

2.6.4.2 Nitrosamine in Würze und Bier

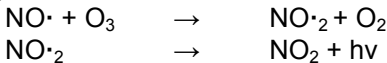
Der Gruppe der Nitrosamine konnten sehr starke kanzerogene Eigenschaften nachgewiesen werden. In Bier wurde bisher nur Nitrosodimethylamin (NDMA) festgestellt.

Prinzip

Aus den Würzen und Bieren extrahiert man das NDMA auf Extrelut oder vergleichbares Material mittels Dichlormethan und konzentriert anschließend das Eluat. Die Bestimmung erfolgt gaschromatographisch mit dem spezifischen TEA-Detektor („Thermal Energy Analyzer“); als interner Standard (ISTD) dient Nitrosodipropylamin (NDPA) oder Nitrosodiisopropylamin (NDiPA). Dieser Detektor erfasst Nitrosamine nach folgendem Schema: Nach dem Austritt aus der GC-Säule gelangen die getrennten Substanzen zuerst in einen Pyrolyzierofen, wo sie auf etwa 500 °C erhitzt werden. Bei dieser Temperatur tritt eine Aufspaltung der (N-NO)-Bindung der Nitrosamine ein, wobei sich ein NO-Radikal ($\text{NO}\cdot$) bildet:



Danach strömen die NO-Radikale sowie von einem speziellen Generator erzeugtes Ozon in eine Reaktionskammer, wo folgende Umsetzung abläuft:



Diese NO-Radikale reagieren mit Ozon unter Bildung von Stickstoffdioxid in einem angeregten Zustand ($\text{NO}\cdot_2$). Das $\text{NO}\cdot_2$ zerfällt spontan unter Aussendung von Strahlungsenergie ($h\nu$) mit einer Wellenlänge von etwa 600 nm in gewöhnliches Stickstoffdioxid (NO_2).

Geräte

Rotationsverdampfer oder automatische Einengapparatur z. B. Caliper TurboVap
GC mit TEA
Kolbenhubpipetten
dunkle Probengläser, 100 ml, mit Verschluss
Messkolben, braun, 100 ml
Spitzkolben, 100 ml
Spitzkolben, 25 ml

Reagenzien

Extrelut NT 20 Fertigsäulen (z. B. VWR Art.-Nr. 1.15096) für 20 ml Probe oder Nachfüllpackungen oder gleichwertiges Material
Ethanol absolut p. a.
Dichlormethan, GC-Qualität, ohne Amylene, NDMA-frei
NDMA-Standardlösung, 10ng/µl, z. B. Fa. Ehrenstorfer
NDiPA-ISTD-Lösung, 100 µg/ml, z. B. Fa. Promochem
1 N Natriumhydroxidlösung: 40 g NaOH-Plätzchen mit Reinstwasser auf 1000 ml auffüllen

Kalibrierlösungen

1000 µl der NDMA-Standardlösung (10 ng/µl in Methanol) auf 100 ml mit Ethanol (brauner Messkolben) verdünnen, entspricht 1 ng/10 µl NDMA
100 µl der NDiPA-Standardlösung (100 µg/ml in Methanol) auf 100 ml mit Ethanol verdünnen (brauner Messkolben), entspricht 1 ng/10 µl
Proben dunkel, gut verschlossen und kühl lagern

Probenvorbereitung (Doppelbestimmung)

Extraktion

- 20 g Bier bzw. 20 g Würze oder 20 g Kongresswürze in Becherglas mit 1 ml ISTD und 1 ml 1 N NaOH vorsichtig mischen und auf Extrelut auftragen

- wenn die Flüssigkeit vom Extrelut aufgenommen ist (ca. 10 min), 20 ml Dichlormethan auf Extrelut geben und Eluat im 100-ml-Spitzkolben auffangen
- nach weiteren 10 min, wenn bereits der überwiegende Anteil Dichlormethan abgelaufen ist, weitere 20 ml Dichlormethan auf Extrelut auftragen
- die vereinigten Eluate auf etwa 1–2 ml am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur einengen
- Konzentrat mittels Pasteurpipette im 25-ml-Spitzkolben quantitativ transferieren
- vorsichtig auf etwa 0,3–0,4 ml (Spitze des Spezial-Spitzkolbens gefüllt) eindampfen (oder das Eluat direkt automatisch am TurboVap auf 0,5 ml einengen)
- diese Dichlormethan-Extrakte entweder sofort analysieren, ansonsten kurzzeitig im Kühlschrank, für längere Zeit (wenn nicht am selben Tag analysiert wird) im Tiefkühler aufbewahren, vor Licht schützen

Kalibrierung Bier/Würze

Für die Kalibrierung wird eine Bierprobe (Null-Bier) verwendet, in der kein NDMA (< 0,05 µg/kg) nachgewiesen wurde.

