

Extraction and Amplification of DNA from 55 Foodstuffs

Urs Pauli, Marianne Liniger, Andreas Zimmermann and Martin Schrott, Swiss Federal Office of Public Health, Bern

Brigitte Schouwey, Federal Research Station for Animal Production, Posieux

Received 13 June 2000, accepted 7 July 2000

Introduction

Labelling of genetically modified foodstuffs is mandatory in European countries. In order to analyse if a foodstuff contains ingredients derived from genetically modified organisms (GMO), many methods have been developed in the past (1–3). Most of these methods are based on the detection of the introduced genetic trait by the polymerase chain reaction (PCR). However, there is still a lack of knowledge concerning the extractability and the physical properties of DNA relevant for PCR isolated from different foodstuffs. The chosen foodstuffs either contain or are GMOs which are on the market today or alternatively they are at least at the stage of experimental evaluation as a GMO-variety. This work evaluates how much DNA can be extracted from these foodstuffs and if the DNA can be used as a template for PCR. For this reason, 55 foodstuffs representing different processing levels were analysed. The samples were chosen to represent a wide variety of products with different types of food matrices. In a first step, the amount of extractable DNA was determined. Then the quality of the extracted DNA was tested by amplification of the DNA with a eucaryote-specific PCR system (4). Positive results with the eucaryote-specific PCR system solely show the presence of amplifiable DNA, but at the same time allow a comparison of the amplificability between the analysed foodstuffs. The study was extended for three types of foodstuffs (soybean, corn and potato) to a species-specific amplification system, where the gene of interest is present in low/single copy to serve as a model system for genetically modified plants presently on the market.

Materials and methods

Homogenization of food samples, extraction and quantification of DNA

All food samples analysed in this study are available on the market to consumers (table 1). Foodstuffs were used directly (e.g. sugar, meal), gently homogenized in a mortar (e.g. flakes, bread) or ground in an electrical coffee mixer (e.g. grains). 860 µl of extraction buffer (10 mM Tris HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% SDS), 100 µl of 5 M guanidinium hydrochloride and 40 µl of proteinase K (20 mg/ml) were added to 60–350 mg of the homogenate or of the original product. After incubation for at least 3 h at 58°C on a shaker, the tube was cooled to room temperature. It was centrifuged for 10 min at full speed on a microcentrifuge and 500 µl of the supernatant were transferred to a new tube containing 5 µl RNase (10 mg/ml). After incubation for 5 min at 58°C, the samples were extracted with the Wizard™ column extraction method according to the recommendations of the manufacturer (5). All samples were eluted in 50 µl H₂O. For raw potato the CTAB method was used (6), because of the higher yield of DNA. For each food sample extraction was repeated twice. Foodstuffs which were only concentrated, cut, heated, crushed or popped were considered as low processed. Foodstuffs which were precipitated, deep fried, roasted or steamed were considered as medium processed and foodstuffs which were fermented or extruded were considered as highly processed.

The DNA was quantified on a GeneQuant™ photometer with a micro-capillary (Pharmacia, Uppsala, Sweden). This equipment allows accurate measurements down to a concentration of 100 µg/ml. Concentrations below 100 µg/ml cannot be accurately measured but still allow to estimate the approximate concentration. Values < 20 µg/ml are representing fluctuations of the background and do not allow any quantification. For these reasons the ratio $A_{260}:A_{280}$ is not indicated in cases where the DNA concentration is below 100 µg/ml.

Amplification of extracted DNA, gel electrophoresis

The DNA concentration was adjusted to 20 µg/ml after extraction. If the DNA concentration was < 20 µg/ml, 10 µl of the undiluted DNA were used for amplification. The PCR reaction was performed in 50 µl with the following mastermix: 1× concentrated PCR buffer (Promega, Madison, WI), 2 µg/ml BSA (except for the eucaryote-specific PCR, where no BSA was present), 0.2 µM dNTP, 0.5 µM of each primer, 1 U of Taq polymerase (Promega). MgCl₂ was used in the following concentrations: 1.25, 1.5, 2.0, 2.5, 3 mM (soybean, eucaryote, potato inner, potato outer and corn PCR, respectively). The DNA was subjected to a eucaryote-specific PCR with the following specifications: first denaturation for 4 min 30 sec at 95°C, 30 cycles with 46 sec at 95°C, 1 min 25 sec at 64°C, 1 min 25 sec at 72°C and final extension at 72°C for 3 min 15 sec (for primers and amplified genes see table 2). Samples containing corn, soybean or potato were further analysed with a species-specific PCR-

Table 1
List of analysed foodstuffs

<i>Product category</i>	<i>Samples</i>	<i>Processing</i>
<i>Soybean</i>		
flour	1	low
drink	2	↓
tofu	2	↓
sausage	2	↓
sauce	1	↓
bread with soy sauce	1	high
<i>Corn</i>		
flour	1	low
polenta grits	2	↓
popped popcorn	2	↓
tortilla chips	2	↓
starch	2	↓
extruded chips	2	↓
refined oil	1	high
<i>Potato</i>		
cooked slices	2	low
french fries	1	↓
chips	1	↓
mashed	1	↓
extruded chips	7	high
<i>Tomato</i>		
fresh	1	low
peeled	1	↓
concentrate	1	↓
puree	1	↓
ketchup	1	high
<i>Wheat</i>		
grains	1	low
flour	1	↓
toast bread	2	↓
extruded flakes	2	high
<i>Rice</i>		
grains	1	low
waffles	1	high
<i>Sugar</i>		
powdered	1	high
caramel	2	↓
rock	1	↓
cube	1	↓
refined	1	↓
cane refined/brown	2	↓
caramelized	1	high
<i>Total samples</i>	55	

Table 2

Primers used

<i>Primer</i>	<i>Gene</i>	<i>Size (PCR)</i>	<i>Sequence</i>	<i>Reference</i>
TR03	18S rDNA		TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GGT A	(4)
TR04	18S rDNA	137 bp	AAT TTG CGC GCC TGC TGC CTT CCT T	(4)
Zein3	zein		AGT GCG ACC CAT ATT CCA G	(7)
Zein4	zein	277 bp	GAC ATT GTG GCA TCA TCA TTT	(7)
GM03	lectin		GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C	(8)
GM04	lectin	118 bp	GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG	(8)
PAT1	patatin		GTT ATT ATC CCT TAG CGT TGC	(9)
PAT2	patatin	272 bp	AAT TGT TTT GTG AAT GAC GAG	(9)
PAT3	patatin		GGA TCC AGC ATT TTC TTC A	(9)
PAT4	patatin	146 bp	TAG CTA ACA TCC ATC GTA GAG G	(9)

system. For corn-specific PCR the conditions were: first denaturation for 4 min 30 sec at 95°C, 40 cycles with 1 min 45 sec at 96°C, 2 min at 60°C, 1 min 50 sec at 72°C and a final extension at 72°C for 4 min 15 sec. Soy-specific PCR was performed according to the following scheme: first denaturation for 4 min 30 sec at 95°C, 40 cycles with 50 sec at 97°C, 1 min 55 sec at 65°C, 1 min 55 sec at 72°C and a final extension at 72°C for 4 min 15 sec and for potato-specific nested PCR, the conditions for amplification were as follows: first denaturation for 4 min 30 sec at 96°C, 25 cycles with 1 min 15 sec at 96°C, 2 min at 60°C and a final extension at 72°C for 4 min 15 sec. The conditions for inner PCR (or single PCR with CTAB extracted DNA) were: 4 min 30 sec at 96°C, 35 cycles (40 cycles with CTAB extracted DNA) with 1 min 15 sec at 96°C, 2 min at 60°C and a final extension at 72°C for 4 min 15 sec.

The amplified fragments were electrophoresed in high resolution agarose gels (MS-agarose, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and the bands were visualized and photographed under UV (302 nm) after staining with ethidium bromide (1 µg/ml).

Results and Discussion

Foodstuffs from major (GMO) crops available for consumers were analysed and most of them were shown to yield enough DNA with a quality to be amplified with the eucaryote-specific PCR system (table 3). In contrast, no amplification could be observed for refined oil, one soy drink, most sugar products and tomato concentrate. With the species-specific PCR systems, which are designed to detect single or low copy number genes, some foodstuffs do not show a positive amplification signal, indicating that it might not be possible to detect a genetically modified trait on the basis of DNA analysis. The evaluation of the different food categories are described and discussed below.

Table 3
Results of the evaluation of the different foodstuffs

Food	Product	(mg)	eucaryot. PCR	species- specific PCR	Concentration (µg/ml)	Absorption Ratio A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Yield (µg/100 mg)
Soybean	flour	300	+/+	+/+	625/485	1.45/1.50	10.4/8.1
	drink 1	300	+/+	+/+	60/58		< 1
	drink 2	300	-/-	-/-	47/44		< 1
	tofu 1	300	+/+	+/+	324/315	1.80/1.81	5.4/5.3
	tofu 2	300	+/+	+/+	281/307	1.76/1.75	4.7/5.1
	sausage 1	300	+/+	+/+	396/392	1.74/1.75	6.6/6.5
	sausage 2	300	+/+	+/+	345/339	1.68/1.75	5.8/5.7
	sauce	300	+/-	-/-	out/out		< 1
	bread with soy sauce	300	+/+	-/-	624/532	1.77/1.76	10.4/8.9
	Corn	flour	300	+/+	+/+	289/388	1.78/1.79
polenta grits 1		300	+/+	+/+	312/272	1.71/1.68	5.2/4.5
polenta grits 2		300	+/+	+/+	124/90	1.61/	2.1/1.5
popped popcorn 1		60	+/+	+/-	63/47		5.3/3.9
popped popcorn 2		60	+/+	+/+	61/97		5.1/8.1
tortilla chips 1		300	+/+	+/+	418/448	1.80/1.79	7.0/7.5
tortilla chips 2		300	+/+	+/+	35/24		< 1
starch 1		300	+/-	-/-	out/out		< 1
starch 2		300	+/+	-/-	out/out		< 1
extruded chips 1		300	+/+	+/+	562/597	1.80/1.78	9.4/10.0
extruded chips 2		300	+/+	+/-	517/446	1.75/1.75	8.6/7.4
refined oil		300	-/-	-/-	out/out		< 1

Food	Product	(mg)	eucaryot. PCR	species- specific PCR	Concentration (µg/ml)	Absorption Ratio A ₂₆₀ :A ₂₈₀	Yield (µg/100 mg)	
Potato WIZARD™	cooked sliced 1	300	+/+	+/-	out/23		< 1	
	cooked slices 2	300	+/+	+/+	46/out		< 1	
	french fries	300	+/+	+/+	out/out		< 1	
	chips	300	+/+	+/+	180/171	1.83/1.98	3.0/2.9	
	dried/mashed	200	+/+	+/+	23/27		< 1	
	extruded chips 1	300	+/+	+/+	76/61		1.3/< 1	
	extruded chips 2	300	+/+	+/+	62/88		< 1/1.5	
	extruded chips 3	300	+/+	+/+	23/31		< 1	
	extruded chips 4	300	+/+	+/+	out/43		< 1	
	extruded chips 5	300	+/+	+/+	20/23		< 1	
	extruded chips 6	300	+/+	+/+	out/23		< 1	
	extruded chips 7	300	+/+	+/+	36/25		< 1	
	Potato CTAB	cooked slices 1	350	+/+	+/-	64/67		< 1
		cooked slices 2	350	+/+	+/-	86/74		1.2/1.1
french fries		350	+/+	+/+	302/186	2.16/2.06	4.3/2.7	
chips		100	+/+	+/+	473/456	2.16/2.17	23.7/22.8	
dried/mashed		100	+/+	+/+	113/103	2.20/2.32	5.7/5.2	
extruded chips 1		100	+/+	+/-	264/246	2.23/2.15	13.2/12.3	
extruded chips 2		100	+/+	+/-	211/308	2.15/2.13	10.6/15.4	
extruded chips 3		100	+/+	+/+	107/117	2.26/2.18	5.4/5.9	
extruded chips 4		100	+/+	+/+	50/51		2.5/2.6	
extruded chips 5		100	+/+	+/+	43/43		2.2/2.2	
extruded chips 6		100	+/+	+/+	44/54		2.2/2.7	
extruded chips 7		100	+/+	+/+	56/72		2.8/3.6	
Tomato		fresh	300	+/+	nd	out/out		< 1
		peeled (pelati)	300	+/+	nd	out/out		< 1
	concentrate	300	-/-	nd	49/57		< 1	
	puree	300	+/+	nd	out/out		< 1	
	ketchup	300	+/-	nd	out/out		< 1	

Food	Product	(mg)	eucaryot. PCR	species- specific PCR	Concentration (µg/ml)	Absorption Ratio A ₂₆₀ :A ₂₈₀	Yield (µg/100 mg)
Wheat	whole grains	300	+/+	nd	33/39		<1
	flour	300	+/+	nd	678/879	1.76/1.80	11.3/14.7
	toast bread 1	300	+/+	nd	642/633	1.74/1.75	10.7/10.6
	toast bread 2	300	+/+	nd	518/434	1.77/1.77	8.6/7.2
	extruded flakes 1	300	+/+	nd	414/436	1.77/1.76	6.9/7.3
	extruded flakes 2	300	+/+	nd	477/643	1.74/1.75	8.0/10.7
Rice	grains	300	+/+	nd	101/122	2.04/1.89	1.7/2.0
	waffles	200	+/+	nd	72/101	/1.70	1.8/2.5
Sugar	cane	300	+/+	nd	29/36		<1
	cane raw	300	-/-	nd	out/20		<1
	caramel 1	300	-/-	nd	out/out		<1
	caramel 2	300	-/-	nd	out/out		<1
	caramelized	300	-/-	nd	out/out		<1
	powdered	300	+/-	nd	out/out		<1
	rock	300	+/-	nd	28/30		<1
	refined	300	-/-	nd	out/out		<1
	cube	300	-/-	nd	out/out		<1

+ amplification band. - no amplification band.

nd = not determined. out = Absorption measurement too low.

Soybean products

The soy product samples yielded DNA in the range of <1 to 10 µg DNA/100 mg product with an absorption ratio $A_{260}:A_{280}$ between 1.45 and 1.8. The lower ratio at 1.45 indicates the presence of proteins in the DNA fraction whereas the ratio at 1.8 indicates pure DNA. With the eucaryote PCR system one soy drink and the soy sauce showed no or only faint amplification bands, respectively. Further analysis with the soy-specific PCR system showed that, in addition to these two products, bread with the soy sauce did not yield amplification bands whereas the other products displayed clear amplification bands. It can be concluded that analysis of tofu, soy sausages and soy flour can generate a positive amplification signal, whereas soy drink, soy sauce and bread with soy sauce might not or not always be suitable for this type of analysis.

Corn products

The corn product samples yielded DNA in the range of <1 to 10 µg DNA/100 mg product with an absorption ratio $A_{260}:A_{280}$ between 1.6 and 1.8, which still indicates a good purity of the DNA. However, although popped popcorn is only heated, very low amounts of DNA could be extracted. It seems that popping either is destroying the DNA by the applied pressure/heat or alternatively that the DNA cannot be extracted from the cells with the applied extraction method. On the other side, the extruded corn chips contain the highest amount of extractable DNA among the corn samples analysed. Interestingly tortilla chips from different manufacturers varied at least 10-fold with regard to yields of extracted DNA. With the exception of refined oil all investigated corn derived foodstuffs yielded a positive amplification signal with the eucaryote-specific PCR system indicating the presence of amplifiable plant DNA. A further corn-specific PCR showed that starch and oil did not yield amplification bands. It can be concluded that analysis of polenta grits, corn meal, extruded chips, tortilla flour and ready-to-eat popcorn can potentially generate a positive signal for low copy number genes, whereas refined oil and starch are probably not suitable for DNA analysis.

