

Die toxikologische Bewertung von Nitritpökelsalz in Fleischerzeugnissen

Abschlussarbeit
Postgradualstudium Toxikologie
der Universität Leipzig

Dietmar Richter, Lebensmittelchemiker
Mainz, den 25.07.2007

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Dr. Hans-Michael Huck und Herrn Dr. Jürgen Nolde von der Firma GRACE Davison dafür bedanken, dass sie mir das Postgradualstudium Toxikologie und Umweltschutz an der Universität Leipzig ermöglichten. Herzlichen Dank sage ich auch allen Kollegen und Freunden, die mich bei der Fertigstellung der Arbeit unterstützt haben.

1	EINLEITUNG	4
2	EINSATZ VON NITRITPÖKELSALZ IN FLEISCH UND FLEISCHERZEUGNISSEN	6
2.1	Konservierung	8
2.1.1	Hemmung des Bakterienwachstums durch Stickstoffmonoxid (NO)	9
2.1.2	Molekulare Mechanismen des Nitrits zur Hemmung von anaeroben Bakterien	11
2.2	Umrötung	12
2.3	Aromabildung	13
2.4	Antioxidans	13
3	LEBENSMITTELRECHTLICHE BEWERTUNG	15
4	PHYSIOLOGISCHE WIRKUNG VON NITRIT UND SEINEN REAKTIONSPRODUKTEN	17
4.1	Methämoglobinämie	19
4.2	Endogene Bildung von Stickstoffmonoxid	22
4.2.1	Metabolismus von Stickstoffmonoxid im Erythrozyten	23
4.2.2	Metabolismus von Stickstoffmonoxid im Plasma	24
4.2.3	Tägliche Bildung von Stickstoffmonoxid und dessen Abbau	26
4.3	Nitrosamine	28
4.3.1	Epidemiologische Studien über die Entstehung von Magen- und Speiseröhrenkrebs	31
4.3.2	N-Nitrosoverbindungen im Gastrointestinaltrakt von Ratten und Mäusen	34
4.3.3	Exposition des Menschen mit N-Nitrosoverbindungen	36
4.4	Toxikologische Bewertung von Nitrit und Nitrosaminen	42
4.4.1	Methämoglobinämie	42
4.4.2	Akute Toxizität	43
4.4.3	Toxizität bei wiederholter Gabe	43
4.4.4	Mutagenität	44
4.4.5	Karzinogenität	45
4.4.6	Reproduktionstoxizität	45
4.4.7	Nahrungsbedingte Aufnahme von Nitrit beim Menschen	45
5	TOXIKOLOGISCHE BEWERTUNG DER VERWENDUNG VON NPS	49
6	ABSCHLIESSENDE BEWERTUNG	53
7	LITERATUR	54

1 Einleitung

Der Begriff Lebensmittelkonservierung bezeichnet den Prozess der Behandlung von Lebensmitteln mit dem Ziel, deren Haltbarkeit zu verlängern. Lebensmittel pflanzlicher und tierischer Herkunft bestehen aus einer Vielzahl von Inhaltsstoffen. Die energetisch hochwertigen Bestandteile Fett, Eiweiß und Kohlenhydrate stammen bei den pflanzlichen Nahrungsmitteln überwiegend aus den Speicherorganen wie Rüben, Knollen, Rhizomen, Samen und Früchten. In tierischen Nahrungsmitteln sind Fleisch und Milch die Lieferanten von Eiweiß und Fett. Bei der Zubereitung von tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln werden durch Zerkleinerung vorhandene Schutzbarrieren wie Haut oder Schale zerstört und die Oberfläche des Lebensmittels vergrößert. Hieraus resultiert eine weitgehend ungeschützte Angriffsfläche für Mikroorganismen und durch den Kontakt mit Sauerstoff die Möglichkeit von enzymatischen Reaktionen. Diese Vorgänge, welche zu einer qualitativen Wertminderung bis hin zum Verderb führen können, werden durch die Lebensmittelkonservierung gestoppt oder stark verlangsamt, bei gleichzeitigem Erhalt von Nährwert, Geschmack und Struktur.

Zum Schutz von Lebensmitteln gegen Mikroorganismen genügen häufig bereits allgemeine Konservierungsmaßnahmen wie Einwirkung von Hitze (Sterilisierung) bei der Herstellung von Konservenprodukten, Trocknung, Gefrierlagerung, Zusätze von Kochsalz bzw. von Zucker oder Alkohol, Verwendung von Genusssäuren (z.B. Essigsäure, die unter anderem in Ketchup, Mayonnaise und Sauergemüse zugesetzt wird) und Räucherung [SCHWEDT, 1999].

Ein klassisches Verfahren zur Haltbarmachung von Fleisch ist das Pökeln. Dabei wird Fleisch oder Brät (feinst zerkleinertes Fleisch) mit Salz, welches einen Zusatz von Natriumnitrit oder Natriumnitrat enthält, versetzt. Nitrit wird zu Stickstoffmonoxid (NO) reduziert, welches Konservierung, Umrötung, Bildung des typischen Pökelaromas und die antioxidative Wirkung von Fetten bewirkt. Manche Autoren sehen einen Zusammenhang zwischen dem Verzehr von nitrit-/nitratgepökelten Fleischwaren mit der Bildung von kanzerogenen Nitrosaminen. Sie sehen ein gesundheitliches Risiko hinsichtlich Krebserkrankungen durch den Verzehr von gepökelten Fleischwaren.

1. Einleitung

Nitrat und Nitrit gelangen bei pflanzlichen Lebensmitteln über die Düngung und bei tierischen Lebensmitteln durch die Konservierung mit Nitritpökelsalz in die Nahrungsmittel.

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst der Einsatz und die Wirkung von Nitritpökelsalz in Fleisch- und Fleischerzeugnissen dargestellt werden. Weiterhin wird der aktuelle lebensmittelrechtliche Hintergrund ausgeführt. Im weiteren Verlauf wird die physiologische Wirkung von Nitrit und seinen Reaktionsprodukten sowie die toxikologischen Aspekte der Verwendung von Nitritpökelsalz beschrieben. Abschließend wird der Einsatz des Lebensmittelzusatzstoffes E 250 (NaNO_2) bewertet.



Abbildung 1: Typische Einsatzgebiete von Nitritpökelsalz: Brühwurstherzeugnisse, Kochpökelware (Kasseler), Roher Schinken (von links nach rechts, von hinten nach vorne) [AVO Werke, Osnabrück]

2 Einsatz von Nitritpökelsalz in Fleisch und Fleischerzeugnissen

Das Pökelfverfahren zur Haltbarmachung von Fleisch ist über Jahrhunderte vom Prinzip her gleich geblieben. Fleisch oder Brät werden mit Salz, welches einen Zusatz von Nitrit enthält, versetzt [THIEMIG et al., 2000]. Man unterscheidet zwischen drei verschiedenen Verfahren der Pökellung:

- **Trockenpökellung:**

Die Fleischstücke werden mit Pökelsalz überschichtet bzw. eingerieben und dann in Fässern oder Steingutgefäßen gelagert. Der dabei austretende Fleischsaft wird zusammen mit den Pökelsalzen auch als Pökellake bezeichnet. Häufig werden Trocken- und Nasspökellung kombiniert.

- **Nasspökellung:**

Hierbei werden die Fleischstücke in eine 15 bis 20%ige Lösung aus Nitritpökelsalz (Pökellake) eingelegt oder die Pökellake mittels Multinadelinjektor in das Muskelgewebe eingebracht.

- **Schnellpökellung:**

Durch das Einspritzen der Pökellake in die Adern oder Muskeln des Fleisches wird überwiegend eine Umrötung und weniger ein Konservierungseffekt erzielt.

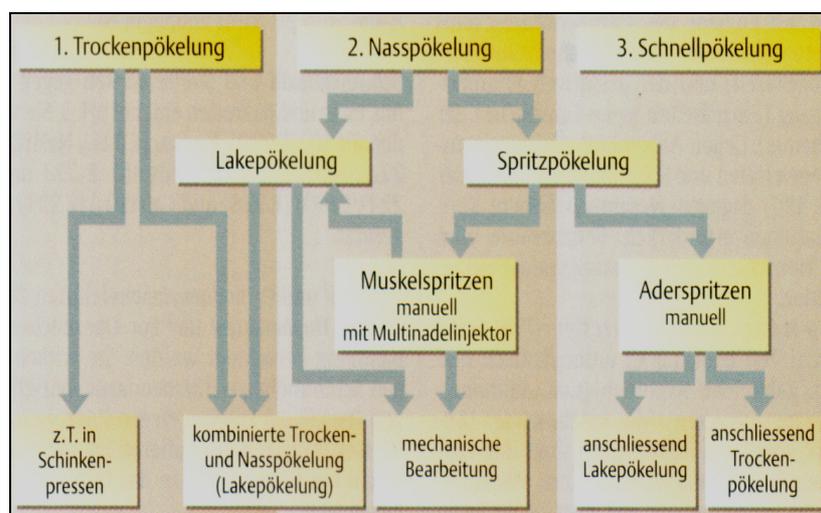


Abbildung 2: Pökellung (SCHWEDT, 1999)

Durch das Pökeln werden bei Fleisch- und Fleischerzeugnissen folgende Wirkungen erreicht:

- Hemmung bestimmter Mikroorganismen (z.B. Clostridium botulinum), also ein Konservierungseffekt,
- Erhitzungs- und sauerstoffbeständige Farbgebung des Fleisches (Pökelrot), bezeichnet als „Umrötung“,
- beabsichtigte Veränderung des Geruchs und Geschmacks, teilweise auch Konsistenz von Fleisch und Fleischerzeugnissen, das „Pökelaroma“,
- Reduktion des negativen Einflusses des Luftsauerstoffs auf die Fettsäuren (Ranzigkeit), also eine „Antioxidation“.

Neben dem Nitrit wurde auch häufig Nitrat für die Haltbarmachung und Umrötung von Fleisch und Fleischerzeugnissen verwendet. Während das Nitrat jedoch zunächst durch bakteriell-chemische Reaktionen in Nitrit überführt werden muss, steht Nitrit unmittelbar für die Haltbarmachung und Umrötung zur Verfügung. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden in zunehmendem Maße Nitritsalze verwendet, die neben der besseren technologischen Wirksamkeit auch gesundheitliche Gefahren mit sich brachten. Man erkannte schnell, dass Nitrit in hohen Konzentrationen toxisch wirkt. Daher wurde 1928 durch das damalige Reichsgesundheitsamt der Vorschlag unterbreitet, eine Vormischung von Kochsalz mit einem Zusatz an Nitrit in Mengen von 0,5-0,6% in Form des Nitritpökelsalzes (NPS) vorzusehen. Rechtlich festgelegt wurde die Herstellung und Verwendung von NPS im Jahr 1934 mit dem „Gesetz über die Verwendung salpetersaurer Salze im Lebensmittelverkehr“. Danach durfte die Produktion von NPS nur in zugelassenen Betrieben erfolgen. Das Pökelsalz musste besonders gekennzeichnet werden, um Verwechslungen zu vermeiden. Mit dieser Vormischung (reines Nitrit durfte in den Betrieben nicht mehr verwendet werden) konnte die technologisch erforderliche Menge an Nitrit mit der maximal sensorisch vertretbaren Salzmenge im Produkt so weit in Einklang gebracht werden, dass akute Vergiftungen ausgeschlossen werden konnten [BgVV Stellungnahme, 2001].

2.1 Konservierung

Die konservierende Wirkung von Nitritpökelsalz beruht auf den Inhaltsstoffen Kochsalz und Nitrit. Das Salzen verursacht eine Herabsetzung der Wasseraktivität a_w . Der a_w Wert ist das Verhältnis von Wasserdampfpartialdruck im Lebensmittel (p) zum Sättigungsdampfdruck des reinen Wassers (p_0). Durch die Zugabe von Kochsalz wird ein Teil des Wassers gebunden und steht den Mikroorganismen nicht zur Verfügung. Für jede Art von Bakterien gibt es einen minimalen a_w Wert, dessen Unterschreitung eine Vermehrung ausschließt:

Bakterien a_w : 0,88

Halophile Bakterien a_w : 0,75

Hefen und Schimmelpilze a_w : 0,62

[SCHWEDT, 1999]

Zum Vergleich die Wasseraktivität von zwei Wurstarten [BELITZ, GROSCH, 1992]:

Leberwurst a_w : 0,96

Salami a_w : 0,82-0,85

Durch Salzen von Fleisch (bis zu 12 % NaCl) wird eine Wasseraktivität von 0,75, also nur eine fäulnishemmende Wirkung erreicht. Das im NPS enthaltene Nitrit unterdrückt das Wachstum verschiedener pathogener Keime und vor allem das des Toxinbildners *Clostridium botulinum*.

Clostridium botulinum ist ein strikt anaerober, eiweißverdauender, katalase-negativer stäbchenförmiger Organismus, welcher hitzeresistente Sporen bildet. Clostridien kommen hauptsächlich im Boden vor. Unter Ausschluss von Luft bildet *C. botulinum* ein äußerst starkes Neurotoxin. Bei diesem handelt es sich um ein hitzelabiles Protein. Das Toxin hemmt die Reizübertragung an den motorischen Endplatten durch blockieren der Exozytose von acetylcholinenthaltenden Vesikeln. Der klassische Botulismus entsteht in der Regel nach Genuss verdorbener Lebensmittel, in denen das Gift unter anaeroben Bedingungen durch *C. botulinum* gebildet wurde. Das durch den Magen-Darm-Trakt resorbierte Toxin wird via Blut zum peripheren Nervensystem transportiert. Nach Stunden bis Tagen kommt es zu Schläfrigkeit, Übelkeit, Lähmungen, Doppelsehen, Schluck- und Sprechschwierigkeiten. Der Tod kommt meist durch

Atemlähmung zustande. Nicht fachgerecht sterilisierte Konserven von Fleisch und Hülsenfrüchten können Botulinustoxin enthalten. Auch Würste und Schinken können kontaminiert sein [KAYSER et al., 1989].

Der Mechanismus, welcher die Hemmung des Bakterienwachstums durch Nitrit beschreibt, ist von erheblichem Interesse und wurde mehr als 50 Jahre untersucht, trotzdem wird er auf molekularer Ebene noch nicht vollständig verstanden. Wenn Nitrit zu Nahrungsmitteln und Bakterienkulturen gegeben wird, kommt es zu komplexen chemischen Umwandlungen. Es ist möglich, dass Nitrit in Stoffe umgewandelt wird, die mit üblichen analytischen Methoden nicht messbar sind. Dies macht es schwierig, die Umsetzung von Nitrit und anderen NO-haltigen Substanzen zu verfolgen und die Gründe für ihre bakteriostatische Wirkung zu bestimmen [CAMMACK et al., 1999].

Obwohl Nitrit in der Lage ist, dem Wachstum zahlreicher verschiedener Spezies von Bakterien entgegenzuwirken, ist es besonders effektiv bei der Inhibition der Spezies *Clostridium* und deshalb unentbehrlich zur Vermeidung der Vermehrung von *C. botulinum* in anaerob abgepackten oder in Konservendosen befindlichen Fleischerzeugnissen. Insbesondere das Wachstum der ausgekeimten Sporen wird durch das Nitrit unterdrückt. Es wurde herausgefunden, dass die inhibitorische Wirkung pH-Wert abhängig ist. Dies führte zu der Vermutung, dass nicht Nitrit, sondern die salpetrige Säure (HNO_2) die eigentlich aktive Substanz ist. Schon in den sechziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts fand man heraus, dass nicht die salpetrige Säure, sondern Stickstoffmonoxid (NO) die eigentliche aktive Komponente ist. Es wird angenommen, dass 80–150 mg $\text{NaNO}_2 \text{ kg}^{-1}$ Fleischprodukt erforderlich sind, um das Wachstum pathogener Mikroorganismen wirksam zu unterdrücken [GREVER et al., 2001].

