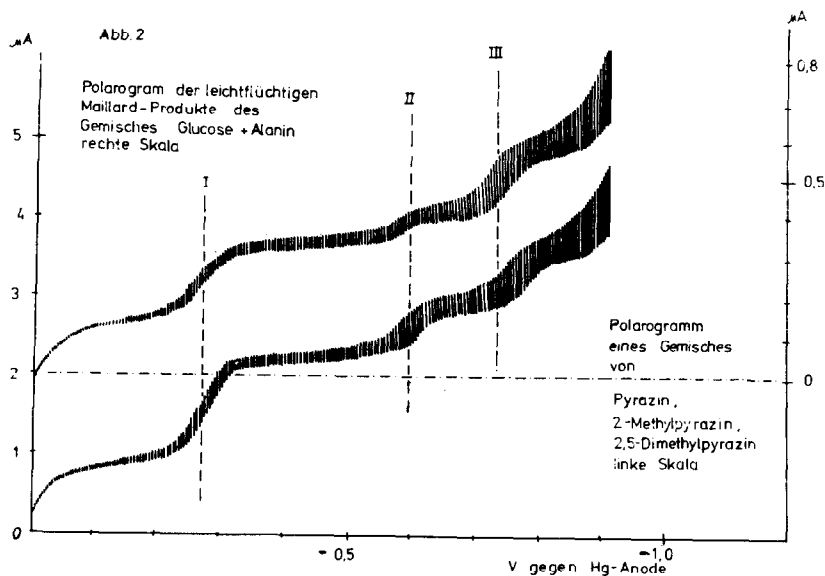
Erklärung der Zahlen in Abb. 1 :

- | | |
|---------------------------------|--|
| 1: MZ 86 | 10: Methyl-äthylpyrazin |
| 2: Pyridin | 11: 2-Acetylfuran |
| 3: MZ 85 | 12: 2,5-Dimethyl-3-Et-pyrazin |
| 4: Keton, MZ nicht bestimmbar | 13: 2,6-Dimethyl-3-Et-pyrazin |
| 5: 2-Methylpyrazin | 14: iso-Propyl-Et-pyrazin
+ Furfurylalkohol |
| 6: Alkohol, MZ nicht bestimmbar | 15: Alkylpyrazin MZ 150 |
| 7: MZ 100 | 16: Alkylpyrazin MZ 164 |
| 8: 2,5-Dimethylpyrazin | 17: höher alkyliertes Pyrazin |
| 9: Dichlorpropen | 18: 2-Acetylpyrrol |

Die Pfeile markieren die Stellen, an denen Nitrosamine auftreten müßten, wenn sie vorhanden wären.

Die Charakterisierung der Fraktionen erfolgte durch die Massenspektren und daneben auch durch gaschromatographisch identisches Verhalten. Die Leistungsfähigkeit der angewandten Arbeits- und Nachweismethoden wurde durch Testgemische bewiesen, bei denen die Nitrosamine in entsprechenden Konzentrationen bei der Absorption der wäßrigen Glucose/Aminosäure-Gemische auf der Kartoffelstärke zugesetzt wurden.

Zur Überprüfung der von Devik auf polarographischem Wege erhaltenen Ergebnisse wurden sowohl reine Nitrosamine und Nitrosamingemische als auch Pyrazine und Pyrazin-gemische unter identischen Bedingungen polarographiert⁴⁾. Abb. 2 zeigt ein typisches Polarogramm der leichtflüchtigen Maillard-Produkte von einem Glucose/Alanin-Gemisch. Die beiden anderen Polarogramme sind analog.



Der Vergleich mit einem Polarogramm des Gemisches von Dimethyl-, Diäthyl-, Dipropyl- und Dibutyl-nitrosamin zeigt, daß hier die Aufspaltung in einzelne Stufen nicht erfolgen kann, weil die Halbstufenpotentiale sich jeweils nur um 0,06 V unterscheiden. Das ebenfalls in Abb. 2 aufgeführte Polarogramm eines Gemisches von Pyrazin, 2-Methyl- und 2,5-Dimethylpyrazin zeigt völlige Übereinstimmung mit dem Polarogramm der Maillard-Produkte. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zeigten, daß sich beim Anfärben der Platten mit Diphenylamin/ PdCl_2 und UV-Bestrahlung zwei Flecke ergeben, von denen einer zwischen den violett-braunen Flecken von Dimethyl- und Diäthylnitrosamin lag und eine rosa Färbung hatte. Der zweite Fleck lag etwas oberhalb des Fleckes von Dibutylnitrosamin und hatte eine grau-braune Färbung. Durch Vergleichschromatogramme konnte der erste Fleck dem Acetylpyrrol zugeordnet werden. Der zweite Fleck unterschied sich durch die grau-braune Färbung deutlich von der Färbung des entsprechenden Nitrosamins und lag zudem etwas höher.

Die analytischen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Mit Hilfe der GC-MS-Kombi ist das Vorhandensein von Nitrosaminen auszuschließen. Die polarographischen Ergebnisse zeigen, daß es sich bei den Stufen II und III in Abb. 2 nicht um 4-Elektronenprozesse bei der Reduktion von Nitrosaminen handeln kann, sondern um nicht diffusionskontrollierte Prozesse

bei der Depolarisation von methylierten Pyrazinen^{10,11)}. Die Stufe I kann einem 2-Elektronen-prozeß bei der Bildung des Semichinons aus den Pyrazinen zugeordnet werden. Auch die dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen zeigen, daß es sich bei den auftretenden Flecken nicht um Nitrosamine handelt.

Literatur

- 1.) O. G. Devik, Acta chem. scand. 21, 2302 (1967)
- 2.) G. Eisenbrand und P. Marquardt, Medizin und Ernährung 10, 73 (1969)
(Zusammenfassung)
- 3.) K. Heyns und H. Röper, Tetrahedron Letters, vorstehend
- 4.) D. L. Lydersen und K. Nagy, Z. anal. Chem. 230, 277 (1967)
- 5.) J. E. Hodge, J. Agr. Food Chem. 1, 928 (1953)
- 6.) P.E. Koehler, M.E. Mason und K.A. Newell, ebenda 2, 393 (1969)
- 7.) P. Brandes und W. Stoehr, J. pract. Chem. 54, 481 (1896)
- 8.) H.A. Bondarowich, P. Friedel et al., J. Agr. Food Chem. 6, 1093 (1967)
- 9.) R. Preussmann, G. Neurath et al. Z. anal. Chem. 348, 852 (1967)
- 10.) L. F. Wiggins und W.S. Wise, J. Chem. Soc. IV, 4780 (1956)
- 11.) J. Volke, D. Dumanović und V. Volková, Coll. Czech. Comm. 30, 246 (1965)