Konzentrationen: 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,2 µg/kg

		<u>1N NaOH</u>		<u>ISTD</u>		<u>NDMA 1-Lösung</u>
Null-Bier/Würze:	20 g Null-Bier +	1 ml	+	1 ml		
+ 0,1 µg/kg NDMA:	20 g Null-Bier +	1 ml	+	1 ml	+	20 µl
+ 0,2 µg/kg NDMA:	20 g Null-Bier +	1 ml	+	1 ml	+	40 µl
+ 0,4 µg/kg NDMA:	20 g Null-Bier +	1 ml	+	1 ml	+	80 µl
+ 0,8 µg/kg NDMA:	20 g Null-Bier +	1 ml	+	1 ml	+	160 µl
+ 1,2 µg/kg NDMA:	20 g Null-Bier +	1 ml	+	1 ml	+	240 µl

Widerfindung (0,5 µg/kg NDMA):

20 g Null-Bier + 1 ml 1N NaOH + 1 ml ISTD + 100 µl NDMA 1- Lsg.

Mit diesen Ansätzen wie unter „Extraktion“ beschrieben weiterverfahren

Gaschromatographie

Trennsäule: DB-Wax-Kapillarsäule, 30 m × 0,53 mm × 1,0 µm

Trägergas: Helium, Trägerfluss: 3,5 ml/min

Injektortemperatur: 180 °C

Ofentemperaturprogramm: 60 °C (1 min halten)
45 °C/min auf 140 °C (1,5 min halten)
45 °C/min auf 220 °C (3 min halten)

Pyrolyzertemperatur: 500 °C

Interfacetemperatur: 250 °C

Injektionsvolumen: 3 µl

GC-TEA täglich mit folgendem Gemisch überprüfen:

1000 µl NDMA-Stammlösung (10 ng/µl) und 200 µl NDIPA-Stammlösung (100 ng/µl) in einem 50-ml-Messkolben mit Dichlormethan bis zur Markierung auffüllen.

Auswertung

- Kalibrierfaktor F aus der Regressionsgerade berechnen
- Quotienten bilden aus Peakhöhe NDMA/Peakhöhe NDIPA

$$\text{NDMA-Konzentration} = Q \times F \times c$$

Q = Quotientenmittelwert der Probe

F = Kalibrierfaktor

c = Verdünnungsfaktor Kongresswürze

$c = 1$ für Bier und Würze

Angabe der Ergebnisse

in µg/kg

Genauigkeit

$v_{kr} = \pm 5 \%$

Bestimmungsgrenzen

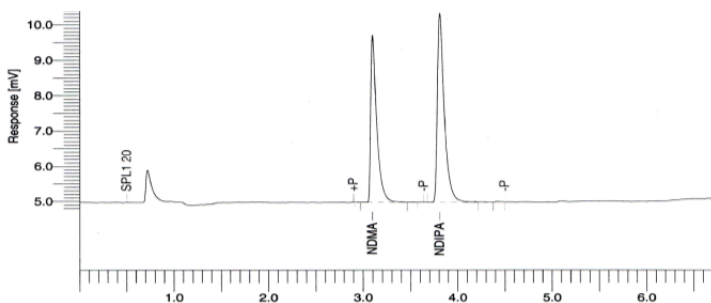
Würze und Bier: 0,2 µg/kg

Grenz-/Richtwerte

In der Schweiz gilt für Bier ein gesetzlicher Grenzwert von 0,5 µg/kg, in Deutschland ein Richtwert von 0,5 µg/kg.

Bemerkungen

Besonders bei der Aufbereitung an den Extrelutsäulen, beim Umgang mit den Standards und deren Verdünnungen und dem Dichlormethan ist auf die Einhaltung der Sicherheitsmaßnahmen zu achten. Handschuhe und Abzug! Jede frische Dichlormethanflasche und Extrelutcharge (o. ä) sind vor Gebrauch auf Anwesenheit von NDMA und NDPA (NDiPA) zu überprüfen.



GC/TEA-Chromatogramm eines NDMA/NDiPA-Gemisches

Literatur

1. L. Marinelli, N-Nitrosamines in malt and beer. J. Am. Soc. Brew. Chem., 39, 99–106 (1981)
2. J. H. Hotchkiss, D. C. Havery, T. Fazio, Rapid method for estimation of N-nitrosodimethylamine in malt beverages. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64, 929–932 (1981)
3. P. Anderegg und H. Pfenninger, Brauerei Rundschau, 93, 3 (1982)