2.1.1 Hemmung des Bakterienwachstums durch Stickstoffmonoxid (NO)

Erklärungsansätze für die antimikrobielle Wirkung des Nitrits beziehungsweise dessen Reaktionsprodukt Stickstoffmonoxid sind:

- Erhitzen von Nitrit in einem bakteriologischen Kulturmedium, welchem reduzierende Substanzen wie Ascorbinsäure, Cystein oder ein Protein-Hydrolysat zugesetzt werden muss, führt zu verschiedenen Reaktionsprodukten, die für die Bakterien teilweise toxischer sind, als das Nitrit selbst. Dies wird auch als Perigo-Effekt bezeichnet [CAMMACK et al., 1999].
- Die Wirkung von Nitrit und Stickstoffmonoxid wird durch Kochsalz und den pH-Wert unterstützt. Bei einem pH-Wert von 6,0 ist die bakteriostatische Wirkung stärker als bei einem pH-Wert von 7,0.
- In Kombination mit Hitze werden die Sporen oder die vegetativen Zellen von *C. botulinum* beim Herstellungsprozess von Fleischerzeugnissen inaktiviert.
- Die Sporen sind in Gegenwart von Pökelfstoffen sensibler gegen Hitze und werden inaktiviert.

Verschiedene Theorien wurden entwickelt, um zu erklären, wie Stickstoffmonoxid (NO) das allgemeine Bakterienwachstum und speziell von *Clostridium subspecies* hemmt. Häufig wird angenommen, dass Eisen hierbei eine entscheidende Rolle spielt:

- In Modellsystemen wurde nachgewiesen, dass in Pökelfwaren schwefelhaltige Eisen-(II)-NO-Komplexe gebildet werden, welche zur Bildung von Substanzen führen, die Clostridien hemmen [GREVER et al., 2001]. Als verantwortliche Verbindungen kommen Eisen-Schwefel-Nitrosyl-Komplexe in Betracht, die Roussinschen Salze, welche schon in mikromolaren Konzentrationen einen hemmenden Effekt auf Bakterien haben [CAMMACK et al., 1999]. Eisen-Nitrosyl-Komplexe wurden in vegetativen Zellen von *C. botulinum* nachgewiesen, die mit Nitrit in Anwesenheit von Ascorbat behandelt wurden. Es wurde erklärt, dass wahrscheinlich das Wachstum von *C. botulinum* durch Deaktivierung der Eisen-Schwefel-Enzyme, speziell Ferredoxin, gehemmt wird [GREVER et al., 2001].

- Es wurde festgestellt, dass die Zugabe reduzierender Substanzen wie Ascorbat, Isoascorbat, Cystein oder Komplexbildner wie EDTA die Wirkung von Nitrit steigert. Diese Stoffe zeigen ohne Nitrit keine inhibitorische Wirkung. Als effektive Inhibitoren wurden die Reaktionsprodukte gefunden, welche beim Erhitzen von Mischungen aus Nitrit, Cystein und Eisenionen entstehen.
- Die Verfügbarkeit von Eisen wird direkt durch Nitrit beeinflusst. In Fleischproben mit einer hohen Myoglobinkonzentration war die hemmende Wirkung geringer als in Proben mit niedrigen Myoglobinkonzentrationen. Die Autoren zeigten, dass eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen verfügbarem Eisen und der Wirkung von Nitrit gegen *C. botulinum* besteht [TOMPKIN et. al, 1979].

2.1.2 Molekulare Mechanismen des Nitrits zur Hemmung von anaeroben Bakterien

Folgende Stoffwechselprozesse von *C. botulinum* werden von Nitrit und seinen Reaktionsprodukten angegriffen:

- Eisen-Schwefel-Proteine sind wichtig für den Energiestoffwechsel von aeroben und anaeroben Bakterien. Die bakteriostatische Wirkung von Nitrit, Stickstoffmonoxid und verwandten Bestandteilen beruht wahrscheinlich auf deren Reaktion mit den Eisen-Schwefel-Proteinen der Bakterien zu Eisen-Schwefel-Nitrosyl-Verbindungen. Diese können keine Redoxprozesse vermitteln, was zu einer Hemmung der Atmungskette und der ATP Gewinnung führt;
- Bildung von Nitrosothiolen, welche stoffwechselrelevante Enzyme hemmen,
- Reaktion von Nitrit und Nitrosylkomplexen mit Zellwandbestandteilen der Bakterien mit der Folge einer Beeinträchtigung ihrer Funktion über eine Schädigung bis hin zu einer Auflösung der Bakterienzellwand [CAMMACK et al., 1999].

2.2 Umrötung

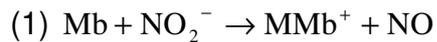
Die Proteine des Muskels lassen sich in drei große Gruppen aufteilen:

- Proteine des kontraktiven Apparates (Myosin, Actin),
- Lösliche Proteine (Myoglobin, Enzyme),
- Unlösliche Proteine (Bindegewebsproteine).

Das Myoglobin besteht aus einer Peptidkette mit einem Molekulargewicht von etwa 18000 Dalton, dem farblosen Globin und dem farbgebenden eisenhaltigen Häm. Aufgrund seiner Fähigkeit zur reversiblen Bindung von Luftsauerstoff hat Myoglobin die Funktion eines Sauerstoffspeichers im Muskel. Es hat eine etwa sechsmal höhere Affinität zum Sauerstoff als das Hämoglobin, obwohl dieses aufgrund seiner Struktur viermal soviel Sauerstoff anlagern kann. Anstelle von Sauerstoff können auch andere Liganden, wie CO, NO oder CN^- , mit einer stärkeren Affinität zum Eisen an das Myoglobin gebunden werden.

Myoglobin (Mb) hat eine purpurrote Farbe. Bei einem hohen Sauerstoffpartialdruck kommt es zur Bildung des stabilen Sauerstoffadduktes Oxymyoglobin (MbO_2), welches eine hellrote Farbe hat. Der komplex gebundene Sauerstoff schützt das Hämeisen vor Oxidation. Bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck erfolgt eine langsame und kontinuierliche Oxidation zu Metmyoglobin (MMb^+). Das im Myoglobin eingelagerte Eisen wird von Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert. Dies ist mit einem Farbumschlag von rot nach braun verbunden [BELITZ, GROSCH, 1992]. Fleisch- und Wurstprodukte von graubrauner Farbe haben beim Verbraucher eine geringe Akzeptanz. Aus diesem Grund versucht man mit der Umrötung die gewünschte hellrote Farbe zu stabilisieren.

Für den Vorgang der Umrötung spielt der hellrote Stickstoffmonoxid-Myoglobinkomplex die entscheidende Rolle. Er verleiht dem Produkt die rote Pökelfarbe. Eine Reihe experimentell gut belegter Befunde mit unterschiedlichen Ergebnissen lässt die Annahme plausibel erscheinen, dass die Umrötung nicht nach einem einzigen Mechanismus abläuft, sondern dass verschiedene Redoxsysteme des Muskels zur Bildung des Pökelfarbstoffes beitragen. Am Beginn der Reaktionskette steht die Oxidation des Myoglobins zu Metmyoglobin unter Bildung von Stickstoffmonoxid [ARNETH, 1998].



Das entstehende Stickstoffmonoxid bildet mit dem Myoglobin (Mb) und dem Metmyoglobin (MMb⁺) extrem stabile Komplexe, bestehend aus Stickstoffmonoxid-Myoglobin (Mb NO) und Stickstoffmonoxid-Metmyoglobin (MMb⁺ NO). Beide Verbindungen sind von leuchtend roter Farbe. Reduktionsmittel wie Ascorbat, Thiole oder NADH beschleunigen die Umrötung durch Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid und von Metmyoglobin (MMb⁺) zu Myoglobin (Mb) [BELITZ, GROSCH, 1992].

2.3 Aromabildung

Das charakteristische Pökelaroma kommt wahrscheinlich durch eine Reaktion des Nitrits bzw. Stickstoffmonoxids mit Fleischinhaltsstoffen zustande wie z.B. Aminosäuren und Purine. Der durch das Pökeln entstehende Geschmack und das Aroma sind unverwechselbar und bisher durch andere Methoden nicht erzielt worden. Die genauen Reaktionen sind noch nicht bekannt [FREDE, 1991]. Nach ARNETH (1998) reicht eine Nitritkonzentration von 20-40 mg/kg aus, um das Pökelaroma in Fleischerzeugnissen zu erzielen.

2.4 Antioxidans

Nitrit und sein Umsetzungsprodukt Stickstoffmonoxid schützen Fleischfette vor zu schneller Oxidation, was zu einer längeren Geschmackswerterhaltung und damit zu einer längeren Lagerfähigkeit führt.

Der Autor LÜCKE (1999) gibt als notwendige Menge für eine antioxidative Wirkung 20-50 ppm Nitrit unter Ascorbat-Zusatz und unter sauerstoffarmem Arbeiten an. Die antioxidative Wirkung des Nitrits resultiert aus mehreren Reaktionen:

- Nitrit reagiert mit den Fe²⁺-Ionen des Porphyrins und verhindert damit die Bildung von oxidationsfördernden Fe³⁺-Ionen;

2. Einsatz von Nitritpökelsalz in Fleisch und Fleischerzeugnissen

- Die Bildung von Nitrit-Myoglobin/-Hämoglobin-Komplexen vermeidet die Freisetzung von Eisenionen während der Erhitzung;
- Nitrit verbindet sich mit Lipiden und Phospholipiden der Zellmembran, was eine stabilisierende Wirkung hat;
- Stickstoffmonoxid hemmt die Aktivität von Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen, arbeitet als Elektronen-Donator und ist ein guter Fänger von freien Radikalen. Ungesättigte Lipide werden gegenüber einer Peroxidbildung stabilisiert [SAMMET, 2004].

3 Lebensmittelrechtliche Bewertung

Die zulässigen Höchstmengen von Kaliumnitrit (E 249) und Natriumnitrit (E 250) sind in der Richtlinie 95/2/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20. Februar 1995 über andere Lebensmittelzusatzstoffe als Farbstoffe und Süßungsmittel, geändert durch die Änderungsrichtlinie 2003/114/EG vom 22.12.2003, in Anhang III Teil C, wie folgt festgelegt:

Bezeichnung:	Lebensmittel:	Zugesetzte Menge (Richtwert):	Restmenge:
Kaliumnitrit (E 249) ⁽¹⁾ :	Nichthitzebehandelte gepökelte und getrocknete Fleischerzeugnisse	150 mg/kg ⁽²⁾	50 mg/kg ⁽³⁾
Natriumnitrit (E 250) ⁽¹⁾ :			100 mg/kg ⁽³⁾
			175 mg/kg ⁽³⁾
	Andere gepökelte Fleischerzeugnisse Fleischerzeugnisse in Dosen <i>Foie gras, foie gras entier, blocs de foie gras</i>	150 mg/kg ⁽²⁾	
	Gepökelter Speck		175 mg/kg ⁽³⁾

⁽¹⁾ Wenn mit „für Lebensmittel“ gekennzeichnet, darf Nitrit nur als Mischung mit Kochsalz oder -ersatz verkauft werden.

⁽²⁾ Ausgedrückt als NaNO₂

⁽³⁾ Restmenge zum Zeitpunkt der Abgabe an den Endverbraucher, ausgedrückt als NaNO₂

Tabelle 1: Zulässige Höchstmengen von Kaliumnitrit (E 249) und Natriumnitrit (E 250) in Fleischerzeugnissen

[MEYER, 2006]

Auf der Grundlage der Stellungnahme der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) vom 26. November 2003 wurde die geltende Zulassung geändert, um den Nitrosamingehalt durch Senkung der Nitrit- und Nitratmengen, die Lebensmitteln zugesetzt werden, so niedrig wie möglich zu halten und gleichzeitig die mikrobiologische Sicherheit der Lebensmittel zu gewährleisten. In ihrer Stellungnahme

kommt die EFSA zu dem Schluss, dass die analytische Bestimmung niedriger Nitritkonzentrationen im Endprodukt keine Informationen darüber gibt, ob das Produkt auch mit einer geringen Nitritkonzentration hergestellt wurde. So beschleunigen hohe Lagertemperaturen und der Zusatz von Ascorbat den Abbau von Nitrit ebenso wie der Zusatz von Ascorbat kombiniert mit einer Hitzebehandlung. Bei Fleischprodukten, die nur mit einer starken Hitzebehandlung hergestellt wurden, war das Nitrit lange nachweisbar [EFSA, 2003]. Die EFSA ist der Auffassung, dass nicht die Restmenge, sondern die zugesetzte Menge an Nitrit zur hemmenden Wirkung gegen *Clostridium botulinum* beiträgt. Aus diesem Grund wird in der aktuell gültigen Richtlinie 2006/52/EG zur Änderung der Richtlinie 95/2/EG die Höchstmenge an Natriumnitrit, die bei der Herstellung zugesetzt werden darf, festgelegt. Es gelten nur noch für bestimmte, auf traditionelle Weise hergestellte Fleischerzeugnisse Rückstandshöchstwerte.

4 Physiologische Wirkung von Nitrit und seinen Reaktionsprodukten

Nitrit wird alimentär über gepökeltes Fleisch und Fleischerzeugnisse und nur geringfügig über Gemüse und Brot aufgenommen. Nitrat wird aus Nahrungspflanzen und Nitrat belastetem Trinkwasser aufgenommen und gelangt mit dem Speisebrei in den Intestinaltrakt.

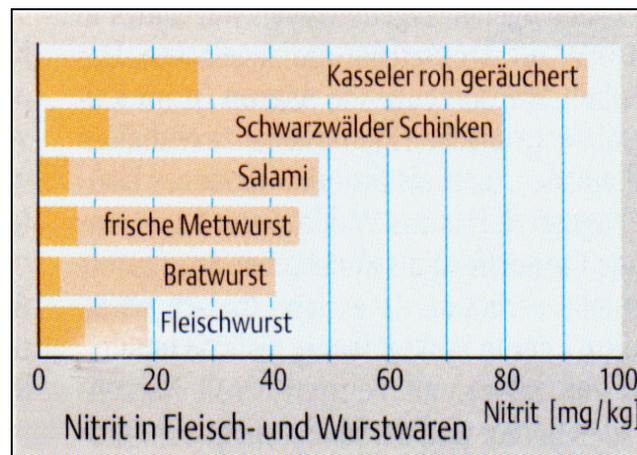


Abbildung 3: Nitrit in Fleisch- und Wurstwaren (SCHWEDT, 1999)

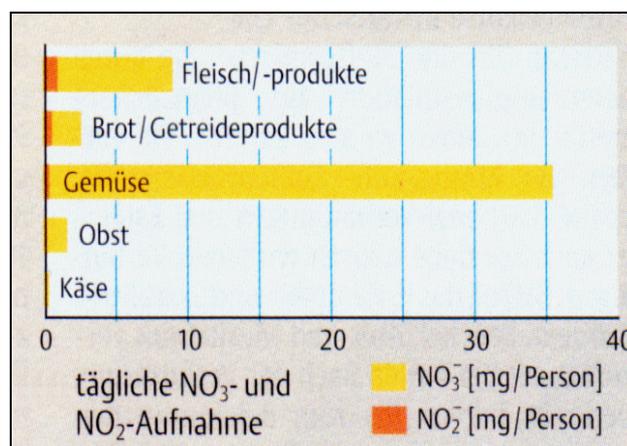


Abbildung 4: Tägliche Nitrat- und Nitritaufnahme (SCHWEDT, 1999)

Durch reduzierende Bakterien, die sich im Speichel der Mundhöhle und im oberen Darmabschnitt befinden, werden Teile des aufgenommenen Nitrats zu Nitrit reduziert. Im Dünndarm findet neben der Resorption der aufgeschlossenen Nahrungsstof-

fe auch die Eindickung des Speisebreis durch Wasserentzug statt. Hier werden Nitrit und Nitrat in das Blutgefäßsystem absorbiert. Nitrit wird im Blutkreislauf zu Nitrat oxidiert und zusammen mit dem Nitrat zum Großteil über die Niere ausgeschieden. Etwa 20-25 % des aufgenommenen Nitrats gelangt in die Speicheldrüsen und wird mit dem Speichel in die Mundhöhle sezerniert, wo ca. 20 % durch fakultativ anaerobe Bakterien auf dem Zungenrücken zu Nitrit reduziert wird. Die bakterielle Reduktion von Nitrat zu Nitrit im menschlichen Speichel ist abhängig vom pH Wert, dem Sauerstoffgehalt und dem Charakter der Bakterienflora [KELM, 1999]. Damit werden etwa 4-5 % des aufgenommenen Nitrats zu Nitrit reduziert. Das Nitrit wird verschluckt, im Intestinaltrakt leicht reabsorbiert und an das Blut abgegeben. Aus den beschriebenen Vorgängen resultiert, dass ein Teil des Nitrits im Blut und ein anderer Teil des Nitrits im Magen-Darmtrakt für weitere Reaktionen zur Verfügung steht.