Potato products

The potato product samples yielded around 1 µg DNA/100 mg product with an absorption ratio $A_{260}:A_{280}$ between 1.8 and 2.0 when the Wizard™ method was used for extraction. The value of 2.0 indicates the presence of RNA in the final extract. The amount of extracted DNA could considerably be increased in all types of potato products, when the CTAB method was used which yielded DNA (RNA) in the range of up to 23 µg DNA(RNA)/100 mg product with an absorption ratio $A_{260}:A_{280}$ between 2.1 and 2.3. As with the Wizard™ method, the higher values of the ratio $A_{260}:A_{280}$ indicate the presence of RNA. Since no RNase treatment was used in the procedure this was expected. For this reason, it is advisable to introduce an RNase treatment in the CTAB procedure.

The DNA of all potato product samples could be amplified with the eucaryote PCR system. When the potato-specific PCR system was used, both methods resulted in amplification bands of similar intensity. This indicates an overestimation of the DNA content for the CTAB samples due to the presence of RNA. Since DNA extraction and amplification from potato products were successful for all evaluated samples, the analysed potato products are suitable for the analysis of DNA.

Tomato products

The investigated tomato products yielded amounts of DNA which are lower than 1 µg DNA/100 mg product. In four out of five cases the DNA could be amplified with the eucaryote-specific PCR system. However, in the case of tomato concentrate where the highest amount of DNA could be extracted, no amplification could be observed. This indicates that the DNA may be fragmented, i.e. too small to be amplified. Due to the lack of a species-specific PCR system this type of experiment could not be performed for tomato and the following products.

Wheat products

The analysed wheat products yielded up to 14 µg DNA/100 mg product and could all be amplified with the eucaryote-specific PCR system. The ratio $A_{260}:A_{280}$ between 1.75 and 1.8 indicates a good purity of the DNA. Interestingly, the least processed product (grains) yielded the lowest amount of DNA with the Wizard™ method. The reason for this observation is not yet clear.

Rice products

The two analysed rice products yielded extractable DNA around 2 µg/100 mg of product and showed positive results for amplification with the eucaryote PCR-system.

Sugar products

All the analysed sugar products can be considered as highly processed. Therefore it is clear that only traces of DNA can be extracted. Still, clear amplification results with the eucaryote PCR system can be observed for cane sugar.

This study, which is far from showing a complete overview on all possible food-stuffs, shows how much DNA can be extracted from a certain food stuff and if it can be amplified with a eucaryote- or a species-specific PCR system. Much more information on the best extraction methods and the yield/quality of the DNA has to be accumulated during the next years in order to apply the optimal condition for analysis of a specific foodstuff.

Acknowledgments

We thank Drs. Jürg Lüthy and Christian Wolf for sharing with us the sequences for the plant-specific primers of the potato products before publication, Isabelle

Dahinden for critically reading the manuscript and Marius Grand for the translation of the summary into French.

Summary

With the enforcement of mandatory labelling of genetically modified foodstuffs in Europe, methods for their analysis are getting more and more important. Because of the nature of the genetic modifications, methods based on DNA analysis were developed first. In order to evaluate the extractability and the amplificability of DNA, 55 food products derived from soybean, corn, potato, rice, sugar beet, tomato and wheat were analysed for their DNA content. DNA fragments were subsequently amplified with PCR. In most cases where DNA was extractable, amplification was feasible with a eucaryote-specific PCR system. In addition, DNA of foodstuffs derived from corn, soybean and potato were amplified with a species-specific PCR for the detection of low copy number genes. No DNA could be extracted from refined sugar and oil, whereas all other food samples yielded DNA. Furthermore, potato samples were extracted with the CTAB extraction method since the WizardTM column method yielded only very low amounts of DNA. These results show that DNA can be extracted from a wide variety of foodstuffs and processing stages.

Zusammenfassung

Durch den Vollzug der Deklaration gentechnisch veränderter Lebensmittel in Europa, werden Analysemethoden für diese immer wichtiger. Wegen der Art der gentechnischen Veränderung wurden zuerst Methoden auf der Basis der Nukleinsäuren-Detektion (DNA) entwickelt. Um die Extrahier- und die Amplifizierbarkeit der DNA aus Lebensmitteln zu evaluieren, wurde aus 55 Lebensmitteln (hergestellt aus Sojabohnen, Mais, Kartoffeln, Zuckerrüben, Tomaten und Weizen) die DNA extrahiert und mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. In den meisten Fällen, wo DNA extrahiert werden konnte, war eine Amplifikation mit einem eukaryontenspezifischen PCR System erfolgreich. Zusätzlich wurden die Soja-, Mais- und Kartoffelprodukte mit einem artspezifischen PCR System amplifiziert, welches eine Detektion von wenigen Kopien erlaubt. Es konnte keine DNA aus raffiniertem Öl und Zucker gewonnen werden. Bei allen anderen Lebensmitteln konnte DNA extrahiert werden. Die Kartoffelprodukte wurden zusätzlich mit der CTAB-Methode extrahiert, weil die WizardTM Methode nur wenig DNA lieferte. Die vorliegenden Resultate zeigen, dass aus einer grossen Anzahl von verschiedenen prozessierten Lebensmitteln amplifizierbare DNA extrahiert werden kann.

Résumé

En Europe, l'obligation de déclarer les denrées alimentaires fabriquées à partir d'organismes génétiquement modifiés demande l'application de méthodes analytiques appropriées. De par la nature des modifications génétiques apportées, les

méthodes ont d'abord été développées pour détecter les acides nucléiques (ADN). 55 aliments (fabriqués à partir de soja, de pommes de terre, de betteraves à sucre, de tomates et de blé) ont été examinés dans le but d'évaluer l'extraction et l'amplification de l'ADN, amplification réalisée au moyen de la méthode PCR. Pour presque chaque échantillon où l'ADN a pu être extrait, l'analyse PCR spécifique à l'eucaryote a été réalisée avec succès. De plus, l'ADN des produits faits à base de soja, de maïs et de pommes de terre a été amplifié avec un système PCR spécifique à la plante qui détectait un faible nombre de copies. Aucun ADN n'a été détecté dans l'huile raffinée et le sucre. Tous les autres aliments examinés contenaient de l'ADN. Les produits à base de pommes de terre ont été extraits avec la méthode CTAB car la méthode WizardTM ne permettait pas une extraction suffisante d'ADN. Les résultats démontrent que l'ADN peut être extrait et amplifié à partir d'une grande variété de denrées alimentaires transformées.

Key words

Genetically modified organisms, Qualitative PCR, Extraction methods

References

- 1 *Pietsch, K., Waiblinger, H.U., Brodmann, P. and Wurz, A.*: Screeningverfahren zur Identifizierung «gentechnisch veränderter» pflanzlicher Lebensmittel. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **93**, 35–38 (1997).
- 2 *Jankiewicz, A., Broll, H. and Zagon, J.*: The official method for the detection of genetically modified soybeans (German food act LMBG §35): a semi-quantitative study of sensitivity limits with glyphosate-tolerant soybeans (Roundup Ready) and insect-resistant maize (Maximizer). *Eur. Food Res. Technol.* **209**, 77–82 (1999).
- 3 *Zimmermann, A., Lüthy, J. and Pauli, U.*: Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensm. Wiss. Technol.* **33**, 210–216 (2000).
- 4 *Allmann, M., Candrian, U., Höfelein, C. and Lüthy, J.*: Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **196**, 248–251 (1993).
- 5 *Zimmermann, A., Lüthy, J. and Pauli, U.*: Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **207**, 81–90 (1998).
- 6 *Tinker, N.A., Fortin, M.G. and Mather, D.E.*: Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* **85**, 976–984 (1993).
- 7 *Studer, E., Dahinden, I., Lüthy, J. and Hübner, P.*: Nachweis des gentechnisch veränderten «Maximizer»-Mais mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **88**, 515–524 (1997).
- 8 *Meyer, R., Chardonens, F., Hübner, P. and Lüthy, J.*: Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **203**, 339–344 (1996).
- 9 *Wolf, C. and Lüthy, J.*: Development of a PCR for detection of rapeseed and other cruciferae. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **91**, 352–355 (2000).

Corresponding author: Urs Pauli, Swiss Federal Office of Public Health,
CH-3003 Bern, E-mail: urs.pauli@bag.admin.ch

Beurteilung der Selenversorgung von Säuglingen in der Schweiz

Bernhard Zimmerli, Max Haldimann und Annabelle Blanc-Mompert, Bundesamt für Gesundheit, Sektion Lebensmittelchemie und -analytik, Bern

Eingegangen 29. Februar 2000, angenommen 6. Juli 2000

Einleitung

Für den termingerecht geborenen Säugling ist während der ersten 4–6 Monate seines Lebens Muttermilch und/oder kommerzielle Säuglingsanfangsnahrung die einzige Nahrungsquelle. Diese muss daher alle für eine optimale Entwicklung des Neugeborenen notwendigen Nährstoffe (Lipide, Proteine, Laktose, Vitamine, Spurenelemente) in den benötigten Mengen und geeigneten chemischen Formen enthalten. In den ersten sechs Lebensmonaten verlaufen verschiedene metabolische Prozesse besonders intensiv, andere sind dagegen noch nicht (voll) ausgebildet. Der Säugling reagiert daher häufig anders und empfindlicher als Erwachsene oder Schulkinder auf einen Mangel an essentiellen (z.B. Iod) und/oder ein Zuviel an essentiellen oder potentiell gesundheitsgefährdenden Spurenstoffen (z.B. Blei).

Die Milchproduktion ist ein komplexer Prozess, wobei bezüglich der Menge und Zusammensetzung der Milch Ernährungsfaktoren, Hormon- und Verhaltensinflüsse eine Rolle spielen. In der Milch gesunder, normal ernährter Mütter wird die Konzentration einiger der essentiellen Spurenelemente, wie z.B. Iod und Selen, vorwiegend durch die Zusammensetzung der täglichen Nahrung bestimmt, wodurch die ausreichende Versorgung der Säuglinge nicht a priori sichergestellt ist. Andererseits sind diese beiden Spurenelemente für die Entwicklung und Funktion des Schilddrüsenhormonsystems von grosser Bedeutung (selenhaltige Deiodinasen, Peroxidasen und Thioredoxinreduktasen). Die Konzentration anderer Spurenelemente in der Muttermilch, wie z.B. Eisen, Kupfer, Zink sowie die Mineralstoffe Kalium, Phosphor, Calcium und Magnesium, scheinen demgegenüber weitgehend unabhängig von der mütterlichen Diät zu sein. Im Verlauf der Laktation vermindert sich die Konzentration der essentiellen Spurenelemente, je nach Element verschieden stark, wobei das Kolostrum in der Regel stets die höchste Konzentration aufweist (1–7).

Selen wurde im Vergleich zu anderen Spurenelementen erst relativ spät, Ende der 50er Jahre dieses Jahrhunderts, als essentiell erkannt, wobei seine Funktion als Antioxidans eng mit jener von Vitamin E verknüpft ist. In den letzten zehn Jahren hat sich immer deutlicher gezeigt, dass die Bedeutung des Selen für die optimale Funktion des Organismus vielschichtiger ist als ursprünglich angenommen. So existieren, neben der Niere, auch Regulationsmechanismen auf molekularer Ebene, die dafür sorgen, dass bei einer ungenügenden Selenversorgung dieses bevorzugt zu bestimmten Geweben und Organen transportiert wird. Zu diesen gehören in erster Linie das Gehirn, die endokrinen Drüsen (z.B. Schilddrüse) sowie die Fortpflanzungsorgane. Die Familie der selenabhängigen Glutathionperoxidasen (GSH-P_x), denen früher als Bestandteile des antioxidativen Systems des Organismus (Desaktivierung von endogenem H₂O₂ und Hydroperoxiden) grosse Bedeutung zugeschrieben wurde, scheinen hingegen eher von sekundärer Bedeutung zu sein. Dies obwohl die GSH-P_x zu den potentesten antioxidativ wirkenden Enzymen des Körpers gehören. In den biologisch aktiven Proteinen ist Selen ausschliesslich in Form von Selenocystein, häufig als 21. essentielle Aminosäure bezeichnet, enthalten. Selenocystein wird im Körper synthetisiert, höchst wahrscheinlich via Serin und Selenophosphat und direkt in Proteine eingebaut (8–11).

Direkte pathogene Effekte eines Selenmangels wurden beim Menschen bisher nur bei langandauernder parenteraler Ernährung (ohne Selenzusätze) beobachtet, z.B. selenabhängige Myopathie der quergestreiften Muskulatur. Der typische Zusammenhang zwischen einem Selenmangel und pathologischen Veränderungen besteht darin, dass der Mangel zwar latente Störungen im Organismus bewirkt, die aber erst beim Vorhandensein weiterer pathogener Faktoren (z.B. Mangel an Vitamin E) zu effektiven Erkrankungen führen. Betroffen sind dabei in erster Linie die Herz- und Skelettmuskulatur, Pankreas und Leber (8–10).

Die Selenversorgung des Menschen geschieht über die Nahrung, wobei die Selenkonzentration der Nahrungs- und Futterpflanzen durch jene der Böden und die biologische Verfügbarkeit des Selen bestimmt wird. Obwohl die Schweiz bezüglich der Selenkonzentration einheimischer Pflanzen als Mangelgebiet einzustufen ist, konnte gezeigt werden, dass die Bevölkerung, insbesondere die erwachsene, einen gemäss den Empfehlungen angemessenen Selenstatus aufweist. Das Selen stammt im Mittel je etwa zur Hälfte aus Lebensmitteln tierischer Herkunft und selenreichem nordamerikanischem Getreide. In die Lebensmittel tierischer Herkunft gelangt es grösstenteils via Futter, da die Nutztiere zur Erhaltung ihrer Gesundheit mit Selen supplementiert werden (12–16).

Die aus ernährungsphysiologischer Sicht empfohlenen täglichen Selenzufuhren bewegen sich für Erwachsene, bei im Übrigen ausgewogener Ernährung, im Bereich von 20–75 µg/Tag (D, UK, USA, EU), entsprechend 0,3–1 µg/kg Körpermasse (KM)/Tag. Demgegenüber wurden im Hinblick auf die vermutete präventive Wirkung des Selen gegenüber chronisch-degenerativen Erkrankungen, wie Krebs und Herz-Kreislauf, Zufuhrmengen von 200–400 µg vorgeschlagen (zit. nach

17), entsprechend 3–7 µg/kg KM/Tag. Solche Mengen können in den allermeisten Gegenden Europas nicht durch die übliche Nahrung, sondern nur durch Supplemente erreicht werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Bewertungsgrundlagen zum Selenstatus gestillter und mit der Flasche ernährter Säuglinge zu erarbeiten. Weiter wird beabsichtigt, den Wissensstand zu Selen im Zusammenhang mit Geburt, Neugeborenen und Säuglingen (Bedarf, Toxizität) anhand der Literatur zu diskutieren und zusammenzufassen sowie im Hinblick auf künftige Stuserhebungen quantitative Zusammenhänge zwischen der Selenkonzentration der Muttermilch und jener des Blutplasmas/-serums¹ vorzugsweise von nicht schwangeren und nicht laktierenden Frauen (Mehrheit der Bevölkerung) sowie der mittleren täglichen Selenzufuhr entsprechender Kollektive zu etablieren.

Angaben aus der Literatur

Konzentration in der Muttermilch

Wie die anhand der Literatur zusammengestellten Daten in Tabelle 1 zeigen, enthält das als protein- und mineralstoffreich bekannte *Kolostrum* (0.–4. Tag nach der Geburt) die höchste Selenkonzentration. Jene der *transitorischen* Milch (5.–10./11. Tag) ist im Mittel (arithmetischer Mittelwert, ±Standardfehler) um $48 \pm 5\%$ ($n=11$) geringer als die des Kolostrums, entsprechend einem Faktor $2,1 \pm 0,2$. Diejenige der *reifen* Milch (> 11./12. Tag) liegt im Mittel um rund $27 \pm 5\%$ ($n=11$) tiefer als die transitorische, entsprechend einem Faktor $1,4 \pm 0,1$ und das Verhältnis der Selenkonzentration im Kolostrum zu jener in reifer Muttermilch beträgt im Mittel $2,9 \pm 0,3$ ($n=11$).

