

## Entwicklung einer GC/MS-Methode zur Bestimmung von kanzerogenen PAK in geräucherten Fleischerzeugnissen und Rauchkondensaten

Development of a GC/MS-method for the determination of carcinogenic PAH in smoked meat products and liquid smokes

W. JIRA

### Zusammenfassung

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind eine Gruppe von organischen Verbindungen, die 2 oder mehr kondensierte aromatische Kohlenstoffringe enthalten. Sie werden hauptsächlich bei pyrolytischen Prozessen, insbesondere bei der unvollständigen Verbrennung organischen Materials und daher auch beim Räuchern gebildet. Die Gruppe der PAK umfasst bis zu 250 verschiedene Substanzen, von denen 16 Verbindungen von der amerikanischen Umweltbehörde (US-EPA) als besonders gesundheits- und umweltgefährdend angesehen werden. Von einer niederländischen Arbeitsgruppe wurde neuerdings vorgeschlagen, für PAK sogenannte Toxizitätsequivalent-Faktoren (TEF) zu verwenden, um den Gehalt der toxikologisch relevanten PAK in einer Bezugssubstanz wie z.B. Benzo[a]pyren zusammenzufassen. Um den Gehalt dieser kanzerogenen PAK in geräucherten Fleischerzeugnissen und Rauchkondensaten bestimmen zu können wurde eine GC/MS-Methode entwickelt.

### Summary

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are a group of organic compounds, which contain 2 or more condensed aromatic carbon rings. They are produced mainly during pyrolytic processes, especially by the incomplete combustion of organic material and consequently also by smoking. The class of PAH includes about 250 different compounds. The US Environmental Protection Agency (US-EPA) considered 16 of these compounds as especially hazardous to health and environment. Researchers of the Netherlands proposed to use so called toxic equivalent factors (TEF), to bring the content of toxicological relevant PAHs together in one substance, i. e. benzo[a]pyrene. In order to determine the contents of these carcinogenic PAH in smoked meat products and liquid smokes a GC/MS-method was developed.

---

<b>Schlüsselwörter</b>	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe – PAK – GC/MS – Kanzerogenität – Toxizitätsequivalentfaktoren – geräucherte Fleischerzeugnisse – Rauchkondensate
<b>Key Words</b>	polycyclic aromatic hydrocarbons – PAH – GC/MS – carcinogenicity – toxic equivalent factors – smoked meat products – liquid smokes