4.1 Methämoglobinämie

Die Hauptfunktion der Erythrozyten ist der Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid zwischen der Lunge und dem Gewebe. Im Erythrozyten befindet sich das Hämoglobin, welches aufgrund seiner Eigenschaften diese Transportfunktion übernimmt. Das Hämoglobin-Molekül (Molekülmasse $M_r = 64500$) besteht aus je zwei α -Ketten und je zwei β -Ketten. Die prosthetische Gruppe des Hämoglobins ist das Häm, dessen zentrales Teilchen ein zweiwertiges Eisenion ist. Im Häm sind vier Koordinationsstellen des Eisens vom Porphyrin-Ring besetzt, die fünfte wird von einem Histidin Rest des Proteins besetzt und an die sechste Koordinationsstelle wird der Sauerstoff reversibel angelagert [KARLSON, 1988].

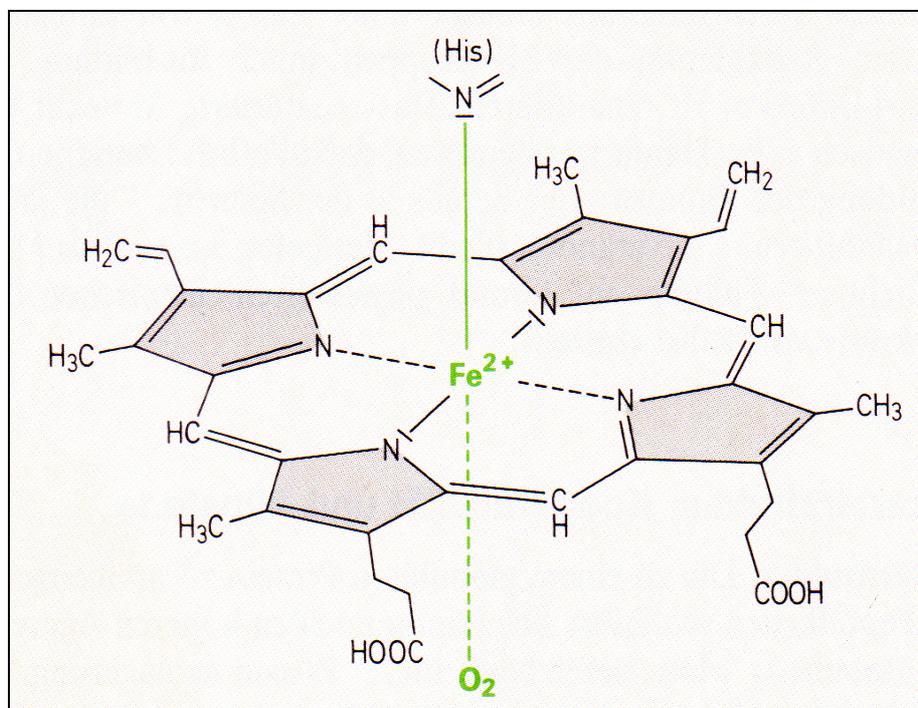


Abbildung 5: Struktur des Häms (KARLSON, 1988)

Die hydrophobe Abschirmung des Hämprotein-Komplexes durch die Proteinmatrix bewahrt das Eisen vor einem Valenzwechsel. Das Desoxyhämoglobin (Fe^{2+}) wird in der Lunge mit Sauerstoff beladen, es entsteht ein Hämoglobin-Sauerstoff-Komplex [Oxyhämoglobin ($Fe^{II}O_2$)], welcher im Gewebe zu Desoxyhämoglobin (Fe^{2+}) und molekularem Sauerstoff (O_2) dissoziiert. Der beschriebene Sauerstofftransport ist nur mit zweiwertigem Eisen (Fe^{2+}) möglich, wird das Eisen oxidiert, entsteht Methämoglobin

(Fe^{3+}), welches keinen Sauerstoff binden kann und somit nicht für den Sauerstofftransport genutzt werden kann. Die erhöhte Konzentration von Methämoglobin im Blut bezeichnet man als Methämoglobinämie. Ab einer Met-Hb-Konzentration von mehr als zehn Prozent des Gesamthämoglobins kommt es zur Zyanose (Sauerstoffmangel im Blut), sie führt zu einer Blauverfärbung der Haut und Schleimhäute.

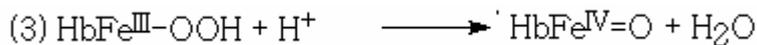
Nitrit, welches in den Blutstrom gelangt, wird von den Erythrozyten aufgenommen und reagiert mit Oxihämoglobin unter Bildung von Nitrat und Methämoglobin. Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, nach denen Nitrit in den Erythrozyten aufgenommen werden könnte. JAMES M. MAY et al. untersuchten die Aufnahme von Nitrit und dessen Metabolismus an menschlichen Erythrozyten. Hierzu wurden Erythrozyten, welche einem Hämatokrit von 20 % entsprechen, in einem Phosphatpuffer, der eine definierte Konzentration an Natriumnitrit enthielt, inkubiert. Es wurde herausgefunden, dass die Konzentration von Nitrit außerhalb des Erythrozyten abnahm, bei gleichzeitigem Anstieg der Methämoglobinkonzentration im Erythrozyten. Es zeigte sich eine Dosisabhängigkeit, die ausgesprochen temperatur- und pH-Wert empfindlich ist. Das System ist mäßig empfindlich gegenüber dem Natrium- und Phosphatgehalt. Weiterhin konnte bewiesen werden, dass die Nitritaufnahme nicht durch das in der Erythrozytenmembran lokalisierte AE1-Transportprotein erfolgt. Die Hemmung des Transportproteins zeigt keinen Einfluß auf die Nitritaufnahme oder die Bildung von Methämoglobin. Der Autor kommt nach seinen Untersuchungen zu dem Schluss, dass die Aufnahme von Nitrit nur in geringem Umfang als NO_2^- stattfindet. Die Diffusion als HNO_2 erscheint plausibler, da dessen Konzentration mit sinkendem pH Wert steigt und mit der Beobachtung einer steigenden Nitritaufnahme bei kleinerem pH Wert übereinstimmt. Ebenso wurde eine Nitritaufnahme über einen natriumabhängigen Phosphattransport Mechanismus angenommen. Ungeschädigte Erythrozyten enthalten das Enzym Methämoglobin-Reduktase, dieses reduziert dreiwertiges Eisen zu zweiwertigem Eisen, welches wieder Sauerstoff binden kann [MAY et al., 2000].

In Gegenwart von Sauerstoff und unter physiologischen Bedingungen verläuft die Methämoglobinbildung durch Nitrit sehr viel komplexer und lässt sich wie folgt zusammenfassen:

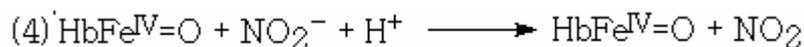
Oxyhämoglobin reagiert mit Nitrit unter Bildung eines intermediären Methämoglobin-Hydroperoxid-Komplexes:



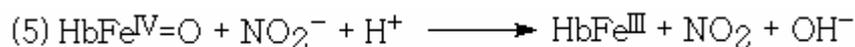
Dieser Komplex ist instabil und zerfällt entweder in Methämoglobin und Wasserstoffperoxid (2) oder lagert sich um, wobei der Sauerstoff Elektronen sowohl vom Hämeisen als auch vom Globinanteil aufnimmt (3) und eine Ferrylhämoglobin-Radikalspezies entsteht:



Diese Ferrylhämoglobin-Radikalspezies kann durch ein anderes Nitritmolekül reduziert werden, wobei die nichtradikalische Ferrylspezies gebildet wird (4):



Die nichtradikalische Ferrylspezies wird durch ein weiteres Nitritmolekül zu Methämoglobin reduziert (5):



[MARQUARDT, SCHÄFER, 2004]

4.2 Endogene Bildung von Stickstoffmonoxid

Für die toxikologische Bewertung von Nitritpökelsalz ist zu berücksichtigen, dass neben dem exogen aufgenommenen Nitrat und Nitrit auch der menschliche Körper Stickstoffmonoxid bilden kann, welches durch schrittweise Oxidation in Nitrit oder Nitrat überführt wird. Die endogene Bildung von Nitrat, dem im Urin nachweisbaren Metaboliten von Stickstoffmonoxid, wurde durch Messung der Nettoausscheidung von Nitrat nachgewiesen. Tannenbaum und seine Arbeitsgruppe haben normalen und keimfreien Ratten markierten $^{15}\text{NH}_3$ Stickstoff verabreicht. Die Nettoausscheidung von Nitrat beziehungsweise Stickstoff war größer als die verabreichte Menge. Dies widerlegte die Annahme, dass überschüssiges Nitrat aus bakterieller Synthese der Darmflora stammt, da das Phänomen auch bei den keimfreien Ratten auftrat. Bilanzierungsstudien mit markiertem Nitrat $^{15}\text{NO}_3^-$ zeigten, dass die endogene Biosynthese von Nitrat die Ursache für den Nitratüberschuss im Urin ist. Untersuchungen zeigten, dass 50 % des aufgenommenen Nitrats im Urin wiedergefunden werden [KELM, 1999].

Die Bildung von Stickstoffmonoxid wird durch die sogenannten NO-Synthasen katalysiert. Aus einem Molekül L-Arginin wird durch enzymatische 5-Elektronen-Oxidation über N-Hydroxy-L-Arginin je ein Molekül NO und L-Citrullin gebildet.

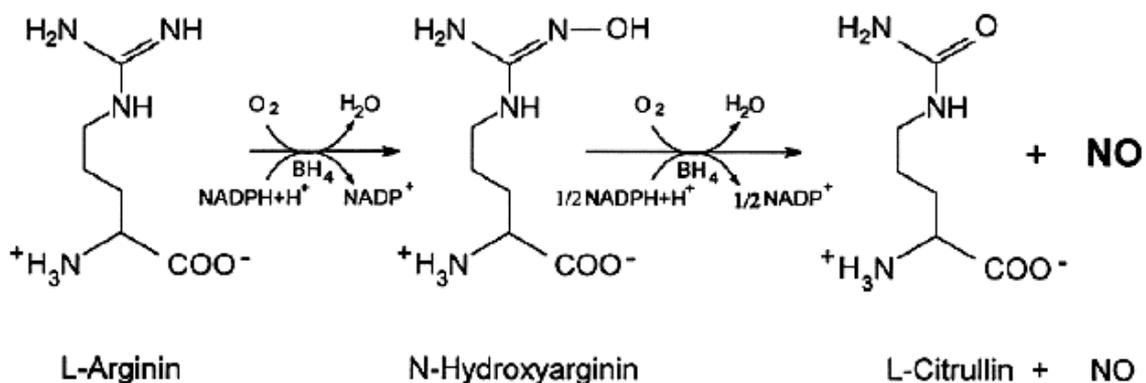


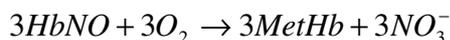
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Biosynthese von NO. Die Aminosäure L-Arginin wird zu L-Citrullin und NO umgesetzt. Diese Reaktion wird von der NO-Synthase katalysiert. Als Kofaktoren sind Tetrahydrobiopterin (BH_4) und NADPH an der Reaktion beteiligt. Der Stickstoff des L-Arginins wird zu NO oxidiert und gibt dabei fünf Elektronen ab. Sauerstoff wird reduziert und nimmt insgesamt acht Elektronen auf. Die drei fehlenden Elektronen werden durch Oxidation von $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ zu NADP^+ erhalten.

Bei Säugetieren unterscheidet man drei verschiedene Isoenzyme NO-Synthasen I, -II, -III. NOS-I, auch nNOS genannt, wird im zentralen Nervensystem gebildet, wo NO an der Neurotransmission beteiligt ist. NOS-II, auch iNOS genannt, ist durch Entzündungsfaktoren, wie zum Beispiel Interleukine oder bakterielle Toxine, induzierbar. NOS III, auch eNOS genannt, wird im Endothel und Epithel von Säugetierzellen exprimiert. Im Endothel des Blutgefäßsystems wird durch NO die Gefäßrelaxation und die Hemmung der Thrombozytenaggregation und in der Lunge die Bronchodilatation gesteuert. Dies wird in der Humanmedizin durch Verwendung von NO-freisetzende Pharmaka, wie Glyceroltrinitrat oder Nitroprussid-Natrium schon seit etwa einem Jahrhundert in der Therapie von Herz-Kreislaufkrankungen genutzt [PHOA, 2002].

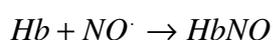
4.2.1 Metabolismus von Stickstoffmonoxid im Erythrozyten

Das im Endothel des Blutgefäßsystem gebildete Stickstoffmonoxid wird in den Blutkreislauf abgegeben. Im Erythrozyten sind die folgenden Reaktionen von Stickstoffmonoxid mit Hämoglobin möglich:

Stickstoffmonoxid wird an die Hämgruppe gebunden und bildet so aus Oxyhämoglobin (HbO_2) Nitrosylhämoglobin ($HbNO$). Dies geschieht mit einer sehr hohen Affinität, sie ist ca. 150 mal höher als für Kohlenmonoxid. Im nächsten Schritt wird in Anwesenheit von Sauerstoff das Nitrosylhämoglobin zu Methämoglobin oxidiert, dabei entstehen Nitrat- und Nitritionen.



Aus Desoxyhämoglobin (Hb) und NO kann Nitrosylhämoglobin ($HbNO$) gebildet werden.



Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) bildet neben dem Stickstoffmonoxid ($NO\cdot$) auch das Superoxidanion (O_2^-), welches, unter der Voraussetzung, dass $NO\cdot$ und O_2^- in gleichem Verhältnis gebildet werden, zu Peroxinitrit reagiert. Im sauren Medium bildet sich peroxosalpetrige Säure, welche zu Nitrat umgesetzt wird.

Bei den bisher beschriebenen Vorgängen wurden Erythrozyten überwiegend als Stickstoffmonoxid-abbauende Blutbestandteile betrachtet. Im Mittelpunkt stand die Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Oxyhämoglobin unter der Bildung von Methämoglobin und Nitrat. Weiterhin können Erythrozyten Stickstoffmonoxid speichern, transportieren und wieder abgeben. Wie für das sauerstoffarme Blut der Vene beschrieben, kann ein Teil des Stickstoffmonoxids mit dem Eisen der Hämgruppe des Deoxyhämoglobins (Hb) Nitrosylhämoglobin bilden.