Die *Variationskoeffizienten* der Selenkonzentration der Muttermilch innerhalb eines Kollektivs (Mittelwert ± Standardfehler) liegen bei $50 \pm 7\%$ ($n=11$) für das Kolostrum, bei $32,2 \pm 3,0\%$ ($n=8$) für transitorisch sowie bei $26 \pm 4\%$ ($n=9$) für reife Milch. Tendenziell zeigt das Kolostrum die höchste individuelle Variation der Selenkonzentration innerhalb eines Kollektivs (Tabelle 1).

In der Zeit vom 12. bis 30. bzw. 50. Tag nach der Geburt ist die Selenkonzentration der *reifen Milch* etwa konstant (18, 19, 31) und nimmt anschliessend tendenziell weiter ab. Diese Abnahme in der Zeit von etwa dem 30. Tag bis zum 90. Tag bzw. 180. Tag nach der Geburt beträgt anhand der Daten in Tabelle 1 sowie jenen aus zehn weiteren Arbeiten (26, 28, 31–38) im Mittel (±Standardfehler) $1,7 \pm 0,2\%$ pro Woche ($n=15$), entsprechend einer formalen biologischen *Halbwertszeit* für diese Laktationsperiode von 290 ± 50 Tage. Anhand japanischer und griechischer Daten kann die formale biologische Halbwertszeit der Selenkonzentration des Kolostrums eines Kollektivs auf rund 1,6 und jene der transitorischen Milch auf sechs Tage geschätzt werden (22, 23).

¹ Die Selenkonzentration des Serums und Plasmas ist praktisch identisch.

Tabelle 1

Mittlere Selenkonzentration in Muttermilch verschiedener Länder als Funktion der Zeit nach der Geburt

Land	Jahr ¹	Kolostrum ² (0.-4. Tag) (ng/ml)	Transitorische ² (5.-11./12. Tag) (ng/ml)	Reife ² (> 11./12. Tag) (ng/ml)	Abnahme (vom 1.-3./6. Monat) (%/Woche)	Literatur
Verschiedene						
Griechenland	1978	48,0 (-) ³	16,0 (-)	15,0 (-)	- ³	zit. nach 18
USA (Illinois)	1982*	41,2 (42,0)	- ³ (-)	16,3 (30,0)	1,9	9
Japan	1983*	80,0 (-)	29,0 (-)	17,7 (-)	-	20
Belgien	1983	15,3 (33,3)	12,9 (31,0)	9,9 (26,3)	-	21
Griechenland	1988	41,0 (39,0)	23,0 (26,0)	17,0 (17,6)	1,5	22
Japan	1991	29,7 (-)	18,9 (-)	10,8 (-)	-	zit. nach 18
Japan	1991	47,0 (89,0)	24,0 (54,2)	9,7 (40,0)	1,9	23
Polen	1998*	25,5 (65,1)	11,0 (30,0)	9,1 (33,0)	1,7	24
Spanien	1998*	35,0 (64,3)	15,3 (32,7)	11,7 (35,9)	-	25
Österreich (Graz)	1995/96	23,9 (50,2) ⁴	18,2 (22,0) ⁵	11,6 (20,0)	-	26
Deutschland						
Düsseldorf	1976/77	83,5 (26,1)	30,5 (-)	28,3 (-)	-	27
Lübeck, Würzburg	1983/85	- (-)	16,5 (27,3)	14,9 (26,6)	1,4	28
München	1988*	43,0 (41,9)	21,0 (28,6)	- (-)	-	29
Düsseldorf	1989/90	- (-)	- (-)	9,9 (5,1)	-	30

¹ Jahr der Probenahme, falls mit * gekennzeichnet Publikationsjahr.² Arithmetischer Mittelwert, in Klammern Variationskoeffizient, falls in der Literatur aufgeführt.³ Keine Angaben⁴ 0.-7. Tag⁵ 9.-12. Tag

Neben der Zeit nach der Geburt und insbesondere der Ernährung sowie der chemischen Form des Selen in der Nahrung (36, 37) wird die Selenkonzentration der Muttermilch auch durch das *Stillen* beeinflusst, denn sie ist nach dem Stillen höher als zu Beginn. Basierend auf vier Arbeiten berechneten wir für das mittlere Konzentrationsverhältnis vor und nach dem Stillen einen Wert von $1,18 \pm 0,04$ (\pm Standardfehler) (19, 28, 39, 40).

Beziehungen zwischen täglicher Zufuhr und Konzentration in Muttermilch und Blutplasma bzw. -serum

Dass die Selenkonzentration der Muttermilch in erster Linie durch die Selenzufuhr via Nahrung bestimmt wird, scheint unbestritten (4, 18, 28, 31). Verschiedene Studien ergaben allerdings zwischen der Selenkonzentration *individueller* Muttermilchproben bzw. des Blutplasmas oder -serums und der jeweiligen täglichen Selenzufuhr keine (36, 41) bzw. nur schwache positive Korrelationen (20, 21, 35, 39). Bezüglich der individuellen Serum- und Milchselenkonzentration wurde sowohl ein positiver (40) wie ein fehlender Zusammenhang beobachtet (39).

Wie bereits in einer früheren Arbeit festgehalten (12), existieren entsprechende Beziehungen zwischen den erwähnten Parametern nur dann, wenn stationäre Zustände vorliegen. In Anbetracht der biologischen Halbwertszeit des via Nahrung zugeführten «natürlichen» Selen im Mensch von schätzungsweise 80–160 Tagen sind solche näherungsweise dann zu erwarten, wenn die Mittelwerte der erwähnten Parameter verschiedener *Kollektive* einander gegenübergestellt werden. Solche Beziehungen zwischen mittlerer täglicher Zufuhr und mittlerer Plasma- bzw. Serum- oder Muttermilchselenkonzentration wurden verschiedentlich publiziert, meist in log-log-Verknüpfung (31, 42), gelegentlich aber auch in linearer Form (12, 28). So erlaubte die Auswertung publizierter Daten durch *Brätter* und Mitarbeiter, die folgende Beziehung zu berechnen (x = mittlere tägliche Selenzufuhr in $\mu\text{g}/\text{Tag}$, y = mittlere Selenkonzentration der Muttermilch in ng/ml): $y = 1,75 + 0,20 x$, gültig für den Bereich $x \leq 500 \mu\text{g}/\text{Tag}$, Anzahl Datenpaare $n = 16$, $r^2 = 0,989$ (28). Leider sind die in der publizierten Beziehung ermittelten Konstanten praktisch nie mit den entsprechenden Fehlergrenzen versehen, so dass sich die Unsicherheit derart geschätzter Werte nicht ermitteln und beurteilen lässt.

Anhand der in der Tabelle A des Anhangs enthaltenen Daten wurden mittels linearer Regression durch den Ursprung entsprechende Berechnungen vorgenommen, deren Ergebnisse in Tabelle 2 zusammengestellt sind. Dabei wurde so vorgegangen, dass erstens nur Wertpaare berücksichtigt wurden, die das lineare Regressionsmodell erfüllten, entsprechend $y = a + bx + e_i$, wobei die Residuen e_i normal verteilt sein müssen. Falls sich nach erfolgter Rechnung a als nicht verschieden von Null erwies, wurde zweitens das plausible Modell $y = bx$ angewendet. Des Weiteren wurden nur Daten von Kollektiven korreliert, die nicht mit Selen supplementiert waren.

Tabelle 2

Ergebnisse der linearen Regressionsrechnungen

y	x	Regressionsmodell ¹ $y = b \cdot x$	Verwendete Daten ² Nr.	n^3	$b \pm t_{0,5} \cdot s$ (b) ⁴ (Einheiten)	r^5	Bereich von x^6
Reife Muttermilch	mittlere tägliche Zufuhr		1-7, 10, 14, 16, 18	11	$0,226 \pm 0,0157$ (ng/ml/ μ g/Tag)	0,995	≤ 100 μ g/Tag
Reife Muttermilch	Plasma/Serum-Konzentration		1-9, 11-17	16	$0,134 \pm 0,007$ (ng/ml/ng/ml)	0,995	≤ 140 ng/ml
Plasma/Serum	mittlere tägliche Zufuhr		1-7, 14, 16	9	$1,75 \pm 0,11$ (ng/ml/ μ g/Tag)	0,997	≤ 100 μ g/Tag

¹ y = Selenkonzentration der reifen Muttermilch (≥ 1 Monat nach Geburt) bzw. des Plasma/Serums nicht laktierender, nicht schwangerer Frauen (ng/ml), x = mittlere tägliche Selenzufuhr nicht laktierender, nicht schwangerer Frauen (μ g/Tag), bzw. entsprechende Plasma-/Serumkonzentration (ng/ml).

² Verwendete Daten gemäss der Nummerierung in Tabelle A des Anhangs.

³ Anzahl zur Rechnung verwendeter Datenpaare.

⁴ Steigung der Regressionsgeraden durch den Ursprung $\pm 95\%$ -Vertrauensbereich.

⁵ Korrelationskoeffizient

⁶ für welche die Beziehungen gelten bzw. abgeleitet wurden

⁷ Zusammen mit den Daten von Brätter und Mitarbeitern (28) wird im Folgenden ein Wert von $0,22 \pm 0,02$ ng/ml/ μ g/Tag angewendet (siehe Text).

Im Mittel der verschiedenen Kollektive ergibt sich für das Verhältnis der Selenkonzentration reifer Muttermilch (y , ng/ml) zu mittlerer täglicher Selenzufuhr (x , µg/Tag) ein Wert von $0,226 \pm 0,015$ ng/ml pro µg und Tag (Tabelle 2). Einen mit $0,214 \pm 0,015$ ng/ml/µg/Tag ($\pm 95\%$ Vertrauensbereich, $n=13$) dazu vergleichbaren Wert erhielten wir aus der Datenzusammenstellung von Brätter (28), wenn für x nur Werte ≤ 230 µg/Tag berücksichtigt und das Modell $y = bx$ zugrunde gelegt wurde. Anhand einer Zusammenstellung finnischer Daten wird ein Wert von $0,22 \pm 0,02$ ng/ml/µg/Tag (\pm Standardfehler, $n=5$) erhalten (43). Zur Beurteilung des Selenstatus eines Kollektivs anhand der mittleren Selenkonzentration von reifen Muttermilchproben scheint somit ein Proportionalitätsfaktor von $0,22 \pm 0,02$ ng/ml pro täglich im Mittel zugeführtes Mikrogramm Selen «natürlicher» Herkunft ein vernünftiger Ansatz zu sein.

Wird im Mittel von einer täglich sezernierten Milchmenge von 700–850 ml ausgegangen, ergibt sich mit dem erwähnten Proportionalitätsfaktor, dass in einem stationären Zustand formal rund 15–20% der im Mittel täglich zugeführten Selenmenge in die Muttermilch übergeht. Demgegenüber zeigten Versuche mit stabilen Selenisotopen an laktierenden Frauen, dass bei einer täglichen Grundzufuhr von etwa 70 µg Selen von einer zusätzlichen oralen Selendosis (ca. 25 µg als L-Selenomethionin und ca. 40 µg als Selenit) innerhalb von zwei Tagen nur rund 2,5% der Selenomethionindosis und rund 0,4% jener von Selenit in die Milch gelangen, obwohl die scheinbaren Retentionen dieser Stoffe bei rund 85% bzw. bei etwa 45% lagen² (44). Offenbar wird das zusätzlich zugeführte Selen im Körper vor der weiteren Verwendung grösstenteils zwischengespeichert, mindestens bei einer Grundzufuhr im Bereich von etwa 70 µg/Tag. Zudem ist darauf hinzuweisen, dass im Hinblick auf eine Beurteilung des Selenstatus die Ermittlung des Proportionalitätsfaktors auf der Zufuhr nicht laktierender und nicht schwangerer Frauen basiert. Da schwangere oder laktierende Frauen infolge des veränderten Metabolismus einen erhöhten Nahrungsbedarf aufweisen (1), ist auch deren tägliche Selenzufuhr erhöht (35).

Für das Verhältnis der mittleren Selenkonzentration von reifer Muttermilch (y , ng/ml) zu jener im Blutplasma bzw. -serum (x , ng/ml) nicht laktierender Frauen erhielten wir anhand der Daten unterschiedlicher Kollektive (Tabelle A, Anhang) einen Wert von $0,134 \pm 0,007$ ng/ml/ng/ml ($\pm 95\%$ Vertrauensbereich) (Tabelle 2). Die Selenkonzentration im Blutserum nicht laktierender Frauen ist also im Mittel 7,5 \pm 0,4-mal grösser als jene in der Muttermilch. Für 14 laktierende Frauen wurde in guter Übereinstimmung ein entsprechendes Verhältnis (\pm Standardfehler) von $6,9 \pm 1,8$ bestimmt (45). Ein ähnliches Verhalten zeigen diesbezüglich Kupfer und Eisen mit Faktoren von rund 3 respektive 2, was darauf hindeutet, dass Neugebo-

² Bei nicht laktierenden Frauen lag die scheinbare Selenretention für oral verabreichtes Selenit infolge höherer Ausscheidung im Urin bei rund 30%.

rene mit einem Vorrat an diesen Elementen geboren werden. Dies im Gegensatz zu anderen Elementen wie Zink, Mangan und Kalium, die in der Muttermilch in höheren Konzentrationen enthaltenen sind als im Blutserum, mindestens in den ersten Laktationswochen (28, 45).

Der Zusammenhang zwischen *täglicher Selenzufuhr* (x , $\mu\text{g}/\text{Tag}$) und dessen Konzentration im *Plasma oder Serum* (y , ng/ml) Erwachsener wurde bereits früher anhand von Literaturdaten von Kollektiven untersucht (12), allerdings nicht spezifisch für Frauen: $y = (23 \pm 7) + (1,12 \pm 0,11) x$. In der vorliegenden Arbeit (Tabelle A, Anhang) erhielten wir für die Steigung, der durch den Ursprung führenden Geraden $1,75 \pm 0,11 \text{ ng}/\text{ml}/\mu\text{g}/\text{Tag}$ (Tabelle 2). Dies ist in guter Übereinstimmung mit unseren früheren Ergebnissen anhand finnischer Daten, die $1,86 \pm 0,12 \text{ ng}/\text{ml}/\mu\text{g}/\text{Tag}$ ergaben (je mit 95 % Vertrauensbereich) (12).

Die Division des Proportionalitätsfaktors des Zusammenhangs reife Muttermilch – tägliche Zufuhr durch jenen des Zusammenhangs Plasma bzw. Serum – tägliche Zufuhr (Tabelle 2) ergibt für das Verhältnis der Selenkonzentration reifer Muttermilch zu Blutserum bzw. -plasma im Mittel $0,129 \pm 0,012 \text{ ng}/\text{ml}/\text{ng}/\text{ml}$. Die gute Übereinstimmung mit dem mittels linearer Regression direkt berechneten Wert von $0,134 \pm 0,007 \text{ ng}/\text{ml}/\text{ng}/\text{ml}$ (Tabelle 2) spricht für die Konsistenz der im Anhang in Tabelle A zusammengestellten und verwendeten Literaturdaten.

Tägliche Zufuhr und Serum/Plasmakonzentration im Säugling

Bei der Geburt liegt die Serumselenkonzentration eines Kollektivs von Neugeborenen im Mittel um 10–50 % unterhalb jener der Mütter. Mit steigendem Alter erhöht sie sich und erreicht bei Kindern ab 5–8 Jahren bereits jene von Erwachsenen (zit. nach 14, 46).