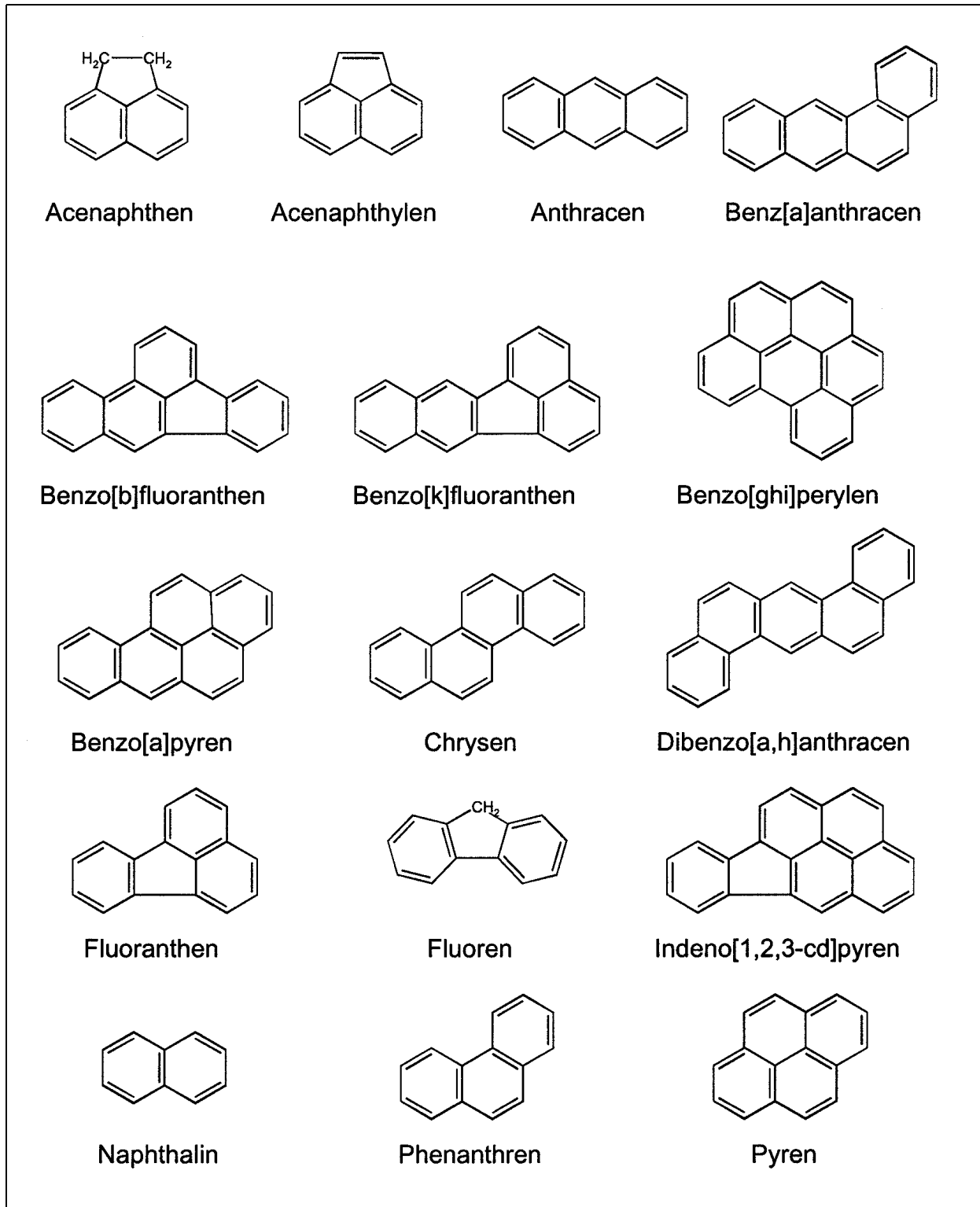
---

### Einleitung

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) stellen eine Reihe von organischen Verbindungen dar, die 2 oder mehr kondensierte aromatische Kohlenstoffringe enthalten. Sie werden hauptsächlich bei pyrolytischen Prozessen, insbesondere bei der unvollständigen

Verbrennung organischen Materials gebildet und sind ubiquitär verbreitet. Die Gruppe der PAK umfasst bis zu 250 verschiedene Substanzen, von denen 16 Verbindungen von der amerikanischen Umweltbehörde (US-EPA) als besonders gesundheits- und umweltgefährdend angesehen werden (US-EPA, 1984; siehe Tab. 1).

Tab. 1: Liste der 16 PAK, die von der amerikanischen Umweltbehörde als besonders gesundheits- und umweltgefährdend angesehen werden



Von diesen 16 EPA-PAK werden 6 Verbindungen von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als Stoffe

mit ausreichendem Beweis für die kanzerogene Wirkung im Tierversuch klassifiziert (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Klassifizierung der International Agency for Research on Cancer (IARC) nach den kanzerogenen Eigenschaften der von der US-EPA vorgeschlagenen 16 PAK aus dem Jahr 1987

<p><b>1. Einen ausreichenden Beweis für die kanzerogene Wirkung im Tierversuch gibt es für:</b></p> <p>Benzo[a]anthracen Benzo(b)fluoranthen Benzo(k)fluoranthen Benzo[a]pyren Indeno(1,2,3-cd)pyren Dibenzo(a,h)anthracen</p> <p><b>2. Von den zuvor genannten Stoffen werden folgende als wahrscheinlich auch für den Menschen kanzerogen eingestuft:</b></p> <p>Benzo[a]anthracen Benzo[a]pyren Dibenzo(a,h)anthracen</p> <p><b>3. Als möglicherweise für den Menschen kanzerogen werden eingestuft:</b></p> <p>Benzo(b)fluoranthen Benzo(k)fluoranthen Indeno(1,2,3-cd)pyren</p>
--