Ebenso kann Stickstoffmonoxid durch Bindung an das Cystein der β -Hämoglobinkette (Hb- β Cys-SH) durch eine Transnitrosierung S-Nitrosohämoglobin (Hb- β Cys-SNO) bilden. Das im Hämoglobin enthaltene zweiwertige Eisen steht wie üblich zum Sauerstofftransport zur Verfügung. Hämoglobin kommt in zwei verschiedenen Strukturen einer R-Form (mit hoher O_2 Affinität) und einer T-Form (mit niedriger O_2 Affinität) vor. Die R-Form bedingt die Anlagerung von Stickstoffmonoxid an das Cystein, während die T-Form eine Freisetzung des gebundenen Stickstoffmonoxids begünstigt. Nach dieser Hypothese führt die Oxygenierung in der Lunge zu einer Bindung von Stickstoffmonoxid, während die Sauerstoffabgabe in der Peripherie eine Freisetzung des Stickstoffmonoxids und damit eine lokale Vasodilatation bewirkt. Dagegen begünstigt Oxyhämoglobin durch seine R-Form das Abfangen von Stickstoffmonoxid und führt damit zur Vasokonstriktion [VOLKMER, 2006].

4.2.2 Metabolismus von Stickstoffmonoxid im Plasma

Der Metabolismus von Stickstoffmonoxid und seinen Stickoxiden im Plasma unterscheidet sich von dem in den roten Blutkörperchen. Wenn menschliches Plasma Stickstoffmonoxid oder Stickstoffdioxid ausgesetzt wird, kommt es zu einem schnellen Abbau von Antioxidantien wie Ascorbinsäure, Harnsäure und schwefelhaltigen

Proteinverbindungen. Die weite Verbreitung und Reaktivität von Thiolen (Merkaptanen) unter anderen biologischen Nucleophilen erklärt die Neigung zur Bildung von S-nitrosothiolen (RSNO). Thiole reagieren in Gegenwart des Nitrosylkations, welches durch Oxidation aus Stickstoffmonoxid entstanden ist, unter Bildung von S-nitrosothiolen (RSNO). Letztere sind eine Lagerform für Stickstoffmonoxid. Anschließend werden S-nitrosothiole (RSNO) homolytisch oder heterolytisch gespalten. Mögliche Abbauprodukte sind Stickstoffmonoxid, Nitrosylkation und Nitroxylatanion. Im Plasma werden diese vollständig zu Nitrit oxidiert, welches dort für einige Stunden stabil ist [KELM, 1999]. Eine weitere Umsetzung zu Nitrat ist möglich.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der Metabolismus von Stickstoffmonoxid im Plasma auf der Stufe des Nitrits stehen bleibt, eine Oxidation zu Nitrat ist möglich. Im Vollblut hingegen wird Stickstoffmonoxid zu Nitrit und anschließend schnell weiter zu Nitrat umgewandelt. Dies wurde auch durch einen Versuch bestätigt, bei dem 5 μM Nitrit zu menschlichem Blut gegeben wurde. In etwa 10 Minuten war das Nitrit vollständig in Nitrat umgewandelt [KELM, 1999].

Aufgrund der Umwandlung von Stickstoffmonoxid und Nitrit zu Nitrat stellt dieses das Stoffwechselendprodukt von Stickstoffmonoxid im menschlichen Urin dar. Nitrat wird in der Glomerula der Niere filtriert und im proximalen Tubulus rückresorbiert. Die Konzentration von Nitrat im Urin liegt im Bereich von 250-2000 μM , wobei Nitrit und Stickstoffmonoxid beim gesunden Menschen nicht detektierbar sind. Der im Urin gemessene Nitratgehalt wird durch zahlreiche NO-Synthasen unabhängige Faktoren wie die Aufnahme von Nitrat und Nitrit durch Nahrungsmittel, die Bildung von Nitrit im Speichel, die bakterielle Bildung von Nitrat im Darm, die Denitrifizierung durch Leberenzyme, die inhalative Aufnahme von gasförmigen Stickstoffverbindungen und die Nierenfunktion beeinflusst.

4.2.3 Tägliche Bildung von Stickstoffmonoxid und dessen Abbau

Bildung und Abbau von Stickstoffmonoxid bestimmen dessen Konzentration im Körper. In Kulturen von Endothelzellen wurde gemessen, dass die durchschnittliche Produktion von Stickstoffmonoxid bei $4 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ liegt. Daraus würde sich eine Stickstoffmonoxid-Produktion von $0,8 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Endothelzellen errechnen, deren Gesamtmasse im Körper 1,5 kg beträgt. Es resultiert eine tägliche Gesamtmenge von endotheliale Stickstoffmonoxid, gebildet durch eNOS, von $1728 \text{ } \mu\text{mol Person}^{-1}$. Dieser Wert gilt nur unter der Voraussetzung, dass die in vitro Daten auf die in vivo Situation extrapoliert werden können und dass iNOS (durch Entzündungen induzierbar) keine signifikanten Mengen Stickstoffmonoxid produziert. Der Wert von $1728 \text{ } \mu\text{mol NO pro Person}$ liegt im Bereich von anderen Daten, die von einer Nitrat-Netto-Synthese im Bereich von 1200 bis 2200 $\mu\text{mol pro Person und Tag}$ (entspricht 580 bis 1065 $\mu\text{mol NO pro Person und Tag}$) berichten.

Die tägliche Stickstoffmonoxidbildung sollte nur mit großer Vorsicht aus dem Stoffwechselprodukt Nitrat abgeschätzt werden. Die folgenden Faktoren beeinflussen die ausgeschiedene Nitratkonzentration:

- 50 % des im Körper zirkulierenden Nitrats stammt aus der Nahrung.
- Große intraindividuale und interindividuale Varianzen der Nitratwerte und der Ausscheidung wird durch die Tatsache deutlich, dass die tägliche Aufnahme zwischen 75 und 150 mmol liegt, während die Ausscheidung die Aufnahme um den Faktor 2-60 überschreitet [KELM, 1999].

Mochizuki et al. untersuchten den Einfluss der Ernährung auf den Plasmanitrat Spiegel und bestimmten die grundlegende Stickstoffmonoxid-Produktionsrate beim Menschen. Hierzu wurden die Plasmanitratkonzentrationen von zwei Personengruppen, die aus sieben und neun jungen gesunden Personen bestanden, untersucht. In der ersten Gruppe haben alle Teilnehmer sieben Tage die gleiche nitratarme Nahrung erhalten, während die Teilnehmer der zweiten Gruppe keine spezielle Nahrung zu sich genommen haben. Nach sieben Tagen Präkonditionierung der ersten Gruppe wurden die Plasmanitratkonzentrationen in zweistündigen Abständen untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Nitratkonzentration im Plasma durch jede Mahlzeit signi-

fikant beeinflusst wird, speziell durch das Frühstück. Weiterhin ist aufgefallen, dass es am Tag identische Zeitverläufe des Nitratspiegels bei gleichen Mahlzeiten, die zum gleichen Zeitpunkt eingenommen werden, gibt. Am zehnten Tag konnte auch die erste Gruppe ihre Nahrungsmittel frei wählen. Es zeigten sich starke Abweichungen unter den Teilnehmern. In Vorstudien stellte sich heraus, dass sich nach zehn- bis sechzehnständigem Fasten eine konstante Plasmanitratkonzentration von $18,0 \pm 0,8 \mu\text{mol/l}$ einstellt. Dies wurde durch die Werte der ersten Gruppe bestätigt, da zwischen der letzten und der ersten Nahrungsaufnahme des folgenden Tages ebenfalls 14 Stunden lagen (Plasmanitratkonzentration von $18,5 \pm 0,7 \mu\text{mol/l}$). Von der Plasmanitratkonzentration wurde über ein Modell zur Betrachtung der systemischen Stickstoffmonoxid-Kinetik auf die Stickstoffmonoxid-Produktionsrate geschlossen. Nach vierzehnstündigem Fasten kam man bei der ersten Gruppe (nitratarme Nahrung) auf eine Stickstoffmonoxid-Produktionsrate von $630 \pm 37 \text{ nmol/min}$, bei der zweiten Gruppe (freie Nahrungsaufnahme) auf $597 \pm 45 \text{ nmol/min}$. Die Untersuchungen von Mochizuki et al. lieferten ähnliche Ergebnisse wie andere Studien, bei denen über den Gehalt an Nitrat im Urin auf die Produktionsrate von Stickstoffmonoxid geschlossen wurde. Daher kann man von einer körpereigenen Stickstoffmonoxid-Produktion von 400-700 nmol/min bei gesunden Menschen ausgehen [MOCHZUKI, 2000].

4.3 Nitrosamine

Das eigentliche Problem liegt nicht in der akuten Toxizität des Nitrits, sondern vielmehr in der Bildung von kanzerogenen N-Nitrosoverbindungen. Diese Reaktion kann sowohl exogen erfolgen (Verbrennungsprozesse - im Tabakrauch -, Erhitzungsprozesse, Fermentationsprozesse) als auch endogen im sauren Milieu des Magens aus Nitrit oder durch Stickstoffmonoxid, einem wichtigen zellulären Botenstoff, der durch NO Synthetasen gebildet wird [MARQUARDT, SCHÄFER, 2004]. Das direkt aufgenommene oder durch bakterielle Umwandlung von Nitrat entstandene Nitrit kann im wässrig sauren Milieu des Magensaftes mit dem Amin über eine Diazotierung zu einem Nitrosamin reagieren.

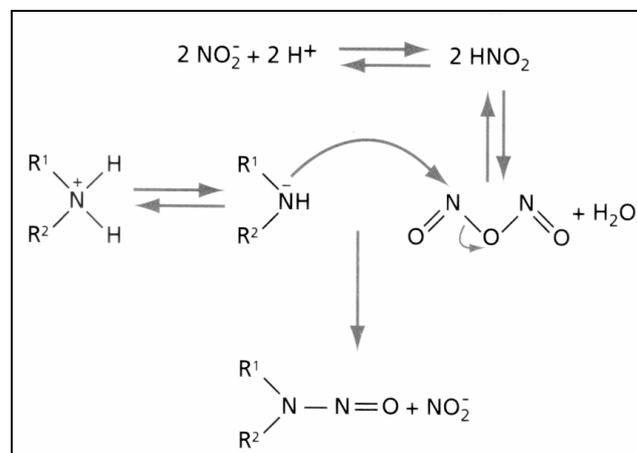


Abbildung 7: Mechanismus der Nitrosierung sekundärer Amine.
(MARQUARDT, SCHÄFER, 2004)

N-Nitrosamine gehören zu den potentesten chemischen Kanzerogenen, da sie schon bei geringen Dosierungen im Tierversuch Tumoren induzieren. Entsprechend ihrer Struktur unterscheidet man zwischen symmetrischen, asymmetrischen und zyklischen Verbindungen.

4. Physiologische Wirkung von Nitrit und seinen Reaktionsprodukten

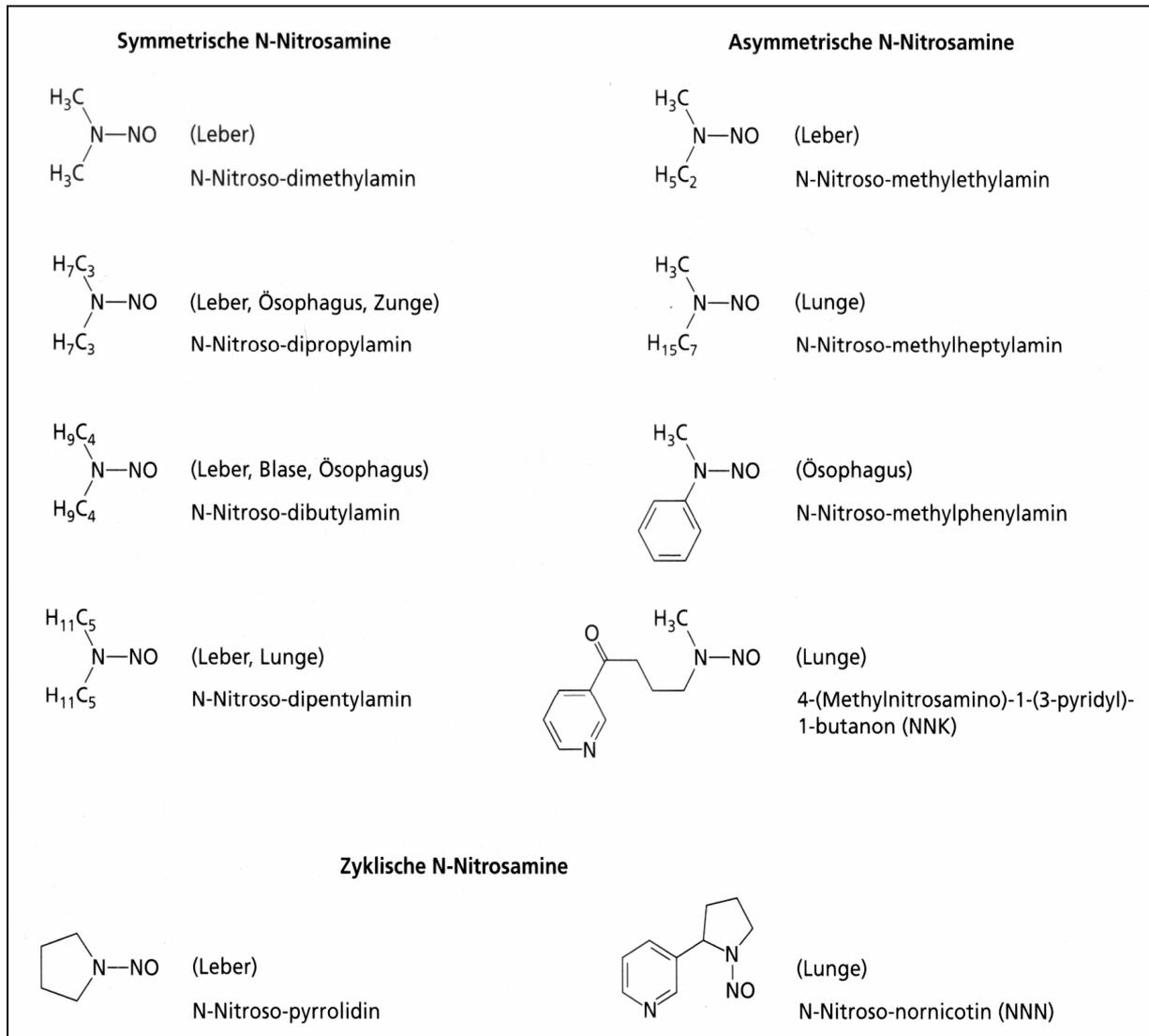


Abbildung 8: Kanzerogene N-Nitrosamine (MARQUARDT, SCHÄFER, 2004)

N-Nitrosoverbindungen zeichnen sich durch eine besonders ausgeprägte Organotropie aus. Sie induzieren Tumoren in jeder Spezies, die bisher untersucht worden ist. Die Bildung von Nitrosaminen wird in Zusammenhang mit der Genese des menschlichen Magenkrebses gebracht. Oral gegebene N-Nitrosoverbindungen induzieren im Tierversuch Magentumoren. Der Magenkrebs ist häufig in nitritreichen Regionen.

4. Physiologische Wirkung von Nitrit und seinen Reaktionsprodukten

Nitrosamine werden durch Oxidation an einem der der Aminogruppe benachbarten C-Atom metabolisch aktiviert. Durch die enzymatische C-Hydroxylierung in der α -Position und die spontane Abspaltung von N_2 mittels Cytochrom P450 2E1, welches in der Leber und im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen wurde, entstehen reaktive elektrophile Metaboliten als ultimale Kanzerogene (Carbeniumionen) [MARQUARDT, SCHÄFER, 2004].