Verschiedene Studien zeigen, dass bei der Ernährung mit Muttermilch die Selenkonzentration im Plasma oder Serum des Säuglings von der Geburt bis zum 3. Monat etwa konstant bleibt bzw. tendenziell ansteigt, bei ausschliesslicher Ernährung mit Säuglingsanfangsnahrung auf Kuhmilchbasis aber zurückgeht bzw. konstant bleibt (19, 30, 34, 47). Diese Beobachtung scheint nicht durch eine bessere biologische Verfügbarkeit des Muttermilchselens, wie gelegentlich angenommen (48), sondern primär durch die im Vergleich zu Muttermilch im Mittel geringere Selenkonzentration der Säuglingsanfangsnahrung bedingt zu sein, wie nachstehend gezeigt wird.

Aus Untersuchungen mit *Muttermilch* (Tabelle B, Anhang) ergibt sich ein Verhältnis der Plasmaselenkonzentration der Säuglinge (Alter 4–17 Wochen) zur täglichen Zufuhr von im Mittel (\pm Standardfehler) $6,4 \pm 0,3 \text{ ng}/\text{ml}/\mu\text{g}/\text{Tag}$ ($n=7$). Bei Säuglingen von Müttern, die seit der Geburt Selensupplemente (Selenomethionin, Selenhefe) erhielten, beträgt das entsprechende Verhältnis $6,9 \pm 0,4 \text{ ng}/\text{ml}/\mu\text{g}/\text{Tag}$ ($n=5$) und bei solchen, die ausschliesslich mit Präparaten auf *Kuhmilchbasis* (ohne Supplemente) ernährt wurden, in ebenfalls guter Übereinstimmung $6,2 \pm 0,5 \text{ ng}/\text{ml}/\mu\text{g}/\text{Tag}$ ($n=9$). Die weitgehende Konstanz dieses Verhältnisses deutet darauf hin,

dass die biologische Verfügbarkeit von Muttermilchselen und Kuhmilchselen praktisch identisch ist.

Die Zusammenfassung aller Daten zu Muttermilch und Kuhmilch ($n=21$) ergibt für Säuglinge im Alter von vier bis 17 Wochen für das Verhältnis Serumseleknonzentration zu täglicher Zufuhrmenge an «natürlichem» Selen einen Mittelwert ($\pm 95\%$ Vertrauensbereich) von $6,4 \pm 0,5$ ng/ml/ μ g/Tag. Im Vergleich zu Erwachsenen ist dieses Verhältnis rund 4-mal grösser (Tabelle 2). Pro Mikrogramm täglich zugeführtes «natürliches» Selen (Mutter- oder Kuhmilch), resultiert somit bei einem Säuglingskollektiv eine mittlere Serumseleknonzentration, die etwa 4-mal höher liegt als bei Erwachsenen. Dies könnte erstens dadurch erklärt werden, dass deren Körpermasse etwa 10-mal geringer ist als jene Erwachsener und zweitens, dass die in den entsprechenden Studien (Tabelle B, Anhang) untersuchten Säuglinge mit Selen übergeliefert (Speicher) waren und/oder drittens die Exkretionsfunktionen in diesem Alter noch nicht voll ausgebildet sind bzw. viertens, dass Selen von Säuglingen effizienter absorbiert und rascher im Körper verteilt wird als bei Erwachsenen.

Andere Verhältnisse für die Plasmaselenkonzentration zur täglichen Zufuhr ergaben sich für ein Säuglingskollektiv bei Zusätzen von *anorganischem Selen* (Selenit zu Kuhmilchpräparat, Selenat zu Präparat auf Sojabasis) zu Säuglingsnahrung: Selenit $2,6 \pm 0,1$ ng/ml/ μ g/Tag ($n=3$) und Selenat $1,7 \pm 0,3$ ng/ml/ μ g/Tag ($n=2$). Dass «natürliches» Selen die Konzentration des Serums (und der Gewebe) stärker erhöht als anorganisches Selen, ist auch aus Studien bei Erwachsenen (und Tieren) bekannt. Wobei aber zwischen natürlichem Selen pflanzlicher Herkunft (v.a. Selenomethionin) und solchem tierischer Herkunft (v.a. Selenocystein) ebenfalls Unterschiede im Metabolismus existieren. Selenocystein wird im Organismus ähnlich metabolisiert wie anorganisches Selen und wird somit weniger unspezifisch gespeichert als Selenomethionin (zit. nach 16 und 17, 49).

Wird die «biologische Verfügbarkeit» des Muttermilchselsens für den Säugling als 100% angenommen, ergibt sich anhand der vorstehenden Daten formal folgende Reihenfolge: Muttermilchselen (ca. 100%) \approx Kuhmilchselen (ca. 90%) > Selenit (ca. 40%) > Selenat (ca. 25%), wenn als einziges Kriterium die Beeinflussung der Seleknonzentration im Plasma oder Serum der Säuglinge berücksichtigt wird³. In qualitativer Übereinstimmung dazu ergaben *In-vitro*-Verdauungsversuche für Magermilch, als häufigstes Ausgangsprodukt von Säuglingsnahrung, rund 70%, falls Muttermilch als 100% angenommen wird (50). Auf die Plasma-GSH-P_x-Aktivität als Kriterium der «Bioverfügbarkeit» wurde verzichtet, da diese gemäss neue-

³ Die Selenaufnahme scheint nicht homöostatisch geregelt zu sein. Für die scheinbare Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt Erwachsener gilt schätzungsweise: Selenomethionin \approx Selenocystein \approx Selenat (95–98%) > Selenit (ca. 60%) > Selen in Meerestieren. Anorganisches Selen wird effizienter via Urin ausgeschieden (Selenat > Selenit) als organisches Selen in Form von Selenomethionin. Mit Ausnahme von Selenocystein wird dieses im Körper effizienter gespeichert als anorganisches (48).

ren Erkenntnissen bei Neugeborenen, im Gegensatz zu Erwachsenen, möglicherweise kein geeigneter Parameter des Selenstatus ist (51).

Täglicher Bedarf

Über den Selenbedarf von Säuglingen ist wenig Genaues bekannt. Anhand der Erfahrungen mit *Labor- und Nutztieren* (mindestens 0,05 µg/g TM im Futter) kann eine formale minimale tägliche Zufuhr von 5 µg/Säugling berechnet werden, falls von einer täglichen Aufnahme von 100 g TM pro Tag und Säugling ausgegangen wird (zit. nach 17, 56), was etwa 1 µg/kg KM/Tag entspricht. Die doppelte Menge von 10 µg/Tag wurde 1989 vom *National Research Council* (NRC) der USA für die ersten 5–6 Lebensmonate und 15 µg für den 6. bis 11. Monat empfohlen, entsprechend 1,7–2,5 µg/kg KM/Tag. Diese Empfehlung basiert auf dem Bedarf Erwachsener (Sättigung der Plasma-GSH-P_x) und einem Faktor 2 als Wachstumskorrektur. Denn für Erwachsene empfiehlt dieses Gremium als «Recommended Dietary Allowance» (RDA) 0,87 µg/kgKM/Tag (52), was umgerechnet auf einen drei Monate alten Säugling rund 5 µg entspricht. In guter Übereinstimmung dazu schätzen die deutsche, österreichische und die schweizerische *Gesellschaft für Ernährung* die angemessene Zufuhr für Säuglinge auf 5–15 µg/Tag (0–<4 Monate) und 7–30 µg/Tag (4–<12 Monate) (53), entsprechend 1–3 µg/kg KM/Tag.

Tatsache scheint, dass der Säugling mit einem *Selenvorrat* in der Leber (Muskulatur, Blut und vermutlich der Schilddrüse) geboren wird. Dafür spricht auch, dass erstens die Selenkonzentration im Serum Schwangerer ab etwa der 16. Woche der Schwangerschaft stetig abnimmt und zum Zeitpunkt der Geburt, bei etwa gleichbleibender täglicher Zufuhr, den tiefsten Wert erreicht, der 15–45 % tiefer liegt als zu Beginn der Schwangerschaft (zit. nach 14, 54) und zweitens, dass die Selenkonzentration im Serum laktierender Mütter ca. 7-mal höher ist als in der Muttermilch.

Zudem scheint bei Säuglingen eine Serumselenkonzentration von 10–12 ng/ml, selbst bei Nullzufuhr, kurzfristig kaum unterschritten zu werden wie nachstehend gezeigt wird: Messungen an bis zu 12 Wochen parenteral (selenfrei) ernährten Säuglingen (⅓ davon Neugeborene) ergaben ab der fünften Woche (bis zur 12. Woche) eine im Mittel etwa konstante Serumselenkonzentration von 10–12 ng/ml (55). Diese Konzentration entspricht etwa jener von Kindern und Erwachsenen aus Gegenden Chinas, in denen die Keshan-Krankheit⁴ endemisch ist bzw. war (Tabelle A, Anhang). Aus dem Absinken der Selenkonzentration im Blutserum während den ersten fünf Wochen dieser parenteral ernährten Säuglinge von ursprünglich im Mittel 32 ng/ml auf 10–12 ng/ml ergibt sich anhand der publizierten Daten eine biologische Halbwertszeit von 20 ± 1 Tage, für die folgende Periode eine solche >100 Tage (55). Wird angenommen, dass bei Säuglingen eine Serumselenkonzentra-

⁴ Jugendliche Kardiomyopathie mit multifaktoriellem Hintergrund, die sich mittels Selenprophylaxe verhindern liess und insbesondere bei Kindern über 2 Jahren auftrat.

tion von 10 ng/ml physiologisch ausreichend ist, müssten für deren Aufrechterhaltung während den ersten Lebensmonaten formal täglich rund 1,6 µg (=10/6,4) «natürliches» Selen in Form von Muttermilch oder Kuhmilchpräparaten zugeführt werden, entsprechend etwa 0,3 µg/kg KM/Tag (vgl. vorhergehendes Kapitel).

Basierend auf der Selenkonzentration von Muttermilch aus *Selenmangelgebieten Chinas*, in denen die Keshan-Krankheit aber nicht endemisch ist, wurde für Säuglinge ein möglicher absoluter Minimalbedarf von 3 µg/Tag berechnet, entsprechend rund 0,5 µg/kg KM/Tag (56). Gemäss den Ausführungen im vorhergehenden Kapitel, würde diese Menge etwa einer Serumselenkonzentration der Säuglinge von im Mittel 20 ng/ml entsprechen (Tabelle A, Anhang).

Andererseits schätzte eine internationale Arbeitsgruppe der *WHO/FAO/IAEA*, ebenfalls anhand chinesischer Studien, den individuellen minimalen täglichen Grundbedarf für die ersten drei Monate auf 0,41 µg/kg KM/Tag bzw. für die folgenden drei auf 0,49 µg/kg KM/Tag, wobei angenommen wird, dass nur 80% des zugeführten Selens biologisch verfügbar ist (57). Wird eine Bioverfügbarkeit von 100% angenommen, ergibt sich in guter Übereinstimmung mit der oben erwähnten Schätzung anhand einer minimalen Serumselenkonzentration von 10 ng/ml rund 0,3 µg/kg KM/Tag. Für entsprechende Kollektive von Säuglingen wird von diesem Gremium von einem Mittelwert von minimal 6 bzw. 9 µg/Tag (0–3 bzw. 4–6 Monate) ausgegangen, entsprechend 1,2 bzw. 1,3 µg/kg KM/Tag, was für die ersten drei Monate etwa der Hälfte der vom NCR (USA) empfohlenen Menge entspricht, aber gut mit den bei Nutztieren gemachten Erfahrungen übereinstimmt.

In diesem Zusammenhang erwähnenswert ist auch die Tatsache, dass bei deutschen Säuglingen und Kindern mit Phenylketonurie, die diätetisch ernährt und mittlere täglich Selenzufuhren von 0,3 µg/kg KM/Tag und weniger aufwiesen keinerlei klinische Effekte wie Kardiomyopathien, Myopathien der Skelettmuskulatur oder Änderungen der Elektroenzephalogramme festgestellt werden konnten. Allerdings wurde im Plasma eine etwas erhöhte Konzentration des Schilddrüsenhormons T₄ (Thyroxin) festgestellt (zit. nach 17, 58, 59). In den 70er Jahren lagen in Finnland und Neuseeland die Selenzufuhren von Säuglingen bei 0,5 µg/kg KM/Tag, ohne dass irgend welche klinischen Anzeichen eines Mangels festgestellt werden konnten (60).

Falls die *Selenversorgung der Bevölkerung* im Bereich von 30 µg/Tag liegt, fällt die Selenkonzentration reifer Muttermilch von anfänglich rund 11 ng/ml im dritten Monat nach der Geburt auf rund die Hälfte. Dieser starke, unübliche Abfall findet bei einer mittleren täglichen Zufuhr der Bevölkerung im Bereich von 50–75 µg nicht statt (61). Wird die Verhinderung dieses Abfalls der Selenkonzentration auch als Kriterium für den Selenbedarf der Säuglinge betrachtet, ergibt sich eine wünschbare konstante Selenkonzentration der Muttermilch von im Mittel 11–16 ng/ml, entsprechend einer mittleren Zufuhr für Säuglinge im Bereich von 1,5–2,5 µg/kg KM/Tag. Andererseits konnte kürzlich gezeigt werden, dass sich Bevölkerungen mit einer mittleren täglichen Zufuhr im tiefen Bereich von 30 µg an eine niedrige Selenzufuhr

infolge Erhöhung der Retention durch Verringerung der Nierenausscheidungen adaptieren können (62).

Aus Tierversuchen ist bekannt, dass bei einem Selenmangel dessen Verteilung im Körper hierarchisch gesteuert ist, damit vermutlich die wichtigsten Funktionen des Selenmetabolismus aufrechterhalten werden können. Dieser Hierarchie ist auch die Selenversorgung der *Schilddrüse*⁵ unterworfen, die beispielsweise vor der Bildung der Plasma-GSH-P_x in der Niere rangiert. Selen erfüllt in dem für die Entwicklung des Organismus äusserst wichtigen Schilddrüsenhormonsystem mindestens zwei Funktionen: Erstens den Schutz der Schilddrüse vor H₂O₂, das für die Iodierung von Tyrosin gebildet wird und zweitens als Bestandteil der Deiodinasen (z.B. Typ II), welche die Konzentration des biologisch aktiven Hormons T₃ (Triiodthyronin) in den Organen und Geweben regeln. Diese letztere Funktion steht hierarchisch vor jener der GSH-P_x-Bildung der Schilddrüse. Obwohl die komplexen Interaktionen zwischen Selen- und Iodmangel noch nicht voll verstanden werden, muss ein Selenmangel bei gleichzeitigem Iodmangel als einer der Faktoren betrachtet werden, die zu Kropf und Kretinismus führen können. Andererseits kann ein Selenmangel die Aktivität der Deiodinase Typ II (T₄ → T₃), die eine Schlüsselfunktion in der normalen Hirnentwicklung ausübt, erhöhen oder senken und dadurch das Gehirn während seiner Entwicklung vor den negativen Folgen eines Iodmangels teilweise schützen. Bei Bevölkerungen mit Mangel an Selen und Iod sollte daher zuerst nur Iod und erst später Selen supplementiert werden (63, 64). Anhand der vorstehenden Ausführungen über Erfahrungen mit geringen Selenzufuhren kann festgehalten werden, dass bei einer ausreichenden Iodversorgung der Säuglinge im Bereich von 5–10 µg/kg KM/Tag individuelle Selenzufuhren von 0,3–0,5 µg/kg KM/Tag als genügend einzustufen sind. Werden die Zufuhrempfehlungen der WHO/FAO/IAEA und NCR (USA) für ein Kollektiv von Säuglingen im Alter von 0–12 Monaten bezüglich Jod und Selen verglichen, sind jene für Jod um einen Faktor 3–10 grösser als für Selen (57). Für die schweizerischen Referenzwerte für die Nährwertkennzeichnung von Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder resultiert in guter Übereinstimmung ein entsprechender Faktor von 7.