Im Jahr 2002 hatte die EU-Kommission das Scientific Committee on Food (SCF) beauftragt, die Belastung der Lebensmittel mit PAK in der EU zu ermitteln (SCF, 2002). Dabei sollte das SCF auf der Basis des gegenwärtigen Kenntnisstandes herausfinden, welche PAK als gesundheitliches Risiko für den Verbraucher besonders relevant sein könnten und in welchen Bereichen ein dringender Bedarf für künftige Untersuchungen bestehen könnte. Hintergrund für diese Risikoabschätzung ist eine Überlegung der EU-Kommission, Höchstgehalte für PAK in Lebensmitteln auf EU-Ebene einzuführen. Die Stellungnahme beschränkt sich dabei im Wesentlichen auf die 16 EPA-PAK.

Für Nichtraucher erfolgt die PAK-Aufnahme zu mehr als 95 % über die Nahrung (DE VOS *et al.*, 1990). Untersuchungen über den Beitrag der verschiedenen Lebensmittelgruppen zur PAK-Aufnahme aus dem Jahr 1983 haben

ergeben, dass britische Bürger 50 % der PAK über Öle und Fette, 30 % über Cerealien und 8-10 % über Gemüse aufnehmen (DENNIS *et al.*, 1983). Geräuchertes Fleisch und geräucherter Fisch liefern demnach nur einen sehr kleinen Beitrag für die Aufnahme von PAK. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden im Jahr 1990 durch eine in den Niederlanden durchgeführte Studie bestätigt (DE VOS *et al.*, 1990). Das SCF weist in seiner Stellungnahme jedoch darauf hin, dass geräuchertes und gegrilltes Fleisch und Fleischerzeugnisse einen deutlichen Beitrag zur PAK-Aufnahme durch Lebensmittel leisten können, falls sie überdurchschnittlich konsumiert werden. Das in dem Bericht des Komitees angeführte Datenmaterial hinsichtlich des PAK-Gehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen ist jedoch kaum belastbar, ja sehr dürftig. Daten über PAK-Gehalte in geräucherten Fleischerzeugnissen fanden keinen Eingang in dem Bericht. Geräu-

chertes Fleisch und Fleischerzeugnisse stellen mit einem durchschnittlichen Verzehr des Bundesbürgers von ca. 24 kg den größten Anteil der geräucherten Lebensmittel dar und demzufolge ist für eine Abschätzung der Belastungssituation mit PAK eine ausreichende Kenntnis der PAK-Gehalte in diesen Lebensmitteln von besonderer Wichtigkeit.

Bislang wird die PAK-Verbindung Benzo[a]pyren als Leitsubstanz für die Belastung mit PAK bei geräucherten Fleischerzeugnissen verwendet. Dabei gilt laut Aromenverordnung (BGBl., 2001) ein tolerierbarer Höchstgehalt von 1 µg/kg (ppb), bezogen auf Frischmasse. Für Fleischerzeugnisse, die mit Rauchkondensaten (Flüssigrauch) behandelt wurden, gilt die Regelung, dass Lebensmittel, denen durch Aromen mehr als 0,03 µg/kg (ppb) an Benzo[a]pyren zugeführt wurden, gewerbsmäßig nicht in den Verkehr gebracht werden dürfen. Da für PAK nur der Gehalt an Benzo[a]pyren gesetzlich geregelt ist, existierte an der BAFF bis dato nur eine entsprechende HPLC/Fluoreszenz-Bestimmungsmethode, die jedoch nicht geeignet ist, gleichzeitig den Gehalt aller kanzerogenen PAK zu bestimmen. Aus diesem Grund wurde im Jahr 2002 an der BAFF eine Methode zur Bestimmung der kanzerogenen PAK mit Hilfe der GC/HRMS erarbeitet.