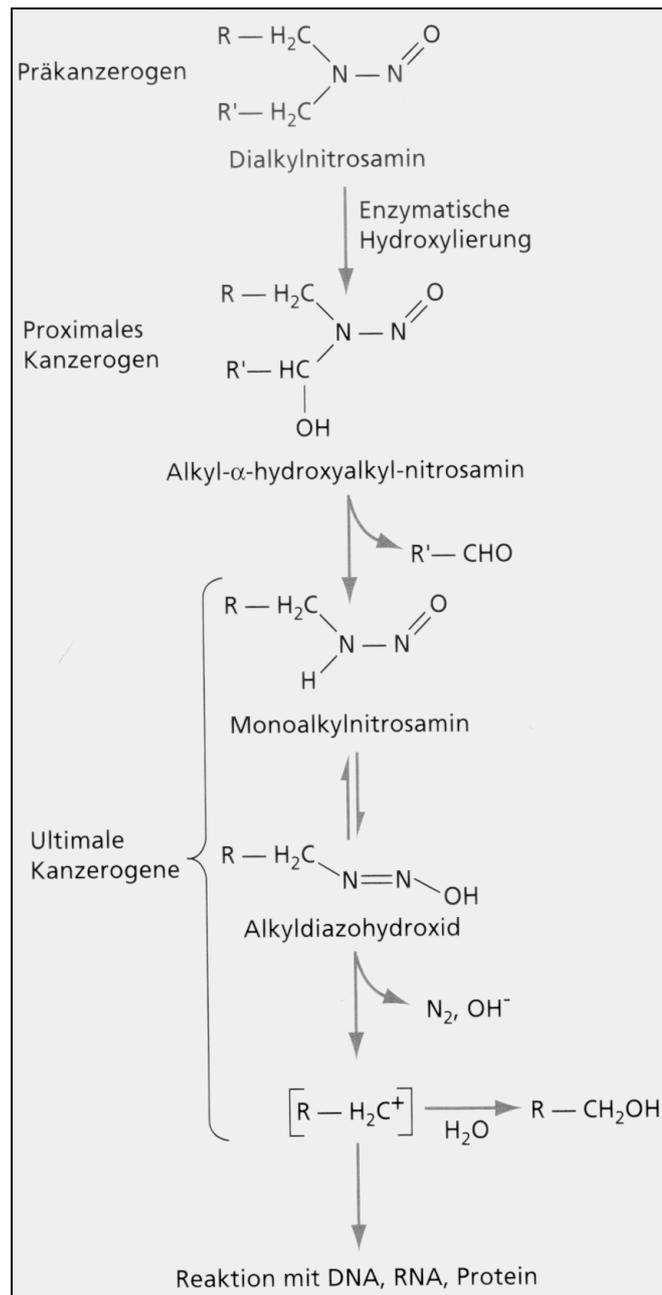


Abbildung 9: Biotransformation von N-Nitrosodialkylaminen (MARQUARDT, SCHÄFER, 2004)

4.3.1 Epidemiologische Studien über die Entstehung von Magen- und Speiseröhrenkrebs

Der Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Nitrit und Nitrosaminen und der Entstehung von Magenkrebs wurde durch epidemiologische Studien ebenso untersucht, wie die Entstehung von Magen- und Speiseröhrenkrebs beim Verzehr von Fleisch und Fleischprodukten. Jakszyn et al. bewerteten alle veröffentlichten Kohorten- und Fall-Kontroll Studien zwischen 1985 und 2005 und untersuchten den Zusammenhang zwischen Nitrosamin- und Nitritaufnahme bezogen auf die wichtigsten verzehrten Lebensmittel (Fleisch und Fleischprodukte, Gemüsekonserven und Fisch, geräucherte Nahrungsmittel und Bier) und der damit verbundenen Gefahr an Speiseröhren- oder Magenkrebs zu erkranken [JAKSZYN et al., 2006]. Die Menschen sind zahlreichen N-nitrosoverbindungen durch die Ernährung, das Rauchen und am Arbeitsplatz ausgesetzt. Je nach dem Entstehungsort unterscheidet man zwischen exogenen Nitrosaminen, die dem Körper von außen zugeführt werden und endogenen Nitrosaminen. Exogene Expositionsquellen für Nitrosamine sind die Lebensmittel, das Rauchen und die gegebenenfalls der Arbeitsplatz. In Lebensmitteln entstehen Nitrosamine durch die Verarbeitung und Zubereitung. Beispielhaft wären verarbeitetes Fleisch, Bier, in Essig eingelegtes oder getrocknetes Gemüse, geräucherter Fisch oder Fleisch, gesalzener und getrockneter Fisch oder Fleisch zu nennen. Endogene Nitrosamine werden unter anderem beim Verzehr von rotem Fleisch im menschlichen Körper gebildet. Studien an Freiwilligen zeigten, dass zwischen der Aufnahme von rotem Fleisch und der endogenen Bildung von NOC (N-Nitrosoverbindungen), die im Stuhl nachgewiesen wurden, eine konsistente Dosisabhängigkeit besteht. Der Verzehr von weißen Fleischsorten hat keinen Effekt.

Bei den epidemiologischen Studien wird zwischen der nahrungsbedingten Aufnahme von Nitrit und Nitrosaminen und der Aufnahme von Nahrungsmitteln, welche exogene und endogene Nitrosamine enthalten, unterschieden. In Studien über die nahrungsbedingte Aufnahme von Nitrit und Nitrosaminen wird nur eine substanzbezogene Betrachtung der möglichen Effekte von Nitrit und Nitrosaminen, ohne Berücksichtigung des gesamten Nahrungsmittels, vorgenommen. Auswirkungen, die von dem Nahrungsmittel als Ganzes ausgehen, werden bei den Studien über die Aufnahme von Nahrungsmitteln, die exogene und endogene Nitrosamine enthalten, berücksichtigt.

Nahrungsbedingte Aufnahme von Nitrit und Nitrosaminen:

Zwei veröffentlichte Kohortenstudien zeigten keine signifikante Assoziation zwischen der Entstehung von Magenkrebs und der Aufnahme von Nitrit und Nitrosaminen über die Nahrung.

Von sieben Fall-Kontroll-Studien über den Zusammenhang zwischen Magenkrebs und Nitrit zeigten fünf eine positive Assoziation und drei erreichten eine statistische Signifikanz.

Von fünf Fall-Kontroll-Studien hinsichtlich der Aufnahme von Nitrosaminen und Magenkrebs zeigten vier eine positive Assoziation, welche in drei Fällen statistisch signifikant war.

Aufnahme von Nahrungsmitteln, die exogene und endogene Nitrosamine enthalten:

Drei Kohortenstudien über das Magenkrebsrisiko in Zusammenhang mit dem Verzehr von rotem Fleisch standen zur Verfügung. Eine positive und statistisch signifikante Assoziation wurde in einer großen Studie mit Schweinefleisch beobachtet. Die anderen beiden Studien zeigten keine Assoziation mit Magenkrebs. Sechs Kohortenstudien berichteten über den Zusammenhang zwischen Verzehr von verarbeiteten Fleischerzeugnissen und der Entstehung von Magenkrebs, jedoch waren nur zwei statistisch signifikant.

Es konnten 16 Fall-Kontroll-Studien mit Informationen über das Vorkommen von Magenkrebs in Verbindung mit dem Verzehr unterschiedlicher Fleischsorten beziehungsweise Zubereitungsverfahren ermittelt werden. Elf der Fall-Kontroll-Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Fleisch und dem Risiko, an Magenkrebs zu erkranken, Signifikanz zeigten zwei Studien.

14 Veröffentlichungen beschäftigten sich mit Fall-Kontroll-Studien über den Verzehr von verarbeitetem Fleisch beziehungsweise Fleischerzeugnissen, zwölf davon zeigten eine positive Assoziation mit Magenkrebs und vier wiesen eine statistische Signifikanz auf.

Es wurden 18 Fall-Kontroll-Studien gefunden, die Ergebnisse über Speiseröhrenkrebs und den Verzehr von verschiedenen Fleischsorten publizierten. Elf Studien zeigten eine positive Assoziation, in sechs Fällen konnte eine statistische Signifikanz

nachgewiesen werden. Bei verarbeitetem Fleisch beschrieben acht von neun Fall-Kontroll-Studien einen Zusammenhang mit der Entstehung von Speiseröhrenkrebs, welche in fünf Fällen eine statistische Signifikanz aufwiesen. [JAKSZYN et al., 2006]

Zusammenfassend ist festzustellen, dass aus einigen Fall-Kontroll-Studien hervorgeht, dass ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von Magenkrebs und der Aufnahme von Nitrit und Nitrosaminen besteht. Weiterhin wurde in einigen Kohortenstudien und in einer größeren Anzahl an Fall-Kontroll-Studien ein positiver Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Fleisch und der Entstehung von Magen- und Speiseröhrenkrebs berichtet. Vor diesem Hintergrund ist zu beachten, dass Fleisch ein Substrat zur Bildung von endogenen N-nitrosamin-Verbindungen ist. Ebenso ist Fleisch eine Quelle anderer kanzerogener Bestandteile wie heterocyclische Amine und polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, welche bei der Zubereitung entstehen. Eine relativ große Anzahl von Fall-Kontroll-Studien zeigt eine Verbindung zwischen dem Verzehr von verarbeitetem Fleisch und dem Risiko, an Magen- oder Speiseröhrenkrebs zu erkranken. Einige Fälle waren statistisch signifikant, insbesondere bei Speiseröhrenkrebs. Obwohl die Anzahl der Studien zu klein ist, um zu einem endgültigen Schluss zu kommen, wird ein Zusammenhang zwischen dem Verzehr von geräucherten Lebensmitteln und Magenkrebs angenommen. Insgesamt sind solche Kohortenstudien und Fall Kontroll-Studien mit zahlreichen Unsicherheiten behaftet. Die Anzahl der veröffentlichten Ergebnisse über die Nitrit- oder Nitrosaminaufnahme in Verbindung mit der Entstehung von Magen- und Speiseröhrenkrebs ist gering. Dies könnte mit dem Fehlen von Informationen über den NOC-Gehalt (Gehalt an N-Nitrosoverbindungen) in den verzehrten Nahrungsmitteln in Zusammenhang stehen. Die nahrungsbedingte Exposition mit NOC und ihren Vorstufen wurde indirekt über die Nahrungsmittel abgeschätzt. Die von den Teilnehmern ausgefüllten Fragebögen erfassen nicht detailliert alle Konservierungs- und Zubereitungsmethoden von allen nahrungsbedingten Nitrosaminquellen. Keine der Studien hat sich mit der endogenen Bildung von NOC im menschlichen Organismus beschäftigt. Es wurde berichtet, dass die endogene Synthese von NOC zwischen 45 %-75 % der gesamten menschlichen Exposition ausmachen kann. Neuere Studien an Menschen zeigten, dass endogen gebildetes NOC bis zu dreißigfach höher als die nahrungsbedingte Exposition sein kann. Damit wurde mit den vorliegenden Studien nur ein kleiner Teil der menschlichen Exposition berücksichtigt und ihr Effekt unterbewertet.

Zahlreiche Faktoren können die Wirkung von NOC verändern, hierzu gehören die Aufnahme von Vitamin C oder das Rauchen. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass Nahrungsmittel wie verarbeitetes Fleisch und getrockneter, gesalzener Fisch viel Salz enthalten. Dieses begünstigt Entzündungsprozesse, welche die schützende Magenschleimhaut schädigen und damit das Risiko erhöht, an Magenkrebs zu erkranken.

4.3.2 N-Nitrosoverbindungen im Gastrointestinaltrakt von Ratten und Mäusen

Sidney et. al untersuchten N-Nitrosoverbindungen im Gastrointestinaltrakt von Ratten und im Kot von Mäusen. Die Untersuchung der Konzentration von N-Nitrosoverbindungen (NOC) und deren Vorstufen, sekundären Aminen und N-Alkylamiden im Magen-Darmtrakt von Ratten ergab eine Zunahme vom Magen bis zum letzten Abschnitt des Dickdarms. Dieses Phänomen wurde sowohl bei der Fütterung der Tiere mit normaler Nahrung für Nager, etwa 0,9 nmol NOC/g, als auch bei NOC armer Nahrung für Nager, etwa 0,14 nmol NOC/g, beobachtet. Der Anstieg an N-Nitrosoverbindungen wird durch Eindickung des Speisebreis und der damit verbundenen Anreicherung der kanzerogenen Verbindungen hervorgerufen. Die erhöhte Konzentration von N-Nitrosoverbindungen und die längere Verweildauer des Speisebreis im Dickdarm, insbesondere bei ballaststoffarmer Ernährung, kann eine Ursache für das häufigere Auftreten von Dickdarmkrebs im Vergleich zum Dünndarmkrebs sein.

Bei der Betrachtung des Gehaltes an Vorstufen von N-Nitrosoverbindungen im Magen-Darmtrakt von Ratten fällt auf, dass deren Konzentration insbesondere im Zwölffingerdarm ansteigt. Als Ursache vermutet man die Sekretion von Gallenflüssigkeit oder die Bildung von N-glycosyl-Aminosäuren, welche durch die Reaktion von Monosacchariden und Aminosäuren unter neutralen bis leicht basischen Bedingungen des Zwölffingerdarms entstehen.

Weiterhin wurde an Mäusen untersucht, welchen Einfluss der Gehalt an N-Nitrosoverbindungen und deren Vorstufen im Futter auf die Ausscheidung dieser Substanzen mit dem Kot hat. Hierzu wurden Mäuse mit Nagerfutter gefüttert, welches einen Zusatz von Hotdog-Würstchen oder Rindfleisch enthielt. Die Kontrollgruppen wurden mit Nagerfutter, welches nur eine geringe Konzentration an N-

Nitrosoverbindungen enthielt, gefüttert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Ausscheidung an N-Nitrosoverbindungen bei der mit Hotdog-Würstchen angereicherter Futtermittel gefütterter Gruppe im Mittel um den Faktor 4,2 oberhalb der Kontrollgruppe lag. Bei der mit Rindfleischzusatz gefütterter Gruppe lag die Ausscheidung an N-Nitrosoverbindungen im Mittel um den Faktor 2,5 oberhalb der Kontrollgruppe. Noch auffälliger werden die Unterschiede, wenn man die Aufnahme an N-Nitrosoverbindungen und deren Ausscheidung zwischen der Kontrollgruppe und der mit Hotdog-Würstchen-Zusatz gefütterter Gruppe vergleicht. Letztere zeigt immer eine verhältnismäßig höhere Konzentration an N-Nitrosoverbindungen im Kot. Dies kann durch die Aufkonzentrierung des Speisebreis und der endogenen Bildung von N-Nitrosoverbindungen hervorgerufen werden.

Sidney et al. führen Untersuchungen an, aus denen hervorgeht, dass es auch beim Menschen zu einer Konzentrationszunahme von N-Nitrosoverbindungen bei der Magen-Darmpassage kommt. Die Autoren verweisen auf eine Veröffentlichung des American Institute of Cancer Research, wonach rote Fleischsorten und hierbei insbesondere verarbeitete rote Fleischsorten, welche oft mit Nitrit konserviert wurden, mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Risikofaktor für Darmkrebs darstellen. Diese These wurde durch die Auswertung von 13 Studien belegt, welche zu dem Ergebnis kamen, dass sich das Risiko, an kolorektalem Krebs zu erkranken, bei täglichem Verzehr von 100 g rotem Fleisch um 12 %–17 % erhöht. Dieses Risiko erhöht sich auf durchschnittlich 49 % bei dem täglichen Verzehr von 25 g verarbeitetem Fleisch. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass es beim Braten und Grillen zur Bildung von kancerogenen heterocyclischen aromatischen Aminen und polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen kommen kann, welche zusammen mit N-Nitrosoverbindungen als mögliche Ursache von Darmkrebs durch den Verzehr von Fleisch diskutiert werden.