Basierend auf den vorerwähnten Daten halten wir eine tägliche mittlere Zufuhr an «natürlichem» Selen (ohne Supplemente), bei einer im übrigen ausgewogenen Versorgung mit allen übrigen relevanten Nähr- und Spurenstoffe, im Bereich von 1–2 µg/kg KM/Tag während den ersten sechs Lebensmonaten eines Kollektivs von Säuglingen als für deren normale Entwicklung völlig ausreichend. Der im Anhang der schweizerischen Lebensmittelverordnung festgelegte Referenzwert für Nährwertkennzeichnungen von Lebensmitteln, die für Säuglinge und Kleinkinder bestimmt sind, beträgt in guter Übereinstimmung 10 µg (ca. 2 µg/kg KM/Tag). Individuell scheinen auch mittlere tägliche Zufuhren im Bereich von 0,3–0,5 µg/Tag ausreichend zu sein.

⁵ Neben Leber und Niere zeigt bei Erwachsenen die Schilddrüse die höchste Selenkonzentration aller Gewebe und Organe (64).

Toxizität

Der Mechanismus der Selenotoxizität ist noch kaum aufgeklärt und empfindliche biochemische Parameter zur frühzeitigen Diagnose einer Selenvergiftung sind nicht bekannt, weder für Erwachsene noch Säuglinge. Bei verschiedenen *Nutztieren* führen Selenkonzentrationen von 3–5 µg/g TM im Futter zu toxischen Effekten (zit. nach 17). Umgerechnet auf einen Säugling, der etwa 100 g TM pro Tag konsumiert, entspricht dies einer mittleren täglichen Zufuhr von 300–500 µg, entsprechend etwa 50–100 µg/kg KM/Tag. Muttermilch aus Gebieten Chinas, in welchen Selenosen des Menschen endemisch sind, enthält etwa 300 ng Selen/ml, entsprechend einer täglichen Selenzufuhr von Säuglingen von 200–250 µg bzw. 30–40 µg/kg KM/Tag (56).

Aus Tierversuchen ist bekannt, dass bei einem nahrungsbedingten Überschuss an Selenomethionin, das in selenreichen Gegenden in Pflanzen in erhöhter Konzentration enthalten ist, dieses unspezifisch anstelle von Methionin in Proteine eingebaut wird, wodurch theoretisch, gerade in der Entwicklungsphase, ebenfalls biologisch unerwünschte Wirkungen resultieren könnten. Weniger kritisch scheint demgegenüber ein Überfluss an «Selen tierischer Herkunft» zu sein, da dieses (Selenocystein) nicht unspezifisch in Proteine eingebaut und folglich im Körper auch in geringerem Ausmass gespeichert wird als Selenomethionin (zit. nach 17, 49).

In *selenreichen Gegenden* Venezuelas, in welchen Erwachsene nur vereinzelt Zeichen einer Selenotoxizität (Haare, Nägel) zeigen und die reife Muttermilch eine Selenkonzentration von 70–85 ng/ml (entsprechend einer Zufuhr für Säuglinge von 10–15 µg/kg KM/Tag) aufweist, ergaben anthropometrische Untersuchungen, dass der Anteil 2-jähriger Kinder mit Minderwuchs aus diesen Gegenden (geschlechtsunabhängig) rund 6- bis 7-mal höher ist als bei solchen aus Gegenden mit einer Muttermilchselenkonzentration im Bereich von 40 ng/ml; im Alter von sieben Jahren beträgt das entsprechende Verhältnis noch 2–3 (65). Andererseits konnte gezeigt werden, dass mit steigender Selenkonzentration der Muttermilch jene von Zink, eines für Entwicklung und Wachstum sehr bedeutungsvollen Spurenelements, aus noch unbekanntem Gründen abnimmt (28). Ob dies der Grund für das verminderte Längenwachstum darstellt, ist aber höchst ungewiss (zit. nach 17, 49, 57). Denn bei einem Überangebot an Selen und gleichzeitig knapper Iodversorgung könnten auch Störungen im Schilddrüsenhormonsystem auftreten, die bei einer Unterfunktion zu ähnlichen Effekten führen könnten (63, 64).

Wird davon ausgegangen, dass die mittlere *Zinkkonzentration* der Muttermilch arbiträr um nicht mehr als 30 % tiefer liegen soll als z.B. jene in Milch aus Berlin (ca. 2,7 µg/ml), so dürfte, gemäss den publizierten Daten (28), die Selenkonzentration der Muttermilch 40 ng/ml nicht übersteigen. Diese Konzentration entspricht einer mittleren täglichen Zufuhr durch Säuglinge im Bereich von 6 µg/kg KM/Tag.

Anhand von Betrachtungen zur Selenkonzentration der Muttermilch in *Süddakota* (keine Selenosen bekannt) kommt *Levander* (56) zum Schluss, dass tägliche Zufuhren im Bereich von 45–50 µg, entsprechend 6–8 µg/kg KM/Tag, für Säuglinge

noch nicht toxisch wirken. Von der EPA (USA) wurde andererseits für Erwachsene die maximal duldbare tägliche Selenzufuhr auf 5 µg/kg KM festgelegt (zit. nach 17) und von einer WHO-Arbeitsgruppe wird für Erwachsene von 400 µg/Tag (entsprechend 5–7 µg/kg KM/Tag) ausgegangen, wobei Kinder, Schwangere und laktierende Frauen aber ausdrücklich ausgenommen sind (57).

Anhand dieser Daten lässt sich ableiten, dass die mittlere tägliche Selenzufuhr in den ersten Lebensmonaten 3–5 µg/kg KM/Tag bzw. das 10- bis 20-fache des möglicherweise physiologischen täglichen Minimalbedarfs nicht übersteigen sollte, unabhängig davon, ob die Zufuhr via Muttermilch oder Säuglingsanfangsnahrung erfolgt. Dieser Wert ist in akzeptabler Übereinstimmung mit jenem des schweizerischen Gesetzgebers, der für mit Selen supplementierte Säuglingsnahrung einen Grenzwert von 0,7 µg/100 kJ festgelegt hat: Ausgehend von einem täglichen kalorischen Bedarf von rund 480 kJ/kg KM für einen drei Monate alten Säugling (2), ergibt sich bei einer Körpermasse von 5,4 kg eine maximale Zufuhr von täglich 18 µg, entsprechend rund 3 µg/kg KM/Tag.

Experimentelles

Proben

Die Muttermilchproben der Region Bern wurden durch uns bei der Universitätsfrauenklinik, Neonatologie beschafft. Jene aus der Region Basel wurden durch das Kantonale Laboratorium, Basel in lokalen Spitälern und teilweise bei Privatpersonen erhoben. Total standen uns drei Serien zur Verfügung: Bern 1992/93, Basel 1993/94 und Basel 1998/99. Alle Serien sind ursprünglich im Hinblick auf andere Untersuchungsziele erhoben worden (z.B. Organochlorpestizide, Moschusxylole, Ochratoxin A). Spezielle Vorkehrungen gegen eine Kontamination der Proben mit Selen sind somit nicht getroffen worden. Da diese Gefahr, im Gegensatz zu anderen chemischen Elementen, für Selen allgemein als äusserst gering eingestuft wird, gehen wir davon aus, über ein diesbezüglich repräsentatives Probenmaterial zu verfügen.

Der Zeitpunkt der Muttermilchprobenahme nach der Geburt wurde nur in der letzten Serie (Basel 1998/99) rapportiert. Rund 92 % der Probenahmen dieser Serie fanden später als dem 11./12. Tag nach der Geburt statt (reife Muttermilch). Da die Proben der ersten zwei Serien praktisch ausnahmslos in Spitälern erhoben wurden, gehen wir davon aus, dass es sich dabei um Proben vom 3./4. Tag bis maximal 10. Tag (Maximum der von den Krankenkassen übernommenen Kosten) nach der Geburt handelt (transitorische Milch). Dass diese Serien auch Kolostrumproben vom 2.–3. Tag nach der Geburt enthalten, kann nicht ausgeschlossen werden. Nach dem Eintreffen der Proben in unseren Laboratorien wurden diese bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren (–18°C).

Die Proben kommerzieller Säuglingsanfangs- und Folgenahrung wurden in den Jahren 1995 bis 1999 in Bern eingekauft. Sämtliche dazugehörenden Informationen,

wie z.B. Proteingehalte, Energieinhalte, Ausgangsmaterialien usw., die in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden den Packungen oder entsprechenden Beilagen entnommen.

Analytik

Die Muttermilchproben wurden nach dem Auftauen mittels Vibromixer vorsichtig homogenisiert, jeweils 5–10 g in Petrischalen aus Polystyrol (Semadeni, Bern) im Gefrierschrank bei -21°C eingefroren und anschliessend in Trocknungskammern FD 3071 (Kleiner, Wohlen) mit Stapelinsätzen während 24 h bei -50°C und 0,1–0,05 mbar lyophilisiert (Lyolab BIL, LSL Secfroid, Lausanne). Die kommerzielle pulverförmige Säuglingsnahrung wurde ohne vorherige Trocknung analysiert.

Die derart bestimmten «Trockenmassen» in g/100 g (ohne Berücksichtigung des Restwassergehaltes) betragen (arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung; n ; Median; Bereich): Bern 1992 $12,4 \pm 1,4$; $n=40$; 12,5; 9,8–16,5; Basel 1993/94 $12,4 \pm 1,3$; $n=34$; 12,2; 10,0–15,8; Basel 1998/99 $12,8 \pm 4,1$; $n=52$; 12,8; 4,4–35,9.

Maximal 200 mg des trockenen Probenmaterials wurden im Paar-Hochdruckverascher (IG, Zürich) in Einsätzen aus Quarzglas (Volumen 15 ml) mit 1 ml Salpetersäure 65 % bei 260°C während 90 min mineralisiert und die Aufschlusslösungen in graduierten Polypropylenröhrchen (Semadeni, Bern) mit Salzsäure $c(\text{HCl}) = 3$ auf 15 ml verdünnt (Probelösung). Die Proben wurden in der Regel nur einmal aufgeschlossen.

Wie bereits früher beschrieben führt die angewendete Mineralisationsmethode in der Aufschlusslösung ausschliesslich zu Selen-(IV), so dass sich die sonst übliche Reduktion des Selen-(VI) mittels Salzsäure vor der Hydridbildung erübrigt (66).

Die Messung von Selen als Hydrid erfolgte mit der *Atomfluoreszenzspektrometrie* (AFS) (Mod. Escalibur, PS-Analytical, UK). Für die detaillierte Beschreibung des analytischen Verfahrens wird auf die Literatur verwiesen (16, 67).

Die Probelösungen wurden je zweimal gemessen, wobei die Kalibrierung gegen Standardlösungen in Salzsäure $c(\text{HCl}) = 3$ mit den Selenkonzentrationen: 0–0,25–0,5–1–2–4–6 ng/ml erfolgte. In diesem in der Praxis verwendeten Messbereich ergab sich eine lineare Signalzunahme. In separaten Versuchen konnten keine Matrixeffekte festgestellt werden.

Zur Herstellung der Standardlösungen diente ein ICP-Standard mit 1 mg Selen/ml (Alfa, Johnson und Matthey, Karlsruhe) in 5 %-iger HNO_3 .

Richtigkeit, Wiederholbarkeit und Nachweisgrenze

Zur Abklärung der *Richtigkeit* unserer Messergebnisse dienten verschiedene zertifizierte Proben aus Kuhmilch. Diese ist zwar, was die Menge an Trockenmasse (TM) betrifft, mit Muttermilch vergleichbar, nicht jedoch was die spezifische Zusammensetzung betrifft. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Die Übereinstimmung der gefundenen mit den zertifizierten

Tabelle 3

Ergebnisse der Richtigkeitsprüfung und Qualitätskontrollproben

Kontrollproben (internationale Bezeichnung)	n^1	Gemessen ² (ng/g)	Zertifiziert ³ (ng/g)
Milk Powder, IAEA A-11 ⁴	1	35	34 ± 8
Whole Milk Powder, NIST 8435	11	120 ± 17	131 ± 14
Non-Fat Milk Powder, NBS 1549	2	135 ± 10	110 ± 10

¹ Anzahl Messungen, entsprechend der Anzahl Mineralisationen.

² Mittelwert ± Standardabweichung

³ ± 95 % Vertrauensbereich des Mittelwertes

⁴ Material vergriffen, Vorrat reichte nur für eine einzige Messung.

Werten war akzeptabel. In der Regel wurde pro Analysenserie von 15 Proben zur *Qualitätssicherung* eine zertifizierte Referenzprobe mitgeführt.

Zur Abschätzung der *Wiederholbarkeit* der Messungen innerhalb unseres Labors wurde eine Muttermilchprobe mehrfach aufgeschlossen und gemessen. Dabei wurde ein Mittelwert (± Standardabweichung) von 167 ± 19 ng/g TM ($n=7$), entsprechend einem Variationskoeffizienten (VK) von 11,4 %, erhalten. Auf einem tieferen Konzentrationsniveau im Bereich von 62 ng/g TM wurde die Standardabweichung (s) anhand der Differenzen (d) der Doppelbestimmungen von acht verschiedenen Proben auf 6,2 ng/g geschätzt⁶, entsprechend einem VK von 10,0 %. Aus den Daten der an verschiedenen Tagen wiederholten Bestimmungen der zertifizierten Probe NIST 8435 resultierte ein vergleichbarer VK von 14,2 % (Tabelle 3). Aus allen vorliegenden Daten lässt sich für den Messbereich 50–200 ng/g TM eine mittlere, gewichtete relative Wiederholstandardabweichung innerhalb unseres Labors von rund 12 % ($n=26$) abschätzen, entsprechend einer relativen Wiederholbarkeit von rund 34 %.

Sämtliche Reagenzienblindwerte waren selenfrei (< 1 ng/g). Daher wurde die *Nachweisgrenze* nicht über die Blindwertstreuung, sondern über die Kalibrierfunktion ermittelt. Zu diesem Zweck wurden die Signale von fünf Serien Kalibrationslösungen im niedrigen Bereich gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen (Abb. 1). Die Kalibrationen wurden an verschiedenen Tagen gemessen, daher sind die geringfügig voneinander abweichenden Steigungen auf die maximal gemessene Empfindlichkeit korrigiert. Aus dem 95 % Vertrauensbereich der Regressionsgeraden kann die Nachweisgrenze (NG) ermittelt werden (Abb. 1). Bezogen auf eine Trockenmasse von 200 mg Einwaage ergaben sich etwa 15 ng/g als praktische Nachweisgrenze. Im Bedarfsfall können bei entsprechender Detektoreinstellung auch noch wesentlich tiefere Konzentrationen, im Bereich von 3 ng/g, reproduzierbar und zuverlässig gemessen werden.

⁶ Geschätzte Standardabweichung aus Doppelbestimmungen: $s \approx \sqrt{\sum d^2/2n}$

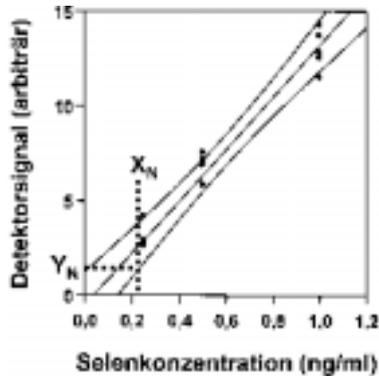


Abbildung 1 Ermittlung der Nachweisgrenze (X_N) anhand von Bezugslösungen im unteren Konzentrationsbereich. Durch den Schnittpunkt des oberen 95% Vertrauensbereichs der Regressionsgeraden mit der Ordinate (Y_N) wird festgelegt, ob sich das Signal noch signifikant von Null unterscheidet

Resultate und Diskussion

Muttermilch

Die Messergebnisse der drei Serien von Muttermilchproben sind in Tabelle 4 bezogen auf Trocken- und Frischmasse zusammengestellt. Die Selenkonzentration der Proben jeder Serie folgt etwa einer *Normalverteilung*⁷, ausgenommen die erste (Bern 1992/93), welche einen «Ausreisser» mit 462 ng/g TM (55 ng/ml) aufweist. Dieser Konzentrationswert wurde von den weiteren Rechnungen ausgeschlossen. Abbildung 2 zeigt das Histogramm der Resultate von 52 reifen Muttermilchproben aus Basel. Als Parameter der bereinigten Normalverteilung (zwei Proben mit Konzentrationen > 20 ng/ml ausgeschlossen) dieser Ergebnisse wurden $\bar{x} = 10,3$ ng/ml und $s = 3,2$ ng/ml ermittelt.