#### **Analysenmethode zur Bestimmung der kanzerogenen PAK**

Die an der BAFF entwickelte Analysenmethode zur Bestimmung der kanzerogenen PAK beruht auf dem Prinzip der Isotopenverdünnungsanalyse, d.h. die zu analysierenden PAK-Verbindungen (Fluoranthen, Pyren, Benzo[a]anthracen, Chrysen, Benzo[b]fluoranthen, Benzo[k]fluoranthen, Benzo[a]pyren, Indeno(1,2,3-c,d)pyren, Dibenz(a,h)anthracen und Benzo(g,h,i)perylen) werden alle als isotope markierte Standardverbindungen vor der Aufarbeitung zugesetzt und zur Quantifizierung herangezogen. Das Aufarbeitungsschema ist in Abbildung 1 zu sehen.

Zunächst werden die PAK mit Hilfe der beschleunigten Lösemittelextraktion (ASE 200, Fa. Dionex) extrahiert. Hierzu wird das zu untersuchende Probenmaterial zunächst sorgfältig homogenisiert und ca. 6 bis 8 Gramm mit der gleichen Menge an Trockenmittel (Poly-(acrylsäure)-Natriumsalz-pfropf-poly-(ethylenoxid)) in einem Becherglas verrieben und in eine 33 ml Extraktionszelle gefüllt. Auf eine Zugabe von Seesand sollte unbedingt verzichtet werden, da sich in Vorversuchen gezeigt hat, dass von den oben genannten PAK-Verbindungen nur Fluoranthen, Chrysen, Benzo[b]fluoranthen und Benzo[k]fluoranthen nicht an Seesand absorbiert werden. Alle anderen PAK werden nahezu vollständig an Seesand gebunden. Anschließend erfolgt die Zugabe der <sup>13</sup>C-markierten PAK als interne Standardverbindungen. Die Abtrennung von Fett und anderen höhermolekularen Verunreinigungen erfolgt mit Hilfe einer Gelpermeationschromatographiesäule mit einem Polystyrolgel (Bio-Beads SX-3, 200-400 mesh) als Füllmaterial. Anschließend erfolgt die Abtrennung von polaren Verunreinigungen und eventuell verbliebenen Fetts Spuren mit Hilfe einer kleinen Kieselgelsäule (2,5 g Kieselgel, mit 15 % Wasser deaktiviert). In der Regel ist diese Aufreinigung über GPC- und Kieselgel-Säule völlig ausreichend. Bei besonders schwierigen Matrices wie beispielsweise manchen Rauchkondensaten ist jedoch noch ein weiterer Aufreinigungsschritt über eine CN/SiOH-Kombinationsphase erforderlich. Vor der GC/MS-Messung erfolgt die Zugabe einer Standardlösung (D12-Benzo[a]anthracen, D12-Benzo[a]pyren und D12-Benzo(g,h,i)perylen) zur Bestimmung der Wiederfindungsraten. Die Wiederfindungsraten liegen für Benzo[a]anthracen und Benzo(g,h,i)perylen bei ca. 90-110 %, für Benzo[a]pyren bei etwa 75-85 %.