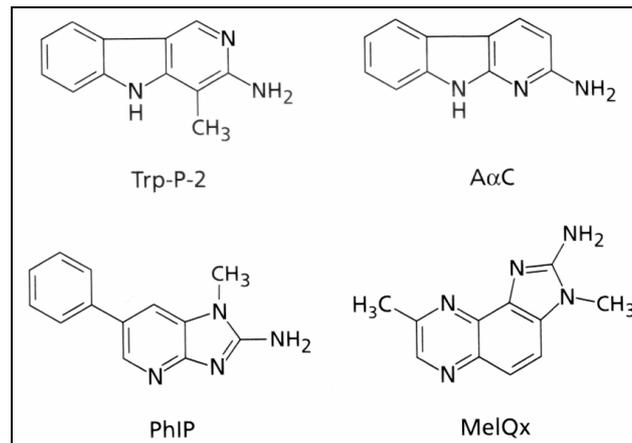


Abbildung 10: Kanzerogene heterozyklische aromatische Amine
(MARQUARDT, SCHÄFER, 2004)

Diese Stoffe entstehen beim Braten oder Grillen von Fleisch durch Maillard- und Pyrolyse-Reaktionen.

AαC: 2-Amino-9H-pyrido [2,3-b] indol

Trp-P-2: 3-Amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b] indol

PhIP: 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridin

MelQx: 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f] chinoxalin

4.3.3 Exposition des Menschen mit N-Nitrosoverbindungen

Tricker hat in seiner Bewertung über N-Nitrosamine als relevante exogene Expositionsquellen für den Mensch die Nahrung (80–120 µg/Tag), den Arbeitsplatz (20–80 µg/Tag) und das Rauchen von Zigaretten (3,4 µg/Tag) identifiziert.

Die folgenden nicht flüchtigen N-nitrosierten Aminosäuren und Aminosäurederivate (NVNA) kommen in Nahrungsmitteln quantitativ am häufigsten vor:

N-Nitrososarcosin (NSAR), N-Nitrosoprolin (NPRO), N-Nitroso-4-hydroxyprolin (NHPRO), N-Nitrosothiazolidin-4-carbonsäure (NTCA), N-Nitroso-2-methylthiazolidin-4-carbonsäure (NMTCA) und N-Nitroso-2-hydroxymethylthiazolidin-4-carbonsäure (NHMTCA). Diese Bestandteile findet man hauptsächlich in geräucherten und gepökelten Fleischerzeugnissen, in getrocknetem und geräuchertem Fisch, sowie in Meeresfrüchten und geräuchertem Käse in Konzentrationen von zehn bis zu einigen 1000 µg/kg. Gepökelte und geräucherte Fleischprodukte können nicht flüchtige-N-nitrosierte Aminosäuren und -Aminosäurederivate enthalten, welche aus Kondensa-

tionsreaktionen der Aminosäuren Serin und Threonin mit einfachen Aldehyden oder Zuckern, gefolgt von einer Nitrosierung, gebildet wurden.

Zu den am häufigsten in der Nahrung vorkommenden flüchtigen N-Nitrosaminen gehören N-Nitrosodimethylamin (NDMA), N-Nitrosopyrrolidin (NPYR), N-Nitrosopiperidin (NPIP) und N-Nitrosothiazolidin (NTHz). Diese Bestandteile können durch die Nitrosierung der entsprechenden Prekursoren oder durch Decarboxylierung von den entsprechenden nicht flüchtigen Aminosäurederivaten (NVNA) während der Hitzebehandlung von Nahrungsmitteln gebildet werden. Verzehrsstudien in verschiedenen Ländern haben ergeben, dass Bier und gepökelte Fleisch- und Fischprodukte einen wesentlichen Beitrag zur gesamten nahrungsbedingten Exposition von 0,3-1,0 µg/Tag an flüchtigen N-Nitrosaminen leisten.

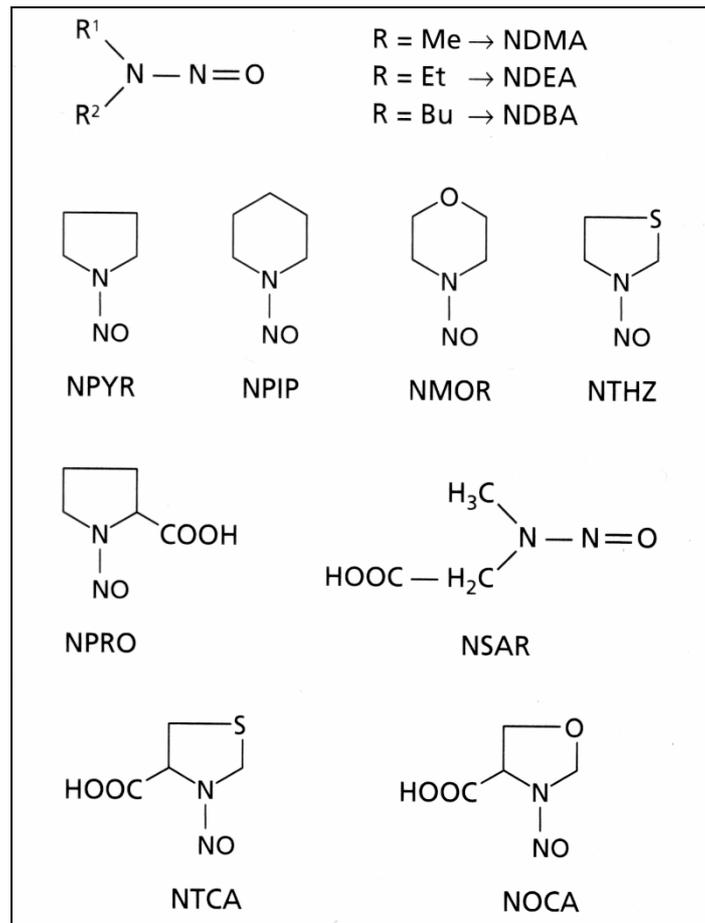


Abbildung 11: Strukturen flüchtiger und nicht-flüchtiger N-Nitrosoverbindungen in Lebensmitteln (MARQUARDT, SCHÄFER, 2004)

Flüchtige N-Nitrosamine:

NDMA: N-Nitrosodimethylamin

NDEA: N-Nitrosodiethylamin

NDBA: N-Nitrosodi-n-butylamin

NPYR: N-Nitrosopyrrolidin

NPIP: N-Nitrosopiperidin

NMOR: N-Nitrosomorpholin

NTHz: N-Nitrosothiazolidin

Nicht flüchtige N-Nitrosamine:

NPRO: N-Nitrosoprolin

NSAR: N-Nitrososarcosin

NTCA: N-Nitrosothiazolidin-4-carbonsäure

NOCA: N-Nitrosooxazolidin-4-carbonsäure

Bei der Exposition am Arbeitsplatz kam es insbesondere in der Vergangenheit in der Gummiindustrie zu sehr hohen Expositionen gegenüber flüchtigen Nitrosaminen. Diese entstehen bei der Verwendung von Vulkanisierungsbeschleunigern oder Vulkanisierungsverzögerern, welche bei dem Vulkanisierungsprozess von Gummi oder Naturlatex zugegeben werden. Weitere Industriezweige mit hohen Expositionen sind die Lederindustrie, Gießereien und die metallverarbeitende Industrie. Bei der Metallverarbeitung wurden häufig synthetische Kühlschmiermittel verwendet, die sekundäre und tertiäre Alkanolamine und Nitritsalze als Korrosionsschutzmittel enthalten. Diese reagieren mit Alkanolaminen zu Nitrosaminen.

Während der Verarbeitung von Tabak entstehen durch Nitrosierung von Nikotinalkaloiden die sogenannten tabakspezifischen N-Nitrosamine. Sie sind hauptsächlich partikelgebunden, während die flüchtigen Nitrosamine in der Gasphase vorkommen. Unter der Voraussetzung dass 70% der partikelgebundenen Nitrosamine während der oralen Inhalation in der Lunge zurückgehalten werden, beträgt die Exposition eines Rauchers von 20 Filterzigaretten am Tag 3,0 µg/Tag tabakspezifische Nitrosamine und 0,4 µg/Tag flüchtige Nitrosamine.

Kosmetika wurden in der Vergangenheit und in der Gegenwart häufig mit der Kontamination durch Nitrosamine in Verbindung gebracht. Hauptquelle von sekundären Aminen war lange Zeit die synthetisch bedingte Verunreinigung von Triethanolamin (TEA) mit Diethanolamin. Triethanolamin wird häufig als Neutralisations- und Verdickungsmittel für die Herstellung von Gelen (z. B. Haargel) verwendet. Das als Verunreinigung enthaltene Diethanolamin reagiert mit nitrosierenden Konservierungsstoffen (z.B. 5-Brom-5-nitro-1.3-dioxan und 2-Brom-2-nitro-1.3 propandiol) zu Nitrosaminen. Durch die erlassenen gesetzlichen Bestimmungen und die damit verbundenen Verwendungsbeschränkungen und Reinheitsanforderungen für nitrosierbare und nitrosierenden Inhaltsstoffen ist die Belastung durch kosmetische Produkte heute vernachlässigbar.

Es bestehen nach Tricker keine Zweifel, dass endogen aus aminhaltigen Substraten gleiche Nitrosierungsprodukte entstehen, wie bei klassischen in vitro Versuchen. Das saure Medium des Magens wird als hauptsächlicher Ort für die endogene Nitrosierung erwartet. N-Nitrosoprolin (NPRO), wird in vivo durch die Nitrosierung der Aminosäure Prolin gebildet. Nitrosothiazolidin-4-carbonsäure (NTCA), und N-Nitroso-2-methylthiazolidin-4-carbonsäure (NMTCA) werden in vivo durch die Kondensation von Cystein mit Formaldehyd oder Acetaldehyd gefolgt von einer Nitrosierung gebil-

det. Die sekundären Amine Dimethylamin, Pyrrolidin und Piperidin sind die Vorstufen von N-Nitrosodimethylamin, N-Nitrosopyrrolidin und N-Nitrosopiperidin. Bei der Betrachtung der endogenen Bildung von Stickstoffmonoxid kommt der Autor auf eine zellvermittelte Nitratproduktion beim Menschen von mehr als 1 mmol/Tag oder 1 mg/kg Körpergewicht/Tag. Intensive körperliche Aktivität und Stimulation des Immunsystems während Erkrankungen wie Durchfall und Fieber induzieren eine erhöhte Bildung von Stickstoffmonoxid. Die immunstimulierte NO-Bildung findet im Makrophagen statt. In vitro Versuche zeigten, dass stimulierte Makrophagen leicht aliphatische und heterozyklische sekundäre Amine bei physiologischem pH Wert nitrosieren. Die Zugabe von Nitrit und Aminen zu nicht stimulierten Zellen ergab nur eine geringfügige Ausbeute von N-Nitrosaminen. Neben der endogenen Bildung von Stickstoffmonoxid und der anschließenden Nitrosierung von Aminen ist die bakterielle Nitrosierung durch denitrifizierende und nicht denitrifizierende Bakterien als auch die Bildung von nitrosierenden Verbindungen nach der Inhalation von NO_x , im speziellen von Stickstoffdioxid, zu berücksichtigen.

Bei dem Biomonitoring nicht-flüchtiger N-Nitrosaminosäuren im Urin wurden hauptsächlich NSAR, NPRO, NTCA und NMTCA gefunden. Um den Einfluss der Ernährung zu ermitteln, wurden verschiedene Bevölkerungsgruppen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die NPRO Ausscheidung bei überwiegend oder vollständig vegetarisch lebenden Bevölkerungsgruppen niedriger [0,80 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ –1,37 $\mu\text{g}/\text{Tag}$] als bei Personen mit fleischhaltiger Ernährung ist [2,30 $\mu\text{g}/\text{Tag}$]. Der Verzehr von gepökelten Fleischerzeugnissen ist ebenfalls mit einer erhöhten Ausscheidung von NPRO im Urin verbunden. Über 90 % des NPRO in Fleischprodukten ist proteingebunden und analytisch erst nach vorangegangener hydrolytischer oder enzymatischer Verdauung verfügbar. Der Verzehr von solchen Fleischprodukten ist eine signifikante Quelle von NPRO, welches im Urin von Menschen und Versuchstieren vorhanden ist.

Um die Auswirkungen von Nitrat in der Nahrung zu untersuchen, wurde den Lebensmitteln Nitrat [217 mg/Tag] zugesetzt. Dies führte zu einer fünf- bis sechsfachen Erhöhung der NPRO- und NTCA- Ausscheidung. Höhere Konzentrationen [600 mg/Tag] steigern die Ausscheidung von NSAR, NPRO, NTCA, NMTCA, NHPRO und die nicht-flüchtigen N-Nitrosaminosäuren über den Urin signifikant [15,4 \pm 5,9 versus 159,8 \pm 84,6 $\mu\text{g}/\text{Tag}$].

Zum Vergleich ergab das Biomonitoring flüchtiger N-Nitrosamine im Urin eine durchschnittliche Ausscheidung von 34,8 ng/Tag NDMA [Bereich <5-190 ng/Tag].

Die Bestimmung von speziellen Nitrosaminen in Körperflüssigkeiten liefert nur eine begrenzte Aussage über die tatsächliche Exposition gegenüber Nitrosaminen. Mit den gegenwärtig verfügbaren Methoden können nur metabolisch stabile Bestandteile oder ihre Metaboliten bestimmt werden. Gruppenselektive Bestimmung durch chemische Denitrosierung und die Messung von freigesetztem Stickstoffmonoxid ermöglicht eine Abschätzung der Gesamtkonzentration aller N-Nitrosoverbindungen, die in einer biologischen Matrix enthalten sind. Dieses Verfahren gibt keine Information über die Identität oder die Gehalte einer individuellen Verbindung. N-Nitrosoverbindungen, für die keine Untersuchungsmethoden bestehen, werden miterfasst. Das Ergebnis wird unter dem Begriff „apparent total N-nitroso compounds“ (ATNC) angegeben und umfasst alle N-Nitrosoverbindungen. Ein Vergleich der Untersuchungsmethoden hat ergeben, dass es durch die unterschiedlichen Extraktionsverfahren zu deutlichen Abweichungen der Ergebnisse kommt. Betrachtet man zusätzlich noch die intraindividuellen und interindividuellen Schwankungen, so wird deutlich, dass die Untersuchungen mit zahlreichen Unwägbarkeiten behaftet sind. Daher ist durch die beschriebene Untersuchung nur eine grobe Massenbilanz zwischen der exogenen Exposition gegenüber N-Nitrosaminen und der ATNC Ausscheidung möglich. Studien aus dem Vereinigten Königreich ermittelten eine nahrungsbedingte Exposition von 0,79 $\mu\text{mol}/\text{Tag}$ ATNC [entspricht 80-120 $\mu\text{g}/\text{Tag}$]. Zusammen mit der durchschnittlichen arbeitsbedingten Exposition von 0,30 $\mu\text{mol}/\text{Tag}$ ergibt sich eine ATNC Gesamtaufnahme von 1,10 $\mu\text{mol}/\text{Tag}$. Die Ausscheidung von ATNC über die Faeces [1,56–3,17 $\mu\text{mol}/\text{Tag}$] und Urin [1,30 $\mu\text{mol}/\text{Tag}$] liegt zwischen 2,86–4,47 $\mu\text{mol}/\text{Tag}$. Eine grobe Massenbilanz zwischen der exogenen Exposition und der Ausscheidung von ATNC zeigt, dass in Abhängigkeit von der Untersuchungsmethode 50-75 % der gesamten menschlichen Exposition gegenüber N-Nitrosoverbindungen aus einer in vivo Bildung stammt [TRICKER, 1997].

4.4 Toxikologische Bewertung von Nitrit und Nitrosaminen

1998 wurde eine globale Initiative zur Gefährdungsabschätzung von Chemikalien, die in großen Mengen produziert werden (HPV=High Production Volume), ins Leben gerufen.