Der Vergleich der Mittelwerte unserer Messergebnisse mit jenen aus der Literatur (Tabelle 1) deutet darauf hin, dass, was transitorische Milch betrifft, unsere Daten etwa vergleichbar sind mit solchen aus Griechenland, Japan, Spanien und Deutschland (Jahr 1983/85). Was reife Muttermilch aus Basel (1998/99) betrifft, sind die Selenkonzentrationen ähnlich jenen in Deutschland (1989/90), Österreich, Spanien, Japan sowie Belgien (1983). Deutlich höhere Mittelwerte im Bereich von 16–20 ng/ml wurden in den USA und neuerdings in Finnland gemessen. Etwa dop-

⁷ Gerade im Wahrscheinlichkeitsdiagramm.

Tabelle 4
Selenkonzentration in Muttermilch

Herkunft	Jahr	Δt^1 (Tage)	n ²	pro Trockenmasse			pro Frischmasse		
				\bar{x} (ng/g)	$\bar{x} \pm s$ (ng/g)	Bereich (ng/g)	\bar{x} (ng/ml)	$\bar{x} \pm s$ (ng/ml)	Bereich (ng/ml)
Bern	1992/93	? ³	39 ⁴	145 ⁴	147 ± 35 ⁴	69–231 ⁴	17,3 ⁴	18,3 ± 5,1 ⁴	7,0–31,0 ⁴
Basel	1993/94	? ³	34	136	151 ± 44	88–283	17,5	18,5 ± 5,2	11,1–34,5
Basel	1998/99	≥ 12 ⁵	52	81	87 ± 32	30–193	10,4	10,7 ± 3,9	3,5–23,4

¹ Probenahme, Zeit seit der Geburt

² Anzahl Proben

³ Ausgehend von einer Spitalaufenthaltsdauer im Bereich von 3–10 Tagen wird angenommen, dass der grösste Teil der Proben dieser beiden Serien zum Zeitpunkt 4–5 Tage nach der Geburt erhoben wurden: Transitorische Milch.

⁴ Ohne den Höchstwert von 462 ng/g Trockenmasse (55,0 ng/ml) der nicht zur Normalverteilung gehört.

⁵ Für 92% der Proben gilt >10 Tage nach der Geburt (Mittelwert 127 Tage, Median 85 Tage, Bereich 0–740 Tage).

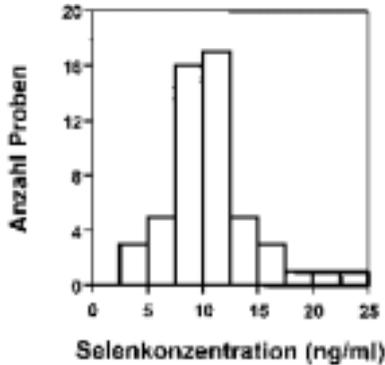


Abbildung 2 Verteilung der Selenkonzentration reifer Muttermilch aus Basel (1998/99)

pelt so hohe Werte, im Bereich von 29–36 ng/ml (Mediane), sind von den Philippinen bekannt (4).

Während in der ersten Untersuchungsserie (Bern 1992/93) die ursprüngliche Herkunft der Probandinnen unbekannt war, wiesen die zweite bzw. dritte Serie solche ausländischer Herkunft von 38 bzw. 42 % auf. Diesbezügliche Varianzanalysen gaben jedoch keine Hinweise auf einen Einfluss der Herkunft (Ernährungsverhalten) auf die Selenkonzentration der Muttermilch.

In der ersten Serie waren hingegen einige Angaben zur Ernährungsweise der Probandinnen verfügbar: Die Milch von zwei Diabetikerinnen zeigte eine Selenkonzentration von 153 und 145 µg/g TM. Eine Person mit einem Wert von 462 µg/g erhielt vermutlich Selensupplemente. Diese Werte ergaben keinen Hinweis, dass Diabetikerinnen bereits während der Schwangerschaft einen veränderten Selenmetabolismus aufweisen (68). Keine Hinweise auf einen Einfluss auf die Selenkonzentration lieferten auch Angaben wie «vorwiegend vegetarisch» oder «kein Schweinefleisch» sowie «wenig Fleisch».

Ein Vergleich der Konzentrationswerte der ersten beiden Serien (Bern 1992/93 und Basel 1993/94) zeigt eine sehr gute Übereinstimmung, was bedeutet, dass die Selenversorgung Erwachsener in Bern und Basel in diesen Jahren etwa vergleichbar war. Demgegenüber ergibt sich für die dritte Serie (Basel 1998/99) gegenüber der zweiten Serie ein um 42 % verminderter Mittelwert, entsprechend einem Faktor $1,7 \pm 0,3$ ($\pm 95\%$ Vertrauensgrenze). Dieser Unterschied kann dadurch erklärt werden, dass sich die dritte Serie vorwiegend aus reifer Muttermilch, jene der fünf Jahre früher erhobenen aber aus transitorischer Milch (und möglicherweise zum Teil Kolostrum) zusammensetzte. Tatsächlich unterscheidet sich der oben berechnete Faktor kaum von jenem, der anhand der Literatur $1,4 \pm 0,2$ ($\pm 95\%$ Vertrauens-

grenze) für das mittlere Verhältnis der Selenkonzentration von transitorischer zu reifer Muttermilch ermittelt wurde (Kapitel Angaben aus der Literatur).

Muttermilch und Plasma-/Serumkonzentration bzw. tägliche Zufuhr Erwachsener

Bei Anwendung des Faktors 1,4 für das Verhältnis der Selenkonzentration von transitorischer zu reifer Milch wird als Schätzung für die mittlere Selenkonzentration reifer Muttermilch für die Serien Bern 1992/93 und Basel 1993/94 je rund 13 ng/ml erhalten. Daraus zu schliessen, dass die Selenkonzentration reifer Muttermilch in Basel von 1993/94 bis 1998/99 um im Mittel rund 2,4 ng/ml abgenommen hat, ist aber höchst spekulativ (Tabelle 4). Andererseits entspricht diese Konzentrationsabnahme einer täglichen Minderzufuhr via Nahrung von im Mittel rund 11 µg, die sich leicht dadurch erklären liesse, dass ein vermutlich in diesem Zeitraum angestiegener Teil der Basler Bevölkerung gewisse, für die Selenzufuhr relevante, Lebensmittel vermehrt im nahen Ausland (Frankreich, Deutschland) einkaufte. Diese Lebensmittel können teilweise deutlich weniger Selen enthalten als solche «schweizerischer» Herkunft. Ein Unterschied von im Mittel 10–15 µg Selen pro Tag lässt sich beispielsweise durch den täglichen Verzehr von rund 15 g trockenen Teigwaren schweizerischer Produktion (aus selenreichem Weizen nordamerikanischer Herkunft) leicht erklären (13–16). Eigene Messungen kleiner Kollektive von Männern und Frauen aus Deutschland ergaben für Vollblut eine mittlere Selenkonzentration (\pm Standardabweichung) von 105 ± 28 ng/ml ($n=34$) und für Personen aus der Schweiz 131 ± 32 ng/ml ($n=28$) (69). Der um rund 20% tieferer Wert bei Personen aus Deutschland deutet auf eine im Mittel um etwa 10 µg geringere Selenzufuhr in diesem Land hin, worauf bereits früher hingewiesen wurde (14).

Aus dem Mittelwert ($\pm 95\%$ Vertrauensbereich des Mittelwertes) reifer Muttermilch aus Basel 1998/99 von $10,7 \pm 1,0$ ng/ml kann mittels der abgeleiteten Beziehung (Tabelle 2) eine mittlere tägliche Selenzufuhr für Frauen von 49 ± 6 µg berechnet werden. Analog kann aus der Selenkonzentration der reifen Muttermilch eine mittlere Plasmaselenkonzentration der Basler Frauen von 80 ± 9 ng/ml berechnet werden. Aus dem Raum Basel sind leider keine Daten über die tägliche Zufuhr oder die Plasma- bzw. Serumseleknkonzentration bekannt, die sich zu einem Vergleich mit diesem Ergebnis eignen würden. Immerhin ist der berechnete Wert etwa vergleichbar mit solchen, die an Genfer Frauen gemessen wurden: Mittelwerte (\pm Standardabweichung) 1992/93 64 ± 14 ng/ml ($n=15$) und 1997/98 80 ± 22 ng/ml ($n=21$) (12, 69). Diese liegen ebenfalls tiefer als der 1992/93 ermittelte gesamtschweizerische Durchschnitt für Frauen von 88 ± 14 ($n=243$) und deuten auf eine in diesen beiden (Grenz-)Städten geringere Selenversorgung hin (12).

Wird andererseits als Schätzwert für reife Muttermilch aus Bern (1992/93), basierend auf den Messwerten für transitorische Milch (Division durch $1,4 \pm 0,2$) von 13 ± 2 ng/ml ausgegangen, resultiert eine mittlere Plasmaselenkonzentration von 97 ± 16 ng/ml und eine Zufuhr von 59 ± 11 µg/Tag. Gemessen wurde bei nicht

laktierenden Frauen aus Bern und Umgebung in den gleichen Jahren in guter Übereinstimmung eine Plasmaselenkonzentration von im Mittel 97 ± 4 ng/ml (12). Dieser Befund unterstützt die Vermutung, dass die Selenkonzentration der Muttermilch in Basel von 1992 bis 1998/99 abgenommen hat.

Die anhand des *Pro-Kopf-Lebensmittelverbrauchs* 1995/96 (ohne Alkohol) und den gemessenen mittleren Selenkonzentrationen der Lebensmittel des Schweizer Marktes (1990–98) berechnete tägliche Zufuhr ergab, bezogen auf den Energiebedarf von Frauen (8 MJ/Tag), einen gesamt-schweizerischen Wert von rund $55 \mu\text{g}/\text{Tag}$ (15). In guter Übereinstimmung dazu ergeben sich aus Messungen der Plasmaselenkonzentration an Berner Frauen von 97 ± 4 ng/ml (1992/93) und $92,0 \pm 8,5$ ng/ml (1997/98) (15), tägliche Zufuhren von 55 ± 4 und $53 \pm 6 \mu\text{g}/\text{Tag}$.

Dass die Selenkonzentration der Muttermilch keineswegs eine über die Jahre konstante Grösse darstellt, zeigen auch die in Tabelle 1 aufgeführten Daten zu Messungen aus *Deutschland* und *Japan*. Im Vergleich zu den Jahren 1976/77 ist die mittlere Selenkonzentration reifer Muttermilch in Deutschland von etwa 28 ng/ml auf rund 10 ng/ml um 1989/90 gesunken, was sich die Autoren nicht erklären konnten (30). Eine mögliche Erklärung ist der auf heute praktisch Null gesunkene Import von (selenreichem) nordamerikanischem Getreide durch Deutschland (14, 15).

Säuglingsanfangsnahrung

Untersucht wurden insgesamt 21 verschiedene Fabrikate von Anfangs- und neun Folgenahrungen, die je in den Jahren 1995–1999 eingekauft wurden und total zu 54 Messergebnissen der Selenkonzentration führten. Die Messresultate sind bezogen auf TM sowie auf Frischmasse in den Tabellen C (Anfangsnahrung) und D (Folgenahrung) des Anhangs zusammengestellt⁸. Zur Berechnung der Selenkonzentration in der Frischmasse wurde von den Angaben der Hersteller zur Zubereitung der Flasche (3 Monate) ausgegangen und für die Dichte 1,031 g/ml eingesetzt.

Die Selenkonzentration liegt bei Säuglingsanfangsnahrungen auf *Kuhmilchproteinbasis* im relativ engen Bereich von 21–79 ng/g TM, im Mittel (\pm Standardabweichung) der 25 Messungen an 16 verschiedenen Produkten bei 53 ± 15 ng/g TM. Die entsprechenden Werte, bezogen auf die gemäss Anweisungen der Hersteller verzehrsfertige Zubereitung, lauten: Bereich 3,0–10,5 ng/ml und Mittelwert $7,4 \pm 2,2$ ng/ml. Die mittlere Selenkonzentration kommerzieller Säuglingsanfangsnahrung liegt somit 30–40% unterhalb jener von reifer Muttermilch (Tabelle 4). Ähnliche Feststellungen, dass die Selenkonzentration kommerzieller Säuglingsnahrung auf Kuhmilchbasis unterhalb jener von Muttermilch liegt und somit auch die tägliche Zufuhr, sind aus verschiedenen Ländern bekannt (Tabelle B, Anhang, Kapitel Serum-/Plasmakonzentration und tägliche Zufuhr).

⁸ Es ist festzuhalten, dass es sich bei diesen Messwerten um eine «Momentaufnahme» handelt, die keine Extrapolation erlaubt.

Bei Anfangsnahrung auf *Sojaproteinbasis* ist der Konzentrationsbereich mit 19–272 ng/g TM deutlich grösser und der Mittelwert von 10 Messungen an fünf verschiedenen Produkten beträgt mit 94 ± 82 ng/g TM rund das Doppelte jener auf Kuhmilchbasis. Die entsprechenden Werte, bezogen auf die verzehrfertige Zubereitung, lauten: Bereich 2,5–38,4 ng/ml und Mittelwert $13,1 \pm 11,6$ ng/ml. Interessanterweise zeigen sämtliche Produkte von Anfangsnahrung, die über verschiedene Jahre eingekauft wurden, eine bis in die jüngste Zeit abnehmende Selenkonzentration (Ausnahme: Humana-1). Für die Zeit des Einkaufs 1997 bis 1999 resultierte bei sechs verschiedenen Fabrikaten auf Milchproteinbasis und drei auf Sojaproteinbasis unterschiedlicher Herkunft eine Reduktion der Selenkonzentration (pro TM) um einen Faktor von im Mittel (\pm Standardfehler) $1,8 \pm 0,1$ ($n=9$).

Die höhere *Variation der Selenkonzentration* bei den Produkten auf Sojabasis (VK ca. 80%) im Vergleich zu jenen auf Milchbasis (VK ca. 25%) kann möglicherweise durch die unterschiedliche geographische Herkunft (geologische Beschaffenheit der Böden) des Sojarahstoffs erklärt werden. Die Produkte mit der höchsten Selenkonzentration dürften aus nordamerikanischer Soja hergestellt worden sein (15). Demgegenüber ist die Selenkonzentration von Schweizer Milch homogener, da das Selen vor allem durch Supplementierung in die Milch gelangt, welche gesamtschweizerisch weitgehend nach den Empfehlungen der Eidgenössischen Forschungsanstalt Posieux erfolgt (16).

Die *Selendichte* der Säuglingsanfangsnahrung auf Milchproteinbasis erstreckt sich von 0,10 bis 0,37 $\mu\text{g}/100$ kJ, im Mittel (\pm Standardabweichung) beträgt sie $0,25 \pm 0,07$ $\mu\text{g}/100$ kJ. Jene für solche auf Sojaproteinbasis umfasst den Bereich 0,09 bis 1,33 $\mu\text{g}/100$ kJ, im Mittel $0,48 \pm 0,42$ $\mu\text{g}/100$ kJ. Gemäss der schweizerischen Lebensmittelverordnung von 1995 (Anhang 2, Ziffer 5) gilt für Säuglingsanfangsnahrung mit Selenzusätzen (Supplemente) ein Grenzwert von 0,7 $\mu\text{g}/100$ kJ. Dieser Wert wird einzig von zwei Proben auf Sojaproteinbasis überschritten, wobei die Ursache aber kaum Selenzusätzen, sondern wohl den natürlichen Gegebenheiten (s. oben, Tabelle C, Anhang) zugeschrieben werden kann.