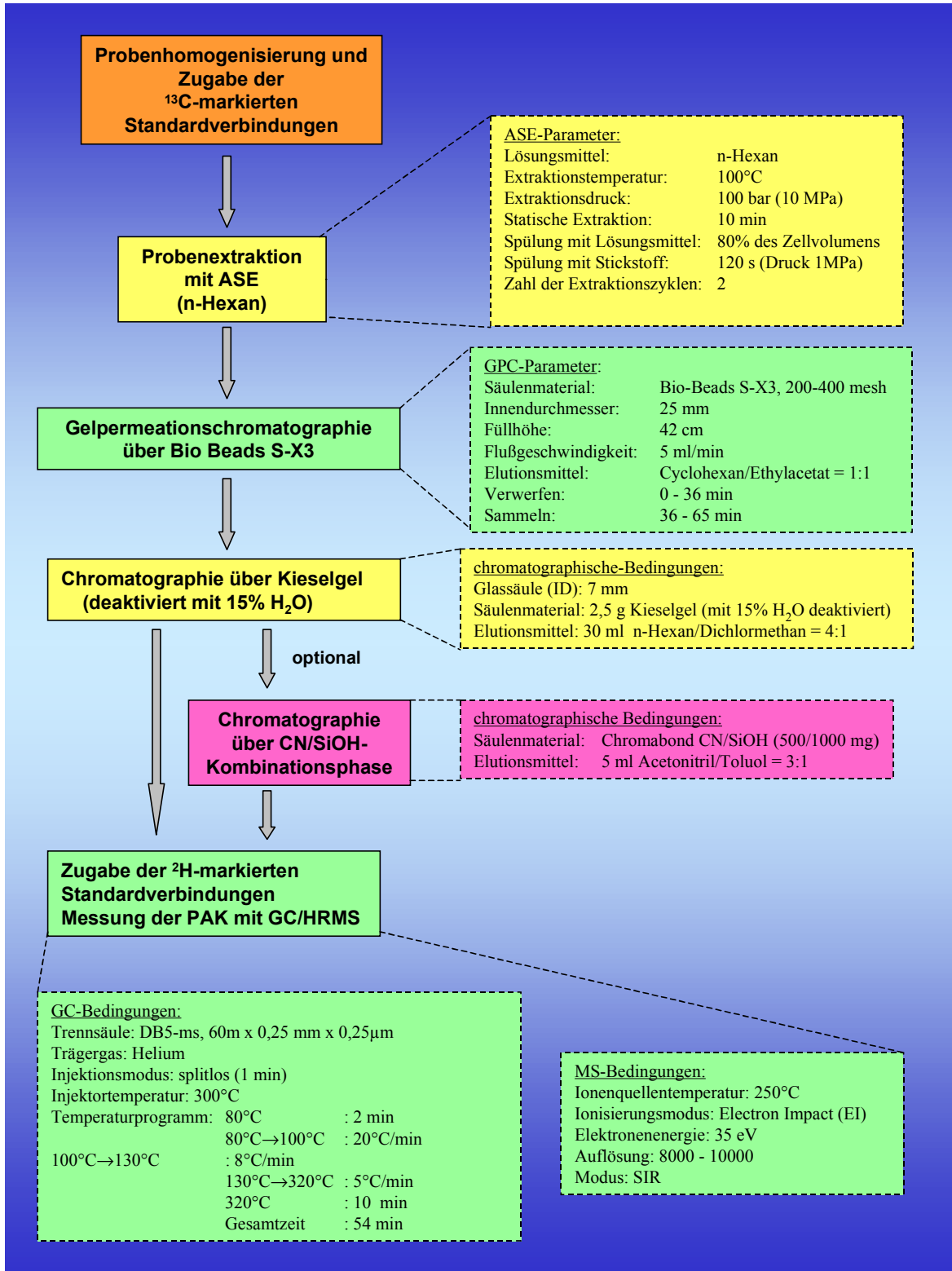


Abb. 1: Schema der GC/HRMS-Analytik der kanzerogenen PAK

Die Qualität des Analysenverfahrens wurde durch Untersuchung eines Standard-Referenzmaterials (Mussel Tissue SRM 2977) des National Institute of Standards and Technology überprüft. Eine Gegenüberstellung der mit Hilfe des oben

beschriebenen Analysenverfahrens gemessenen und den zertifizierten Konzentrationen ergab sehr gute Übereinstimmungen für die untersuchten PAK-Verbindungen (siehe Abb. 2).