Ziel sollte sein,

- Datenlücken zu erkennen und diese durch entsprechende Tests zu schließen,
- die toxikologisch relevanten Daten für jeden Stoff zusammenzustellen und einen Zugang zu den Informationen für die Verwender der Substanzen zu ermöglichen. Damit sollen Mehrfachtests vermieden und die Anzahl an Tierversuchen vermindert werden.

Die Bereitstellung von Daten zum Gefährdungspotential ermöglicht es den Behörden und der Industrie, die Schwerpunkte hinsichtlich der vorzunehmenden Risikobewertung einzelner Chemikalien zu setzen. Alle zu einem Stoff verfügbaren Daten werden in einem IUCLID Datensatz zusammengefasst und in eine Stoffdatenbank, der International Uniform Chemical Information Database (IUCLID) eingegeben. IUCLID enthält Angaben zu physikochemischen Eigenschaften, Toxizität, Ökotoxizität und Umweltverhalten von Chemikalien. Die in dem IUCLID Datensatz enthaltenen Untersuchungsergebnisse werden hinsichtlich ihrer Aussagekraft bewertet. Hierzu werden die Studienberichte einer Untersuchung eingesehen und bewertet. Relevante Kriterien sind unter anderem die Untersuchungsmethode und die Anwendung von GLP (Good Laboratory Practice). Die für eine Substanz bewertungsrelevanten, validierten Daten werden in einem SIDS (Screening Information Data Set) zusammengefasst. Der SIDS bildet die Grundlage für die eigentliche Gefährdungsabschätzung, den sogenannten SIDS Initial Assessment Report (SIAR). In diesem Dokument sind die Auswirkung einer Exposition auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt dargestellt.

4.4.1 Methämoglobinämie

Die Ernährung ist eine der Hauptexpositionsquellen für Nitrat und Nitrit. Nitrat wird hauptsächlich über das Gemüse, insbesondere Salat, Sellerie und rote Beete aufgenommen. Die Nitratkonzentration liegt zwischen 1 g/kg Frischgewicht und kann bis zu 3-4 g/kg erreichen. Durch Gemüse und gepökeltes Fleisch wird in den verschie-

denen Europäischen Ländern durchschnittlich eine Nitritmenge von 0,7–8,7 mg/Tag aufgenommen. Im Tierversuch an Ratten und Mäusen wurde die Bildung von Methämoglobin im Blut als der erste akute toxische Effekt von Natriumnitrit identifiziert. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass der Mensch eine höhere Empfindlichkeit als die Ratten aufweist. Methämoglobin Reduktase katalysiert die Reduktion von Methämoglobin zu Hämoglobin und schützt damit die roten Blutkörperchen vor einer oxidativen Schädigung. Insbesondere Kinder sind besonders empfindlich gegenüber Nitrit, da das Enzym Methämoglobin Reduktase nur eine Aktivität von 50 % im Vergleich zum Erwachsenen hat. Als weitere toxische Effekte von Natriumnitrit auf Tiere wurde eine Gefäßweitstellung, die Entspannung der glatten Muskulatur und eine Verminderung des Blutdrucks nachgewiesen.

4.4.2 Akute Toxizität

Für die akute Toxizität von Natriumnitrit (NaNO_2) wurde an Mäusen ein $\text{LD}_{50} = 214$ mg/kg bw (body weight) für die männlichen Tiere und ein $\text{LD}_{50} = 216$ mg/kg bw für die weiblichen Tiere bestimmt. Die Natriumnitritlösung wurde mittels Sonde verabreicht. Der LD_{50} ist die letale Dosis, bei der 50 % aller Versuchstiere, denen eine bestimmte Testsubstanz verabreicht wurde, sterben.

4.4.3 Toxizität bei wiederholter Gabe

An Ratten wurden die Wirkungen der durchschnittlichen Tagesdosen von etwa 0, 30, 55, 115, 200 und 310 mg NaNO_2 /kg bw/day bei männlichen Tieren und 0, 40, 80, 130, 225 und 345 mg NaNO_2 /kg bw/day bei weiblichen Tieren im Trinkwasser über eine Dauer von 14 Wochen untersucht. In den oberen Dosisgruppen wurde bei beiden Geschlechtern ein signifikant niedrigeres Körpergewicht, eine erhöhte Anzahl an Retikulozyten und ein signifikant erhöhtes Gewicht von Nieren und Milz im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Der Methämoglobinspiegel war bei allen behandelten Gruppen signifikant erhöht. Es wurde ein LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Load) von 115 mg NaNO_2 /kg bw/day für die männlichen Tiere auf Grund der eingeschränkten Spermienbeweglichkeit ab dieser Dosis bestimmt. Der LOAEL für die weiblichen Tiere beträgt 225 mg NaNO_2 /kg bw/day, da ab dieser Konzentration ein erhöhtes Gewicht von Niere und Milz festgestellt wurde.

In einer weiteren Studie zur Untersuchung der Toxizität bei wiederholter Verabreichung wurde an Mäusen die Wirkungen der durchschnittlichen Tagesdosen von etwa 0, 90, 190, 345, 750 und 990 mg NaNO₂/kg bw/day bei männlichen Tieren und 0, 120, 240, 445, 840 und 1230 mg NaNO₂/kg bw/day bei weiblichen Tieren im Trinkwasser über eine Dauer von 14 Wochen untersucht.

Der LOAEL für männliche Tiere beträgt 750 mg NaNO₂/kg bw/day auf Grund der Blutbildung außerhalb des Knochenmarks in der Milz und der Degeneration der Hoden ab dieser Dosis. Der LOAEL für weibliche Tiere beträgt 445 mg NaNO₂/kg bw/day, da ab dieser Konzentration eine Blutbildung außerhalb des Knochenmarks in der Milz festgestellt wurde.

In zwei Studien wurde die chronische Toxizität über zwei Jahre an Ratten und Mäusen untersucht. Beide Untersuchungen ergaben keine klinischen Befunde. Für die männlichen Ratten wurde ein NOAEL von 130 mg NaNO₂/kg bw/day und für weiblichen Ratten ein NOAEL von 150 mg NaNO₂/kg bw/day festgelegt. Der Grund war ein geringeres mittleres Körpergewicht bei den angegebenen Dosen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei den Mäusen wurde für die männlichen Tiere ein NOAEL von 220 mg NaNO₂/kg bw/day und für die weiblichen Tiere ein NOAEL von 165 mg NaNO₂/kg bw/day bestimmt.

In einer zweijährigen Studie an männlichen Ratten wurde der NOEL (No Observed Effect Level) von 10 mg NaNO₂/kg bw/day, welcher äquivalent zu 6,7 mg NO₂/kg bw/day ist, ermittelt. Histopathologische Veränderungen an Lunge, Herz und Gefäßen wurde an Ratten festgestellt, welchen Natriumnitrit in Dosierungen von 100, 250 und 350 mg/kg bw/day verabreicht wurde. Unter Anwendung eines Sicherheitsfaktors von 100 legte das Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) einen ADI (acceptable daily intake) von 0 bis 0,07 mg NO₂/kg bw/day fest.

4.4.4 Mutagenität

An Bakterien und an Zellkulturen von Säugetieren wurde nachgewiesen, dass Natriumnitrit ohne metabolische Aktivierung durch Austausch von Basenpaaren mutagen ist. Der In-Vivo-Test ergab, dass die Substanz Chromosomenaberrationen in Säuge-

tierzellen induziert. Es wurde bewiesen, dass Natriumnitrit ein genotoxisches Potential hat.

4.4.5 Karzinogenität

Die Weltgesundheitsorganisation WHO kam auf Grund der Resultate verschiedener NTP Studien (USA National Toxicology Program) Studien an Ratten und Mäusen zu dem Ergebnis, dass eine karzinogene Wirkung von Natriumnitrit nicht bewiesen werden konnte. Bei den Untersuchungen wurde das Natriumnitrit über das Trinkwasser verabreicht. Die endogene Bildung von Nitrosaminen wurde bei diesen Tests nicht untersucht.

4.4.6 Reproduktionstoxizität

Der NOAEL für die Reproduktion bei Mäusen beträgt 425 mg NaNO₂/kg bw/day in Trinkwasser und 43 mg NaNO₂/kg bw/day im Futter. Für Meerschweinchen wurde ein LOAEL von 60 mg NaNO₂/kg bw/day ermittelt.

Bei Ratten wurde eine erhöhte Fötal- und Neugeborenensterblichkeit sowie eine Abnahme des Gewichts von Neugeborenen beobachtet. Daher wurde ein NOAEL für die Entwicklungstoxizität von 10,75 mg NaNO₂/kg bw/day angenommen [OECD SIDS, 2005].

4.4.7 Nahrungsbedingte Aufnahme von Nitrit beim Menschen

Der Beweis für den Zusammenhang zwischen der nahrungsbedingten Aufnahme von Nitrit und Magenkrebs geht aus sieben aussagekräftigen Fall-Kontrollstudien und zwei Kohortenstudien, welche alle in Europa und Nordamerika durchgeführt wurden, hervor. Von sieben Fall-Kontrollstudien zeigten sechs einen positiven Zusammenhang, welcher in vier Fällen signifikant war. Zwei Studien betrachteten den Einfluß von Wechselwirkungen von Nitrit und potentiellen Inhibitoren der Nitrosierung. Aus einer großen Fall-Kontrollstudie in Italien geht hervor, dass sich das Krebsrisiko um das Fünffache erhöht, wenn hohe Konzentrationen von Nitrit und Proteinen bei gleichzeitigen geringen Konzentrationen an antioxidativen Mikronährstoffen, wie Vi-

tamin C und α -Tocopherol, aufgenommen werden, im Vergleich zu Personen mit niedriger Aufnahme von Nitrit und Proteinen und einer hohen Aufnahme von Antioxidantien.

Zwei Fall-Kontrollstudien, beide in den USA ausgeführt, zeigten eine nicht signifikante Assoziation zwischen der Aufnahme von Nitrit und der Entstehung von Speiseröhrenkrebs. Bei der Berücksichtigung des Vitamin C-Bedarfs ist aufgefallen, dass sich das Risiko an Speiseröhrenkrebs zu erkranken bei einer hohen Nitrit- und einer geringen Vitamin C-aufnahme, im Vergleich zu einem geringen Nitrit- und einem hohen Vitamin C-verzehr, erhöht.

Es wurden zwölf Fall-Kontrollstudien ausgewertet, deren Thema die Entstehung von Tumoren im Gehirn in Verbindung mit der nahrungs- oder trinkwasserbedingten Nitritaufnahme war. Die Ergebnisse lassen keine eindeutigen Tendenz erkennen. Die größte Fall-Kontrollstudie, welche im Westen der USA durchgeführt wurde, ergab keinen Zusammenhang zwischen der nahrungsbedingten Aufnahme von Nitrit und dem Vorkommen von Hirntumoren in der Kindheit. Eine Betrachtung über die Herkunft des Nitrits ergab, dass pflanzliche Quellen nicht mit dem Vorkommen in Verbindung stehen. Es ergab sich jedoch ein dreifach höheres Risiko für Kinder, an einem Gehirntumor zu erkranken, wenn während der Schwangerschaft Nitrit aus gepökeltem Fleisch in Konzentrationen größer oder gleich 3.0 mg pro Tag aufgenommen wurden. Andere Studien aus Israel, Frankreich oder Nordamerika konnten kein zunehmendes Risiko im Zusammenhang mit der nahrungsbedingten Nitritaufnahme herstellen. Allerdings haben diese Studien nicht die Aufnahme von gepökelten Fleischwaren quantifiziert.

Sieben Studien über die nahrungsbedingte Aufnahme von Nitrit wurden betrachtet, sechs davon ergaben ein Risiko für Gliome. Es wurde allgemein von keiner signifikanten Assoziationen zwischen der Entstehung von Hirntumoren und der nahrungsbedingten Nitritaufnahme berichtet.

Die vorliegenden Studien über das Vorkommen von Tumoren in den Harnwegen oder bösartigen Tumorzellen im Lymphsystem im Zusammenhang mit dem aufgenommenen Nitrit lassen keine eindeutige Tendenz erkennen.

Eine Fall-Kontrollstudie in den USA und eine Kohortenstudie in Finnland hat die nahrungsbedingte Aufnahme von Nitrit und das Risiko an Dickdarm- und Mastdarmkrebs zu erkranken ausgewertet. In der Fall-Kontrollstudie wurde ein um 50 % erhöhtes Risiko für Dickdarmkrebs und ein um 70 % erhöhtes Risiko für Mastdarmkrebs ermittelt. In der Kohortenstudie wurde hingegen die nahrungsbedingte Aufnahme von Nitrit nicht mit einem Krebsrisiko in Verbindung gebracht.

Bei den meisten Studien, in denen Ratten und Mäuse über die Nahrung oder durch Trinkwasser dem Nitrit ausgesetzt wurden, konnte kein erhöhtes Vorkommen von Tumoren im Vergleich zu den Kontrollgruppen beobachtet werden. Diese Befunde können auch durch die niedrigen Dosen von Nitrit, die kurze Expositionszeit oder die Instabilität von Nitrit hervorgerufen worden sein.

In vielen Studien an Mäusen wurde Nitrit in Verbindung mit spezifischen sekundären und tertiären Aminen oder Amiden untersucht, die über die Nahrung, im Trinkwasser oder durch Intubation in den Magen verabreicht wurden. Diese Kombination führte in den meisten Fällen zu einer Erhöhung der Tumorfrequenz im Vergleich zur einzelnen Verabreichung der Substanzen. Die Amine und Amide, welche zu positiven Ergebnissen führten waren Dibutylamin, N-Methylanilin, Piperazin, Morpholin, Butylharnstoff, Ethylharnstoff, Ethylthioharnstoff, Methylharnstoff und Carbendazim. Die Tumore umfassten Lungentumore, Tumore im Lymphsystem, Tumore im Bereich des Vormagens, Harnblasenpapillome und Gebärmutteradenokarzinome.

In zahlreichen Studien an Ratten wurde Nitrit in Kombination mit bestimmten sekundären und tertiären Aminen oder Amiden untersucht. Die Verabreichung erfolgte über die Nahrung, das Trinkwasser oder durch Intubation des Magens. Die meisten Stoffkombinationen ergaben eine Zunahme an Tumorfällen im Vergleich zur einzelnen Verabreichung von Aminen, Amiden oder Nitrit. Folgende Amine oder Amide ergaben positive Ergebnisse: Aminopyrin, Bis (2-hydroxypropyl) amin, Chlorpheniramin, Diphehydramin, Heptamethylenimin, Morpholin, N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid, Butylharnstoff und Disulfiram. Es wurden Speiseröhrentumore, Hämangiosarkome, Leberzellenadenome und Leberzellenkarzinome, Lungenstachelzellenkarzinome und Nasenhöhrentumore nachgewiesen.

In einigen dieser Studien wurde bei einem konstanten Nitritspiegel die Tumorfrequenz in direkter Abhängigkeit von dem Gehalt an Aminen induziert. Bei konstanter Konzentration von Aminen stand die Anzahl an erhaltenen Tumoren ebenfalls in einem direkten Zusammenhang mit dem Natriumnitritgehalt. Als tragenden Ratten Ethylharnstoff und Natriumnitrit mit dem Trinkwasser verabreicht wurde, entwickelte der Nachwuchs Tumore im Nervensystem.

Studien, bei denen Mäusen neben Nitrit und Dibutylamin auch Vitamin C oder Sojabohnen verabreicht wurden, zeigten, dass Antioxidantien die Bildung von Leber- und Harnblasentumoren verhindern. Thioprolin, eine Substanz, die Nitrit abfängt, reduzierte die Fälle von Vormagenkarzinomen, welche durch die Kombination von Nitrit und N-Benzylmethylamin bei Ratten entstehen. Ascorbat verzögert die Entstehung von Lebertumoren, welche durch die gleichzeitige Verabreichung von Nitrit und Morpholin gebildet werden, sie förderte das Vorkommen von Vormagentumoren im gleichen Experiment.