Die mittlere, *proteinbezogene Selenkonzentration* schweizerischer Milch wurde im Jahresmittel auf 265 ng/g Protein geschätzt (16). Für die untersuchten Anfangsnahrungen auf Kuhmilchbasis ergibt sich hingegen ein Bereich von 176–693 ng/g und ein Mittelwert (\pm Standardfehler) von 423 ± 25 ng/g, d.h. rund 1,6-mal mehr als früher für Konsummilch und Milchproteinisolate ermittelt (16). Unter der Voraussetzung, dass in der Schweiz verkaufte Säuglingsanfangsnahrung nicht mit Selen supplementiert ist (70), deutet dieser Befund darauf hin, dass entweder die zu deren Herstellung verwendeten Milchproteine selenreicher sind als jene der Schweizer Durchschnittsmilch oder dass andere Zutaten als Proteine ebenfalls selenhaltig sind. Da Selen in Lebensmitteln stets mit Proteinen verknüpft ist, dürfte die letztere Deutung kaum zutreffen. Eine weitere mögliche Erklärung ist die (Mit-)Verwendung von Proteinisolaten aus Ländern, in denen die Selenkonzentration der Kuhmilchproteine höher ist als in der Schweiz, z.B. solchen aus den USA, oder dass zur Her-

stellung sämtlicher untersuchter Proben vorwiegend im Winter gewonnene Milchdiente, deren Selenkonzentration in der Schweiz im Mittel rund 1,8-mal höher ist als die im Sommer gewonnene (16). Obwohl unterschiedliche Kuhmilchproteinfraktionen, je nach Art und Trennung eine proteinbezogene Selenkonzentration im Bereich von 130–580 ng/g aufweisen (71, 72)⁹, scheint uns die letzte Erklärung, nämlich die saisonabhängige Selenkonzentration der Milch, am wahrscheinlichsten zu sein.

Säuglingsfolgenahrung

Die Analysenergebnisse der Säuglingsfolgenahrungen sind in Tabelle D (Anhang) zusammengestellt. Die Selenkonzentration von neun verschiedenen Fabriken (empfohlen ab dem 2./4. Monat) beträgt im Mittel (\pm Standardabweichung) aller 18 Proben 77 ± 82 ng/g TM und der Bereich 2–357 ng/g TM bzw. bezogen auf Frischmasse (verzehrfertige Zubereitung gemäss Herstellerangaben) $9,5 \pm 10,9$ ng/ml und 0,3–42,4 ng/ml. Die entsprechenden Daten für Produkte auf vorwiegend Kuhmilchbasis (4 Produkte, 7 Messungen bzw. Proben) bzw. Soja- und/oder Cerealienbasis (5 Produkte, 11 Messungen) lauten: 45 ± 30 ng/g TM, Bereich 10–88 ng/g TM bzw. 97 ± 99 ng/g TM, Bereich 2–357 ng/g TM und auf verzehrfertige Zubereitung bezogen $6,6 \pm 4,0$ ng/ml, 1,5–12,1 ng/ml bzw. $11,4 \pm 13,5$ ng/ml 0,3–42,4 ng/ml. Die mittlere proteinbezogene Selenkonzentration der Folgenahrungen auf Kuhmilchbasis stimmt mit 297 ± 67 ng/g besser mit dem geschätzten Jahresmittel von 265 ng/g für Vollmilch (16) überein als bei den entsprechenden Anfangsnahrungen. Analog zu den Säuglingsanfangsnahrungen beträgt die Selenkonzentration von Produkten auf Soja- oder Cerealienbasis im Mittel etwa das Doppelte jener auf Kuhmilchbasis, allerdings mit deutlich höherer Standardabweichung. Die mit 0,3 ng/ml geringste Konzentration wurde in einem 1995 eingekauften Produkt mit der Bezeichnung «Gemüse» (inkl. Sojamehl) gemessen, beim gleichen, aber 1997 eingekauften Produkt, lag die Selenkonzentration bei 13,1 ng/ml, also rund 40-mal höher. Im Mittel ist die Konzentration in Säuglingsanfangs- und Folgenahrung vergleichbar, erreicht aber bei solchen auf Kuhmilchbasis nur 60–70 % jene der reifen Muttermilch. Die Produkte auf Soja- oder Cerealienbasis zeigen im Mittel zwar die gleiche Selenkonzentration wie Muttermilch, aber mit einer deutlich grösseren Spannweite zwischen den verschiedenen Fabriken und Produktionsjahren.

Schätzung der täglichen Zufuhr

Die Berechnung der täglichen Selenzufuhren basieren auf einem männlichen Säugling im Alter von drei Monaten und einer Körpermasse von 5,4 kg. Als tägliche

⁹ Erwähnenswert ist, dass 10–40% des Mutter- und Kuhmilchselens in Form von GSH-P_x vorliegen (17, 30).

Trinkmenge wird von 850 ml ausgegangen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Im Mittel ergibt sich eine tägliche Selenzufuhr von 9–11 µg bei *Muttermilch* und eine solche von rund 6 µg bei einer Ernährung auf *Kuhmilchproteinbasis*, entsprechend einer Minderzufuhr im Vergleich zu *Muttermilch* von rund 40%. Analoge Feststellungen wurden in verschiedenen europäischen und überseeischen Ländern gemacht (vgl. Kapitel «Serum/Plasma-Konzentration und tägliche Zufuhr»). Ebenso die Tatsache, dass zwar im Mittel die Selenkonzentration der *Muttermilch* in verschiedenen Ländern etwa jener der *Kuhmilch* entspricht, die entsprechenden Säuglingsanfangsnahrungen aber eine deutlich tiefere Selenkonzentration zeigen. Dies wurde verschiedentlich Selenverlusten bei der Verarbeitung der *Kuhmilch* zu Säuglingspräparaten zugeschrieben (Zit. nach 15). Da gezeigt werden konnte, dass bei der Milchpulverherstellung keine Selenverluste auftreten (15), dürfte die Zugabe selenfreier Bestandteile wie Kohlenhydrate den Hauptgrund für den Unterschied abgeben. Entsprechend ergab eine Schätzung der Selenkonzentration schweizerischer *Kuhmilch* im Jahresmittel 9,5 ng/g (Frischmasse), entsprechend 9,8 ng/ml (16). Dieser Wert ist um rund 30% höher als der im Mittel für Säuglingsanfangsnahrung gemessene (Tabelle 5) und etwa vergleichbar mit jener reifer *Muttermilch* aus Basel.

Präparate auf *Sojaproteinbasis* führen zwar im Mittel zu einer gleichen Zufuhr wie *Muttermilch*, allerdings ist der Schwankungsbereich, je nach Produkt, deutlich höher als bei *Muttermilch* und *Kuhmilchpräparaten*. Betragen die Faktoren zwischen tiefster und höchster Zufuhr für *Muttermilch* 4–7, für Präparate auf *Kuhmilchbasis* 3–8, steigen diese für Soja-Cerealienpräparate auf 16–120.

Die mittleren täglichen *kollektiven Selenzufuhren* via *Muttermilch* und Präparaten auf Sojabasis entsprechen bezüglich des *Selensbedarfs* etwa den USA-Empfehlungen (NRC) von 10 µg (0–3 Monate) äquivalent etwa 2 µg/kgKM/Tag; jene durch *Kuhmilchpräparate* führt im Mittel nur zu rund 1 µg/kgKM/Tag. Dies entspricht zwar etwa der Hälfte der USA-Empfehlungen für Kollektive, erfüllt jedoch die entsprechende Empfehlung der WHO-Arbeitsgruppen von 1,2 µg/kgKM/Tag weitgehend (vgl. Kapitel «Täglicher Bedarf»).

Die *geringste individuelle Zufuhrmenge* liegt für Säuglingsanfangsnahrung im Bereich von 2,1–2,6 µg/Tag, entsprechend etwa 0,4 µg/kgKM/Tag. Für *Muttermilch* sind sie mit einem Bereich von 3,0–4,3 µg/Tag fast doppelt so hoch. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine individuelle reife *Muttermilchprobe* eine Selenkonzentration gleich oder unterhalb von 1,9 ng/ml, entsprechend rund 0,3 µg/kgKM/Tag, dem vermuteten physiologischen Minimalbedarf, aufweist, kann anhand der bereinigten Normalverteilung (Basel 1998/99) zu rund 0,4% berechnet werden.

Im Hinblick auf eine allfällige *überhöhte individuelle Selenzufuhr* im Bereich von 3–5 µg/kg KM/Tag sind die *Muttermilchprobe* mit 55 ng/ml (Tabelle 4, Fussnote 4) und eine Säuglingsanfangsnahrung auf Sojabasis mit rund 38 ng/ml zu erwähnen (Tabelle C, Anhang). Da es sich bei der *Muttermilchprobe* um eine tran-

Tabelle 5

Schätzung der täglichen Selenzufuhr eines 3 Monate alten männlichen Säuglings

Nahrung	Selenkonzentration ³			Selenzufuhr ⁴		
	N ¹	n ²	Mittelwert (ng/ml)	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (µg/Tag)	Bereich (µg/Tag)
<i>Reife Muttermilch</i>						
Basel 1998/99	52	52	10,7	3,5–23,4	9,1 (1,7) ⁵	3,0–19,9
Bern 1992/93 ⁶	39	39	13,1 ⁶	5,0–22,1 ⁶	11,1 (2,1) ⁶	4,3–18,8 ⁶
<i>Säuglingsanfangsnahrung</i>						
Kuhmilchproteine	16	25	7,4	3,0–10,5	6,3 (1,2)	2,6– 8,9
Sojaproteine	5	10	13,1	2,5–38,4	11,1 (2,1)	2,1–32,6
<i>Säuglingsfolgenahrung</i>						
Kuhmilchproteine	5	7	6,6	1,5–12,1	5,6 (1,0)	1,3–10,3
Sojaproteine/Cerealien	5	11	11,4	0,3–42,4	9,7 (1,8)	0,3–36,1

¹ Anzahl verschiedener Präparate (Fabrikate) bzw. Muttermilchproben verschiedener Frauen.

² Anzahl total untersuchter Proben 1992–1999.

³ Bei kommerziellen Produkten gemäss Angaben des Herstellers, bezogen auf verzehrsfertige Zubereitung.

⁴ Männlicher Säugling im Alter von 3 Monaten, 5,4 kg Körpermasse und Trinkmenge 850 ml/Tag.

⁵ In Klammern µg/kg KM/Tag

⁶ Geschätzt aus den Messergebnissen von transitorischer Muttermilch (siehe Text).

sitorische Milch handelt, kann davon ausgegangen werden, dass die Selenkonzentration der entsprechenden reifen Milch noch rund 40 ng/ml beträgt, was einer Zufuhr von rund 6 µg/kg KM/Tag entspricht und zu keiner ernsthaften Gesundheitsgefährdung führen dürfte (vgl. Kapitel Toxizität). Das gleiche trifft für die Probe auf Sojabasis zu.

Bei Selensupplementierungen während der Schwangerschaft und der Laktationsperiode ist aber eine gewisse Vorsicht geboten. Damit eine Selenkonzentration von 40 ng/ml in der reifen Muttermilch nicht überschritten wird, sollte die totale mittlere tägliche Zufuhr von «natürlichem» Selen während der Laktationsperiode nicht höher als 200 µg sein. Bei einer täglichen Grundzufuhr von 50–60 µg resultieren somit maximale Supplemente von etwa 150 µg/Tag.

Auf eine spezielle Diskussion der täglichen Zufuhr durch *Säuglingsfolgenahrungen* wird verzichtet, da diese nicht als Vollnahrung dienen. Je mehr nun von der «Erwachsenennahrung» an den Säugling abgegeben wird, desto stärker erhöht sich seine Zufuhr und Plasmaselenkonzentration. Eine Portion Pouletfleisch von 20 g bzw. ein halbes Ei erhöhen beispielsweise die Selenzufuhr im Mittel bereits um rund 4 bzw. 6 µg, 20 g Kalbsleber um rund 7 µg und 50 g gekochte Teigwaren um 20 µg (13, 16). Diese Portionen aus der Erwachsenenkost erhöhen die Selenzufuhr für einen sechs Monate alten Säugling um 0,5–2,5 µg/kgKM/Tag. Eine entsprechende Schätzung für 10 Monate alte Säuglinge ergab für die Jahre 1978/80 im Mittel rund 40 µg/Tag (rund 4 µg/kgKM/Tag), wobei rund 70 % des Selens aus Getreideflocken und etwa 15 % aus Milch und Joghurt stammten (73).

Schlussfolgerungen

Verschiedene in den letzten Jahren von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Studien haben gezeigt, dass der Selenstatus der schweizerischen Bevölkerung tendenziell höher ist als jener in den angrenzenden Ländern und weitgehend den Ernährungsempfehlungen entspricht (13–15). Es ist daher anzunehmen, dass dadurch auch die Selenbedürfnisse der gestillten Säuglinge gedeckt sind, was die vorliegenden Messresultate bestätigen. Wird von einer mittleren Selenkonzentration reifer Muttermilch von 11–13 ng/ml ausgegangen, sind diese vergleichbar mit solchen aus europäischen Ländern, wie Spanien, Österreich, Polen, Belgien, Griechenland und Deutschland. Mit 15–20 ng/ml deutlich höhere Konzentrationen wurden in den USA und in Finnland etwa 10 Jahre nach dem Start der Selendüngung gemessen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Feststellungen anderer Studien vollumfänglich, dass nämlich bezüglich der Selenkonzentration gilt: Kuhmilch \approx Muttermilch $>$ Säuglingsanfangsnahrung auf Basis von Kuhmilch.

Wird in der Schweiz von einer täglichen Selenzufuhrmenge durch Frauen von im Mittel 50–60 μg ausgegangen (13–15), resultieren mit dem vorgeschlagenen Proportionalitätsfaktor von 0,22 ng/ml/ μg /Tag für reife Muttermilch Mittelwerte von 11–13 ng/ml, was sehr gut mit den vorliegenden Messergebnissen übereinstimmt. Die Beurteilung des Selenstatus eines Kollektivs von Frauen kann daher auch anhand der mittleren Selenkonzentration reifer Muttermilch vorgenommen werden, sofern während der Laktationsperiode keine Selensupplemente verabreicht werden. Reife Muttermilch stellt somit neben Haaren, Finger- und Zehennägeln einen weiteren nicht invasiven Parameter zur Bewertung des Selenstatus eines Kollektivs dar. Dabei werden, analog wie in Duplikatsstudien oder Messungen der Blutselenparameter, auch die langfristigen individuellen Verzehrsgewohnheiten miterfasst.

Der tägliche individuelle Selenbedarf von Säuglingen scheint mit 0,3–0,4 μg /kgKM/Tag tiefer zu liegen als die verschiedenen Empfehlungen im Bereich von 1–2 μg /kgKM/Tag vermuten lassen. Dies dürfte dadurch bedingt sein, dass Säuglinge mit einem Selenvorrat geboren werden. Anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse ergeben sich für die ersten drei Monate individuelle tägliche Zufuhrmengen von minimal 0,4 μg /kgKM (Sojaproteinbasis) bis 0,6 μg /kgKM (Muttermilch) und maximal 3,7 μg /kgKM (Muttermilch) bis 6,0 μg /kgKM (Sojaproteinbasis). Diese Werte decken den täglichen Bedarf und sind auch im Hinblick auf die Selentoxizität akzeptabel, obwohl der Maximalwert etwa 2-mal höher ist als der Grenzwert der Lebensmittelverordnung für mit Selen supplementierte Säuglingsnahrung. Anhand dieser Daten und deren Bewertung stellt sich auch vorderhand die Frage nach einer Selensupplementierung der Säuglingsanfangsnahrung nicht.