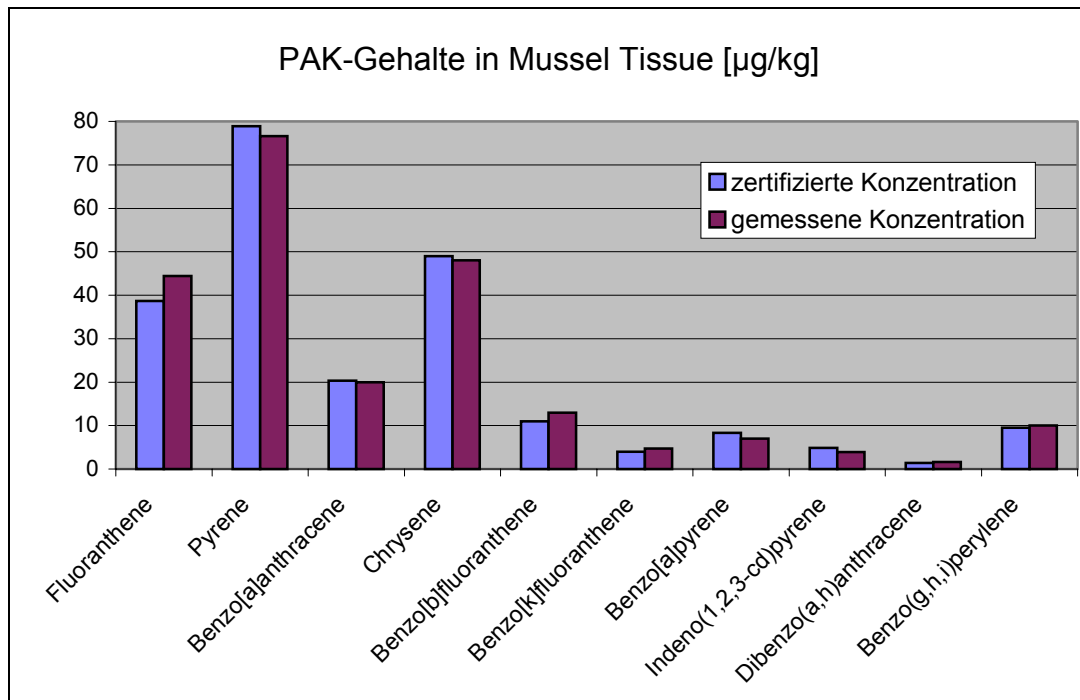


Abb. 2: Gegenüberstellung der gemessenen und zertifizierten PAK-Konzentrationen in Mussel Tissue (SRM 2977)

### Das Toxizität-Equivalent-Konzept

Die 16 von der US-EPA vorgeschlagenen PAK unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Gehalte und ihrer Kanzerogenität. Daher wurde, um das kanzerogene Potential der PAK vergleichbar zu machen, vorgeschlagen, den Gehalt an toxikologisch relevanten PAK in einer Leitsubstanz wie z. B. Benzo[a]pyren zusammenzuführen.

Von einer niederländischen Arbeitsgruppe (TRAAG *et al.*, 2001) wurde neuerdings empfohlen, für PAK sogenannte Toxizitätsequivalent-Faktoren (TEF) zu verwenden, wie dies bereits bei der Dioxin- und PCB-Analytik angewandt wird: Bei der Analytik der Dioxine und PCB fasst man die (im Tierversuch ermittelten) Toxizitäten aus den 17 Dioxin-, Furan- und den 12 dioxinähnlichen PCB-Verbindungen

zusammen. Diese Größe drückt summarisch die relative Toxizität von 17 unterschiedlichen PCDD/F und 12-PCB-Kongeneren im Vergleich zum 2,3,7,8-TCDD („Seveso-Dioxin“) aus und wird als Toxizitäts-Equivalent (TEQ) bezeichnet. Dieser errechnet sich aus der jeweiligen Konzentration eines Kongeners, multipliziert mit einem Toxizitätsequivalent-Faktor (TEF), der die relative Toxizität dieses Kongeners im Vergleich zum 2,3,7,8-TCDD angibt, dem ein TEF von 1 zugewiesen wird.