Es liegen begrenzte Beweise vor, nach denen Nitrit in Nahrungsmitteln bei Menschen karzinogen wirken. Es gibt ausreichende Beweise in Tierversuchen für die Kanzerogenität von Nitrit in Verbindung mit Aminen und Amiden. Aus diesem Grund wird mit der Nahrung aufgenommenes Nitrit, welches unter den Bedingungen, die zu einer endogenen Nitrosierung führen, als vermutlich karzinogen für den Menschen eingestuft (Gruppe 2A) [International Agency for Research on Cancer, 2006].

5 Toxikologische Bewertung der Verwendung von NPS

Für die toxikologische Bewertung von Nitritpökelsalz dürfen die Substanzen Natriumchlorid und Natriumnitrit (NaNO_2) nicht nur isoliert bewertet werden, vielmehr ist ein Zusammenhang zwischen der gesamten Aufnahme aus pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln, den Umsetzungsprodukten im menschlichen Körper und die endogene Bildung von Nitrit aus Stickstoffmonoxid herzustellen. Ferner sind die Risiken der Reaktionsprodukte, welche aus der Umsetzung von Aminosäurederivaten und Nitrit im Magen entstehen, zu bewerten.

Im Jahr 2005 lag der Pro-Kopf-Verzehr von Fleisch in Deutschland bei ca. 60 kg pro Jahr [Deutscher Fleischer Verband, DVF]. Etwa 40 % (24 kg) davon werden in Form von Fleischerzeugnissen (30 kg) verzehrt, von denen die Hauptmenge, ca. 90 %, mit Nitritpökelsalz hergestellt wird. Ein großer Teil des zugesetzten Nitrits wird durch chemische Reaktionen mit Fleischbestandteilen verbraucht, beispielsweise durch die Bildung der erwünschten Pökelfarbe. Daher sind die Restgehalte sehr viel niedriger als die aus der Nitritzugabe berechneten Gehalte. Nach Messungen der Bundesanstalt für Fleischforschung liegen die Restnitritgehalte in gepökelten Brühwurstzeugnissen bei 10-30 mg NaNO_2/kg , in gepökelten Rohfleischerzeugnissen bei 40-50 NaNO_2/kg . Da der Anteil der Brühwurstzeugnisse ca. 80 % und der Rohpökelprodukte ca. 20 % beträgt, ergibt sich ein nach Anteilen gewichteter Mittelwert von ca. 30 mg NaNO_2/kg gepökeltes Fleischerzeugnis. In den durchschnittlich 30 kg pro Jahr verzehrten Fleischerzeugnissen sind somit 900 mg oder 0,9 g NaNO_2 enthalten. Daraus ergibt sich eine durchschnittliche tägliche Pro-Kopf-Nitritaufnahme aus gepökelten Fleischerzeugnissen von ca. 2,5 mg NaNO_2 (1,7 mg NO_2) [WILD, 2003]. Während ein Erwachsener (60 kg) entsprechend 0,03 mg NO_2/kg bw/day aufnimmt und damit den ADI (acceptable daily intake) von maximal 0,07 mg NO_2/kg bw/day nur zu 43 % ausschöpft, kann es bei Kindern und Jugendlichen aufgrund ihres geringeren Körpergewichts und der größeren Nahrungsaufnahme dazu kommen, dass der ADI schon durch die verzehrten Fleischerzeugnisse erreicht wird.

In den verschiedenen Ländern der Europäischen Gemeinschaft schätzt man die durchschnittliche Nitrataufnahme auf 31-185 mg NO_3/Tag , Gemüse trägt 80-85 % hierzu bei. Die Nitritaufnahme aus Gemüse und Fleisch ist sehr viel niedriger und

liegt durchschnittlich bei 0,7-8,7 mg NO₂/Tag [OECD SIDS, 2005]. Die gesamte Pro-Kopf-Nitritaufnahme mit der Nahrung in Deutschland beträgt nach SELENKA und BRAND-GRIMM (1976) 4,9 mg NaNO₂/Tag, während SCHULZ (1998) neuerdings den wesentlich niedrigeren Wert von 0,4 mg NaNO₂/Tag angibt. Für das Vereinigte Königreich werden 3,6-6,3 mg NaNO₂/Tag, für Finnland 2,1 mg NaNO₂/Tag und für die Niederlande 7,8 mg NaNO₂/Tag angegeben (GANGOLLI et al., 1994) [WILD, 2003].

Wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, liegt die von einem gesunden Erwachsenen täglich gebildete Menge von Stickstoffmonoxid zwischen 580 bis 1065 µmol NO/Person, es sind sogar aus Experimenten mit Endothelzellen Werte bis zu 1728 µmol NO/Person möglich [KELM, 1999]. Aus den beiden kleineren Werten errechnet sich eine täglich gebildete Nitratkonzentration von 74-136 mg NO₃/Person (82-150 mg NaNO₂/Person). MOCHIZUKI et al. gehen von einer körpereigenen Stickstoffmonoxid Produktion von 400-700 nmol/min bei einem gesunden erwachsenen Menschen aus [MOCHIZUKI, 2000]. Hieraus errechnet sich eine täglich endogen gebildete Nitratmenge von 36-63 mg NO₃/Person (39-69 mg NaNO₂/Person).

Vergleicht man nun die tägliche Natriumnitritaufnahme durch den Verzehr von gepökelten Fleischerzeugnissen, ca. 2,5 mg NaNO₂/Person, mit der Menge an täglich endogen gebildetem Natriumnitrit, 39-69 mg NaNO₂/Person beziehungsweise 82-150 mg NaNO₂/Person, so überwiegt deutlich der endogen aus Stickstoffmonoxid gebildete Anteil an Natriumnitrit. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass Nitrit, welches sich im Blut befindet, zu Nitrat oxidiert und über den Urin ausgeschieden wird. Etwa 20-25 % des im Blutkreislauf befindlichen Nitrats gelangen in die Speicheldrüsen, ca. 20 % wird durch Bakterien auf dem Zungenrücken zu Nitrit reduziert. Damit werden etwa 4-5 % des Nitrats aus dem Blutkreislauf zu Nitrit reduziert. Vergleicht man erneut die täglich endogen gebildete Nitratmenge von 36-136 mg NO₃/Person und die daraus stoffwechselbedingt resultierende Menge an Nitrit, 1,1-5,1 mg NO₂/Person, so liegt diese im unteren Bereich relativ dicht an der über gepökelte Fleischerzeugnisse aufgenommenen Menge von 1,7 mg NO₂. Über das Gemüse werden täglich zwischen 31-185 mg NO₃/Person aufgenommen und 0,9-6,9 mg NO₂/Person über den beschriebenen Stoffwechsel mit dem Speichel freigesetzt.

	Nitrit [mg/Person Tag]:
Aus Gemüse (direkt enthalten):	0,7-8,7
Aus Gemüse (Reduktion von Nitrat):	0,9-6,9
Aus endogen gebildetem Stickstoffmonoxid:	1,1-5,1
Aufnahme über gepökelttes Fleisch:	1,7

Tabelle 2: Nitritaufnahme [mg/Person Tag]

Aus den in der Tabelle angegebenen Werten geht hervor, dass über die pflanzlichen Nahrungsmittel mehr Nitrit aufgenommen wird als durch den Verzehr von gepökelten Fleischerzeugnissen. Die vom Körper gebildete Menge an Nitrit, welche über die Speicheldrüsen sezerniert wird, entspricht höchstens drei mal der Menge, die über das gepökelte Fleisch aufgenommen wird.

Das eigentliche Problem liegt nicht in der akuten Toxizität des Nitrits, sondern in der Bildung von kanzerogenen N-Nitrosoverbindungen. Studien an Nagern führten zu dem Ergebnis, dass die Konzentration von N-Nitrosoverbindungen (NOC) und deren Vorstufen vom Magen bis zum letzten Abschnitt des Dickdarms zunimmt. Mäuse wurden mit Nagerfutter gefüttert, welches definierte Mengen an Rindfleisch und Hotdog-Würstchen enthielt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Ausscheidung an N-Nitrosoverbindungen um den Faktor 2,5 und 4,2 größer waren als bei der Kontrollgruppe, welche ohne Zusatz von Fleisch gefüttert wurde. Durch Tierversuche wurde nachgewiesen, dass insbesondere die Kombination von Nitrit mit sekundären und tertiären Aminen und Amiden zu einer Erhöhung der Tumorfrequenz im Vergleich zur einzelnen Verabreichung der Substanzen führt. Als Zielorgane für die Tumore wurden Lunge, Lymphsystem, Speiseröhre, Vormagen, Leber, Harnblase und Gebärmutter identifiziert. Eine grobe Massenbilanz zwischen der exogenen Exposition und der Ausscheidung von N-Nitrosoverbindungen beim Menschen zeigt, dass 50-75 % der gesamten Exposition aus einer in vivo Bildung stammt. Die Ausscheidung ist bei überwiegend oder vollständig vegetarisch lebenden Bevölkerungsgruppen deutlich niedriger (ca. 60 %) als bei Personen mit fleischhaltiger Ernährung. Durch die Auswertung von 13 Studien konnte belegt werden, dass rote Fleischsorten und

hierbei insbesondere verarbeitete Fleischsorten, einen Risikofaktor für Darmkrebs darstellen. Es ist zu berücksichtigen, dass es durch die Zubereitung, insbesondere beim Braten und Grillen, zur Bildung von kanzerogenen heterocyclischen aromatischen Aminen und polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen kommen kann, welche zusammen mit N-Nitrosoverbindungen als Ursache von Darmkrebs in Betracht kommen. In einigen Kohortenstudien und in einer größeren Anzahl an Fall-Kontroll-Studien wurde von einem positiven Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Fleisch und der Entstehung von Magen- und Speiseröhrenkrebs berichtet. Diese Risiken sind nicht ausschließlich auf das Nitritpökelsalz zurückzuführen, da Fleisch generell ein Substrat zur Bildung von N-Nitrosoverbindungen ist. Nahrungsmittel wie verarbeitetes Fleisch und getrockneter, gesalzener Fisch enthalten viel Salz. Dieses begünstigt Entzündungsprozesse, welche die schützende Magenschleimhaut schädigen und erhöht damit das Risiko, an Magenkrebs zu erkranken.

6 Abschließende Bewertung

Für den Menschen spielen Gemüse und Pökelfleischwaren neben Trinkwasser für die Nitrat-Aufnahme und Pökelfleischwaren für die Nitrit-Aufnahme eine wesentliche Rolle. Weiterhin ist die endogene Bildung beider Stoffe zu berücksichtigen, die mit der über die Nahrung zugeführten Menge vergleichbar bzw. erheblich größer ist. Die Regelungen und Maßnahmen zur Beschränkung der Zufuhr von Nitrat/Nitrit dient insbesondere der Vorbeugung und soll dazu führen, die Ausschöpfung der ADI-Werte von 0,07 mg NO₂/kg bw/day und 3,7 mg NO₃/kg bw/day zu senken. Bei diesen Betrachtungen dürfen nicht die positiven Eigenschaften für den Verbraucher von Nitrit als Zusatzstoff außer Acht gelassen werden. Der Verbraucher hat einen Anspruch auf mikrobiologisch einwandfreie und optisch ansprechende Fleischerzeugnisse, wenn diese unter Zusatz von Konservierungsstoffen in gesundheitlich unbedenklichen Konzentrationen hergestellt wurden. Dies wird durch die geltenden gesetzlichen Vorgaben sichergestellt. Ein Verzicht auf Nitritpökelsalz würde weitaus größere gesundheitliche Risiken durch Mikroorganismen wie beispielsweise Clostridium botulinum bedeuten. Vor diesem Hintergrund ist die Verwendung von Nitritpökelsalz in Fleisch und Fleischerzeugnissen als sicher zu bewerten.

7 Literatur

ARNETH, WOLFGANG: Chemische Grundlagen der Umrötung, Fleischwirtschaft 78 (8), 868-874 (1998).

BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Vierte, überarbeitete Auflage, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer, 1992.

BgVV, 2001: Verzehr von nitrit-/nitrat-gepökelten Fleischwaren-Bewertung eines Gutachtens zur Beurteilung der Gefährdungslage beim Menschen, Aktualisierte Stellungnahmen des BgVV vom 23.Oktober 2001.

CAMMACK, R. et al: Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation, Biochimica et Biophysica Acta 1411 (1999), 475-488.

EFSA: The effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products, The EFSA Journal (2003) 14, 1-31.

FREDE, W. (Hrsg.): Taschenbuch für Lebensmittelchemiker und –technologien. Band 1, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1991).

GREVER, A. B. G.; RUITER, A.: Prevention of Clostridium outgrowth in heated and hermetically sealed meat products by nitrite - a review, Eur Food Res Technol (2001) 213:165-169.

IARC: International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 94: Ingested nitrates and nitrites, and cyanobacterial peptide toxins, Lyon, France: 14-21 June 2006.

JAKSZYN P.; GONZÁLEZ, C. A.: Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence, *World Journal of Gastroenterology* 2006 July 21; 12 (27): 4296-4303.

KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1988.

KAYSER, H.; BIENZ, K. A.; ECKERT, J.; LINDENMANN, J.: Medizinische Mikrobiologie, 7., überarbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1989.

KELM, M.: Nitric oxide metabolism and breakdown, *Biochimica et Biophysica Acta* 1411 (1999), 273-289.

LÜCKE, F.-K.: Bewertung des Einsatzes von Nitrit und Nitrat bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft* 79, 96-98 (1999).

MARQUARDT, H.; SCHÄFER, S.: Lehrbuch der Toxikologie, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2004.

MAY, M. M.; QU ZHI-CHAO; XIA LI; COBB, C. E.: Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 279: C1946-C1954, 2000.

MEYER, H. A.: Lebensmittelrecht, Bundesgesetze und –verordnungen sowie EG-Recht über Lebensmittel (einschließlich Wein), Tabakerzeugnisse, kosmetische Mittel und Bedarfsgegenstände, Stand: 1. Februar 2006, Verlag C. H. Beck München.

MOCHIZUKI, S.: Effect of dietary control on plasma nitrate level and estimation of basal systemic nitric oxide production rates in humans, *Heart Vessels* (2000) 15: 274-279.

OECD SIDS: SODIUM NITRITE, SIDS Initial Assessment Report (Draft), prepared by the Sodium Nitrite Consortium established by the Japanese industry, The Japanese government peer-reviewed the documents and audited selected studies. July 2005.

PHOA, N.: Einfluss von Stickstoffmonoxid, Hydroxylradikalen und Peroxynitrit auf DNA-Schäden, DNA-Reparatur und Mutationen, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz 2002.

SAMMET, K.: Beurteilung des antioxidativen Potentials von diätetisch zugeführtem α -Tocopherol in nitritreduzierter Rohwurst, Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover, 2004.

SCHWEDT, G.: Taschenatlas der Lebensmittelchemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1999.

THIEMIG, F., H. BUHR u. P. OELKER (2000): Gibt es Alternativen zum Pökeln mit Nitrit? Fleischwirtsch. 1, 106-110.

TOMPKIN, R. B.; CHRISTIANSEN, L. N.; SHAPARIS, A. B.: (1979) Appl Environ Microbiol 37:351-353.

TRICKER, A. R.: *N*-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids, European Journal of Cancer Prevention 1997, Vol. 6, 226-268.

VOLKMER, J.-P.: Expression einer NO-Synthase im Erythrozyten: Untersuchungen zur mRNA- und Protein-Expression, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2006.

WILD, D.: Krebs durch Konsum nitritgepökelter Fleischerzeugnisse?, Mitteilungsblatt BAFF (Bundesanstalt für Fleischforschung Kulmbach) 42, Nr. 162, 361-367 (2003).