In Analogie dazu wurde ein TEQ-Konzept für PAK entwickelt, das sich auf die PAK-Verbindung mit der höchsten Toxizität, Benzo[a]pyren, als Bezugsgröße bezieht. Diesem wird ebenso wie Dibenzo(a,h)anthracen ein TEF von 1 zugeordnet. Diese beiden PAK sind in der Klassi-

fizierung der IARC als „wahrscheinlich auch für den Menschen krebserregend“ eingestuft. Dies gilt auch für Benzo[a]-anthracen, dem wie den als „möglicherweise für den Menschen krebserregend“ eingestuften PAK Benzo(b)fluoranthen, Benzo(k)fluoranthen, und Indeno(1,2,3-cd)pyren jeweils ein TEF von 0,1 zugewiesen wird. Die anderen in Tabelle 3 aufgeführten Verbindungen, für die keine Hinweise auf Kanzerogenität vorliegen, haben nur geringe TEF-Werte (0,01 bzw. 0,001).

Tab. 3: Vorgeschlagene TEF-Werte für PAK (TRAAG *et al.*, 2001)

Substanz	TEF
Benzo[a]pyren	1
Dibenzo(a,h)anthracen	1
Benzo[a]anthracen	0,1
Benzo[b]fluoranthen	0,1
Benzo[k]fluoranthen	0,1
Indeno(1,2,3-cd)pyren	0,1
Chrysen	0,01
Acenaphthylen	0,01
Fluoranthen	0,01
Acenaphthen	0,001
Phenanthren	0,001
Pyren	0,001

Es muss allerdings erwähnt werden, dass die Anwendung eines TEF-Modells für PAK sehr kritisch betrachtet werden sollte, da ein solches Modell eigentlich nur unter der Voraussetzung angewendet werden kann, falls die einzelnen PAK-Verbindungen ihre toxikologischen Effekte auf dem gleichen Wirkmechanismus ausüben. Dies ist zwar bei Dioxinen und dioxinähnlichen PCB der Fall, trifft jedoch bei den PAK nicht zu. Obwohl einige PAK wie auch die Dioxine und dioxinähnlichen PCB an den Ah-Rezeptor binden, ist dies nicht der einzige Effekt, der das kanzerogene Potential der PAK bestimmt. Daneben spielen Effekte wie DNA-Bindung und die Induzierung von Mutationen eine Rolle. Ferner existieren keinerlei Hinweise, dass

die verschiedenen PAK auf dem gleichen metabolischen Weg aktiviert werden, an die DNA in den gleichen Positionen binden und die gleichen Arten von Mutationen in den gleichen Organen und Geweben induzieren.

Trotz dieser Einwände von toxikologischer Seite gegen ein TEF-Modell kann ein solches Modell dennoch dazu dienen abzuschätzen, ob tatsächlich alle kanzerogenen PAK erfasst werden müssen oder ob die Messung einiger weniger PAK oder gar die Bestimmung von Benzo[a]pyren allein als Leitsubstanz ausreichend ist.

## Diskussion

Für geräucherte Fleischerzeugnisse ist bis dato Benzo[a]pyren die Leitsubstanz, die anderen 5 PAK-Verbindungen mit nachgewiesener kanzerogener Wirkung im Tierversuch werden nicht berücksichtigt. Um den Gehalt dieser kanzerogenen PAK in geräucherten Fleischerzeugnissen und Rauchkondensaten untersuchen zu können wurde eine GC/MS-Analytik entwickelt. Dies war erforderlich, da die für Benzo[a]pyren an der BAFF etablierte HPLC/Fluoreszenz-Methode nicht geeignet ist, gleichzeitig den Gehalt aller 16 umweltrelevanten PAK zu bestimmen (TRAAG *et al.*, 2001).

Zudem bietet die entwickelte GC/MS-Methode auch weitere Vorteile gegenüber der Methode nach § 35 LMBG L 07.00-40:

- ❖ Auf eine aufwändige Verseifung der Fette kann verzichtet werden. Dies führt zu einer deutlichen Ersparnis an Lösemitteln und Zeit.
- ❖ Der Einsatz der beschleunigten Lösemittelextraktion (Accelerated Solvent Extraction, ASE) benötigt nur geringe Mengen an Lösmitteln und gewährleistet eine sehr effiziente Extraktion mit einem hohen Automatisierungsgrad.
- ❖ Die Detektion mit Hilfe der hoch auflösenden Massenspektrometrie steigert aufgrund der hohen Selektivität die Nachweissicherheit. Zudem erlaubt

sie den Einsatz von isotope-markierten Standardverbindungen.

Anhand dieser Methode sollen nun die Gehalte der kanzerogenen PAK in geräucherten Fleischerzeugnissen und Rauchkondensaten bestimmt werden. Dabei sind folgende Fragestellungen von besonderer Bedeutung:

- Wie sieht die aktuelle Belastungssituation von geräucherten Fleischerzeugnissen mit kanzerogenen PAK in der Bundesrepublik Deutschland aus?
- Haben die verschiedenen Räuchertechnologien und Räucherbedingungen bei Fleisch und Fleischerzeugnissen einen signifikanten Einfluss auf das PAK-Muster bzw. den PAK-TEQ?
- Gibt es bei den modernen Räucherverfahren ein festes Verhältnis zwischen dem Benzo[a]pyren-Gehalt und dem PAK-TEQ, d.h. könnte man durch alleinige Bestimmung von Benzo[a]pyren zuverlässige Abschätzungen des PAK-TEQ vornehmen?
- Welchen Beitrag zum PAK-TEQ in Fleisch und Fleischerzeugnissen liefern Gewürze?

In dem eingangs erwähnten Positionspapier des SCF-Komitee werden Untersuchungen zur Bestimmung von PAK-Mustern in verschiedenen Lebensmitteln als dringend erforderlich angesehen, da diesbezüglich bislang nur sehr wenige Daten (insbesondere für geräucherte Fleischerzeugnisse) existieren. Wendet man das TEQ-Modell auf die im Bericht aufgeführten Literaturdaten an, bei denen die Gehalte der EPA-PAK (oder zumindest die meisten davon) in verschiedenen Lebensmitteln untersucht wurden, so zeigt sich, dass Benzo[a]pyren bei allen untersuchten Lebensmitteln den größten

Beitrag zum PAK-TEQ liefert. Der Beitrag von Benzo[a]pyren zum PAK-TEQ liegt sowohl bei Ölen und Fetten (z.B. Sonnenblumenöl, Olivenöl, Margarine, Butter), als auch bei Cerealien (z.B. Kleie, Frühstückscerealien, Brot) und Gemüse (z.B. Salat) bei etwa 50 %, wobei die Schwankungsbreite relativ gering ist.

Bereits im Jahr 1979 wurden an der BAFF mit Hilfe eines allerdings sehr aufwändigen Analysenverfahrens 7 verschiedene geräucherte Fleischerzeugnisse hinsichtlich ihres Gehaltes an zahlreichen PAK untersucht (POTTHAST, 1979). Ähnlich wie bei den oben durchgeführten Untersuchungen ergab sich hier im Median ein Anteil des Benzo[a]pyren am PAK-TEQ von 46 %. Der Anteil von Dibenzo[a,h]-anthracen lag hier im Median bei 31 %. Die beiden PAK mit dem höchsten TEF-Wert scheinen hier also den PAK-TEQ zu dominieren.

Die bereits 1979 an der BAFF durchgeführten Untersuchungen sind jedoch nicht ohne weiteres auf die Gegenwart übertragbar, da sich zum einen die Räucher-technologie in den letzten 20 Jahren deutlich weiterentwickelt hat, zum anderen heute auch vermehrt Rauchkondensate zur Anwendung kommen.

### Danksagung

Für die sorgfältige und zuverlässige technische Mitarbeit sei Frau Elisabeth Klötzer herzlich gedankt.

### Literatur

Die Literatur kann beim Verfasser angefordert werden.