Was Selensupplemente an laktierenden Frauen betrifft, scheint eine gewisse Vorsicht geboten. Unter normalen Umständen kann auf sie verzichtet werden. Erscheint eine Supplementierung trotzdem angezeigt, so sollte eine tägliche Dosis

an «natürlichem» Selen von etwa 150 µg nicht überschritten werden, damit die Selenkonzentration der Muttermilch nicht auf mehr als 40–50 ng/ml ansteigt. Zudem scheint es, dass die für laktierende Frauen empfohlenen täglichen Zufuhrmengen an essentiellen Spurenelementen tendenziell überschätzt werden, da bei deren Ableitung Regulationsmechanismen zu wenig berücksichtigt werden.

Da das Wissen über die komplexen Interaktionen der verschiedenen essentiellen Spurenelemente untereinander und mit anderen körpereigenen und/oder -fremden Spurenstoffen noch äusserst beschränkt ist, insbesondere beim sich entwickelnden Organismus, sollten entsprechende Supplementierungen nur mit grösster Zurückhaltung vorgenommen werden, damit allfällige Ungleichgewichte vermieden werden können.

Da sich die Selenversorgung der schweizerischen Bevölkerung, analog wie jene mit Iod, jederzeit in unvorhersehbarer Weise ändern kann, sei es infolge veränderter Importgewohnheiten von Lebens- und Futtermittelherstellern oder durch andere Gepflogenheiten bei der Fütterung der Nutztiere sowie insbesondere auch infolge veränderter Verzehrsgewohnheiten der Bevölkerung, muss gefordert werden, dass der Selenstatus der Bevölkerung periodisch überprüft wird. Vorzugsweise durch Untersuchungen des Bluteserums- oder plasmas oder Muttermilch.

Dank

Herrn Prof. Dr. A. Mössinger, Universitätsfrauenklinik, kantonales Frauenspital, Neonatologie, Bern sowie den Herren Drs. C. Ramseier, Kantonschemiker Jura (vormals Kantonales Laboratorium Basel-Stadt) und M. Zehringer Kantonales Laboratorium Basel-Stadt danken wir für die Zurverfügungstellung der Muttermilchproben. Herrn Dr. H. Schwab, Chef der Abteilung Lebensmittelwissenschaft der Facheinheit Lebensmittel und Gebrauchsgegenstände, danken wir für die strategisch-operative Planung, die zielgerichtete Kommunikation nach innen und aussen, die kompetente transdisziplinäre und inputorientierte Grob- und Feinsteuerung der Ressourcen, die effiziente Elimination von Störfaktoren sowie für die stete Förderung der Mitarbeitenden der Sektion Lebensmittelchemie und -analytik in ihrer Kern- und Sozialkompetenz durch gezielte Weiterbildung.

Zusammenfassung

Anhand der Literatur werden die funktionellen Abhängigkeiten der mittleren Selenkonzentrationen der Muttermilch von der täglichen Selenzufuhr, der Plasma/Serum-Selenkonzentration sowie der tägliche Bedarf von Säuglingen an Selen und dessen Toxizität diskutiert. Individuelle tägliche Zufuhren von «natürlichem» Selen im Bereich von 0,3–5 µg/kg Körpermasse (KM) und für Kollektive solche von 1–5 µg/kgKM scheinen bei einer im Übrigen ausgewogenen Ernährung adäquat und sicher zu sein. Nach Aufschluss der getrockneten Proben mit dem Hochdruckverascher (HNO₃), wurde Selen als Hydrid in total 126 Muttermilchproben (transitorische, reife) aus Basel und Bern und 53 Proben von Säuglingsan-

Anhang Tabelle A

Literaturangaben zur mittleren Selenkonzentration reifer Muttermilch, Plasma bzw. Serum und mittleren täglichen Zufuhr von Frauen

Nr.	Land	Reife Muttermilch (30–60 Tage)			Plasma/Serum ¹			Mittlere tägliche Zufuhr ¹	
		Jahr ²	Konzentration (ng/ml)	Literatur	Jahr ²	Konzentration (ng/ml)	Literatur	Jahr ²	Menge (µg/Tag)
1	China ³	1982	2,6	74	1982	12 ⁵	74	1982	6,6
2	China ⁴	1982	3,8	74	1982	23 ⁵	74	1982	13,3
3	Finnland	1980	6,5	75	1981	58	37	1980	30,0
4	Österreich	1992*	8,4	76	1992*	70	76	1992*	36,0
5	Belgien	1983	9,7	21	1984*	83	78	1980/84	54,0
6	Deutschland	1989/90	9,9	30	1988*	67	81	1987	38,0
7	Finnland	1984	10,9	75	1985	79	83	1984	50,0
8	Kroatien	1992/93	11,1	84	1987*	64	85	1996	25,0
9	Australien	1986/87	12,3	39	- ⁶	96	39	-	-
10	Deutschland	1983/84	14,0	28	1984	72	87	1981	55,0
11	Finnland	1986	14,3	75	1986	100	75	1986	90,0
12	Deutschland	1977*	15,7	89	1977*	102	89	-	-
13	Finnland	1987/90	15,8	75	1987/90	115	83	1987/90	105,0
14	USA	1990*	16,6	44	1990*	122	44	1990*	70,0
15	USA	1984/85	16,8	40	1984/85	122	40	-	-
16	USA	1987*	17,5	35	1987*	149	35	1987*	80,0
17	Japan	1983*	17,7	20	1983*	135	20	1983	120,0
18	Finnland	1993	19,2	43	1993	111	43	1993	85,0

¹ nicht schwangere, nicht laktierende Frauen (ca. 18–40 Jahre)

² Jahr der Probenerhebung, falls mit * markiert Publikationsjahr

³ Keshan-Krankheit endemisch

⁴ keine Keshan-Krankheit

⁵ aus Vollblut berechnet (× 0,7)

⁶ keine Angaben

Anhang Tabelle B

Verhältnisse der mittleren Plasma/Serumkonzentration von Säuglingen zur mittleren täglichen Zufuhr

<i>Ernährung (seit Geburt)</i>	<i>Alter (Wochen)</i>	<i>Plasma/ Serum¹ (ng/ml)</i>	<i>Zufuhr (µg/Tag)</i>	<i>Verhältnis (ng/ml/ µg/Tag)</i>	<i>Lit.</i>
Muttermilch	13	57,3	10,4 ²	5,5	47
Muttermilch	13	78,2	10,1	7,7	19
Muttermilch	17	(40) 43,0	6,9 ²	6,2	30
Muttermilch	4	73,7	12,5	5,9	34
Muttermilch	4	38,2	6,3	6,0	91
Muttermilch	8	67,7	11,1	6,1	34
Muttermilch	12	67,7	9,6	7,1	34
Muttermilch ³	4	71,5	9,6	7,4	34
Muttermilch ³	8	101,5	14,0	7,3	34
Muttermilch ⁴	4	64,8	12,1	5,4	34
Muttermilch ⁴	8	83,5	11,2	7,5	34
Muttermilch ⁵	17	87,1	12,2	7,1	91
Kuhmilchpräp. I	13	33,5	3,8 ²	8,8	47
Kuhmilchpräp. II	13	30,6	4,4 ²	7,0	47
Kuhmilchpräp. III	13	29,3	6,7 ²	4,4	47
Kuhmilchpräp.					
11 verschiedene ⁶	17	(40) 29,0	5,2 ²	5,6	30
8 verschiedene ⁶ Präparate	13	55,0	7,2	7,6	19
Hypoallergene					
Kuhmilchpräp./verschiedene	17	20,0	5,0 ²	4,0	30
Kuhmilchpräp. A	4	(40) 32,7	4,9	6,7	34
Kuhmilchpräp. A	8	32,7	5,7	5,7	34
Kuhmilchpräp. A	12	36,1	6,0	6,0	34
Kuhmilchpräp. A + Selenit	4	62,5	17,1	2,4 ⁷	34
Kuhmilchpräp. A + Selenit	8	66,6	17,5	2,9 ⁷	34
Kuhmilchpräp. A + Selenit	12	70,0	19,8	2,6 ⁷	34
Sojabasis B	8	(95,5) 62,4	1,7	36,7	92
Sojabasis B	16	(95,5) 60,0	1,9	31,6	92
Sojabasis B + Selenat	8	(75,8) 78,2	10,0	1,9 ⁸	92
Sojabasis B + Selenat	16	(75,8) 75,0	12,3	1,4 ⁸	92

¹ in Klammern Mittelwert zum Zeitpunkt der Geburt

² berechnet aus den angegebenen Konzentrationen und der Trinkmenge von 700 ml/Tag (Muttermilch) und 850 ml/Tag (Präparate) gem. Lit. 19

³ laktierende Mütter erhielten täglich 200 µg Selen als Selenmethionin von der 4. bis 8. Woche nach der Geburt

⁴ laktierende Mütter erhielten täglich 200 µg Selen als Selenhefe von der 4. bis 8. Woche nach der Geburt

⁵ laktierende Mütter erhielten ab der 3./4. Woche nach der Geburt täglich 200 µg Selen als Selenhefe über 3 Monate

⁶ davon mindestens 2 auf Sojabasis

⁷ berechnet aus den Differenzen (Kuhmilchpräp. A + Selenit) - (Kuhmilchpräp. A)

⁸ analog Fussnote 7

Anhang Tabelle C

Vorkommen von Selen in Säuglingsanfangsnahrung (0.–4./6. Monat)

Produkt (Hersteller)	Jahr ¹	TM ² (ng/g)	Selenkonzentration		
			FM ³ (ng/ml)	Dichte (µg/100 kJ)	Protein ⁴ (ng/g)
<i>Kuhmilchbasis</i>					
Pre-Beba (Nestlé)	1997	79	10,4	0,37	693
	1999	37	4,7	0,17	325
Bimbosan (Bimbosan AG)	1997	66	9,7	0,31	508
	1999	39	5,7	0,18	300
AR1 (Milupa)	1999	59	8,2	0,30	482
Aptamil 1 (Milupa)	1999	21	3,0	0,10	176
Bébédor 1 (Milupa)	1997	75	10,5	0,36	583
	1999	34	4,7	0,16	261
Humana 1 (Galactina)	1995	43	6,0	0,21	319
	1997	57	8,7	0,27	407
	1999	53	7,8	0,25	393
Beba 1 (Nestlé)	1999	68	10,0	0,33	531
Adapta Digest (Wander)	1999	62	8,4	0,29	500
Adapta-1 (Wander)	1997	62	8,9	0,28	539
	1999	41	5,6	0,19	357
Adapta-2 (Wander)	1997	72	10,4	0,35	497
	1999	37	5,3	0,18	255
Pre-Aptamil (Milupa)	1997	67	8,7	0,31	580
	1999	47	6,1	0,22	407
Humana 2 ⁵ (Galactina)	1997	54	8,2	– ⁶	456
	1999	27	4,1	0,12	208
<i>Hypoallergene</i>					
Adapta HA 1 (Wander)	1999	60	8,4	0,28	465
Beba HA 1 (Nestlé)	1999	47	6,9	0,22	409
Aptamil HA Pre (Milupa)	1999	49	6,4	0,23	400
Humana HA 1 (Galactina)	1999	62	8,8	0,29	534
<i>Sojabasis</i>					
Bébédor Soja (Milupa)	1997	49	6,7	0,23	335
	1999	37	5,1	0,17	255
Mamina Soja (Galactina)	1995	272	38,4	1,33	1920
	1997	180	25,4	0,88	1270
	1999	89	12,1	0,46	674
SOM (Milupa)	1995	153	20,9	0,71	1045
	1997	38	5,2	0,18	260
	1999	19	2,5	0,09	125
Bisoja (Bimbosan AG)	1999	47	6,6	0,24	353
Humana SL (Galactina)	1995	54	7,7	0,26	388
Isomil ⁷ (Ross)	1997	90	11,9	0,43	700

¹ Jahr des Einkaufs² pro Trockenmasse³ pro Frischmasse (gemäss Hersteller für Alter 3 Monate)⁴ pro Protein⁵ ab 2 Monate⁶ keine Angaben⁷ Aus USA importiert, für Berechnungen nicht berücksichtigt.

Anhang Tabelle D

Vorkommen von Selen in Säuglingsfolgenahrung (empfohlen ab 2./ 4. Monat)

Produkt (Hersteller)	Jahr ¹	TM ² (ng/g)	Selenkonzentration		
			FM ³ (ng/ml)	Dichte (µg/100 kJ)	Protein ⁴ (ng/g)
<i>Kuhmilchbasis</i>					
Adaptamil 2 (Milupa)	1999	10	1,5	0,05	71
Adapta 3 (Wander)	1997	88	12,1	– ⁵	540
	1999	35	5,4	0,18	215
<i>Hypoallergene</i>					
Humana HA 1 + (Galactina)	1997	43	6,6	–	371
	1999	15	2,3	0,07	129
Adapta HA 2 (Wander)	1997	80	11,1	–	491
	1999	43	6,9	0,22	264
<i>Cerealien-Sojabasis</i>					
Bebe Menu (Reis) (Nestlé)	1997	34	1,5	0,21	453
	1999	47	1,6	0,29	627
Bimbo 7 (Cerealien) (Galactina)	1997	73	7,3	–	–
	1999	70	7,0	0,40	886
3-Korn (Cerealien) (Milupa)	1997	99	12,0	0,61	1100
	1999	49	1,9	0,30	613
Mamina Soja, Gemüse (Galactina)	1995	2	0,3	0,01	15
	1997	89	13,1	0,45	524
Mamina Soja, Junior (Galactina)	1995	357	42,4	1,64	1514
	1997	54	6,7	0,26	240
	1999	196	31,3	1,03	781

¹ Einkaufsjahr² pro Trockenmasse³ pro Frischmasse (Angaben des Herstellers für 3 Monate alten Säugling)⁴ bezogen auf Protein⁵ keine Angaben

fangsnahrung bzw. -folgenahrung mittels Atomfluoreszenz analysiert. Im Mittel ergeben sich für ein Kollektiv drei Monate alter Säugling Zufuhrmengen von etwa 2 µg/kgKM/Tag für Muttermilch und etwa die Hälfte bei ausschliesslicher Verwendung von Kuhmilchpräparaten. Die analog berechneten individuellen täglichen Zufuhrmengen reichen von 0,4–0,6 µg/kgKM bis zu 4–6 µg/kgKM. Es ergeben sich keine Hinweise, dass Säuglingsnahrung künftig zwingend mit Selen supplementiert werden müsste. Dies obwohl die mittlere tägliche Zufuhr eines mit Säuglingsanfangsnahrung ernährten Kollektivs deutlich unterhalb der USA-Empfehlungen von 2 µg/kgKM liegt.

Résumé

Sur la base de la littérature, sont discutées les dépendances fonctionnelles des concentrations moyennes en sélénium dans le lait maternel en fonction de l'apport quotidien en sélénium, dans le plasma/sérum ainsi que du besoin quotidien du nourrisson et de sa toxicité. Un apport quotidien individuel de sélénium «naturel» de l'ordre de 0,3–5 µg/kg de masse corporelle et pour des collectifs de 1–5 µg/kg de masse corporelle laisse apparaître une alimentation équilibrée, adéquate et sûre. Par minéralisation sous haute pression (HNO₃) d'échantillons lyophilisés, le sélénium est analysé en tant que hydrure dans 126 échantillons de lait maternel (transitoires, mûr) provenant de Bâle et Berne, ainsi que dans 53 échantillons d'aliments pour nourrissons, dont les laits de suite ont été analysés par fluorescence atomique. Pour un groupe de nourrissons de trois mois, la quantité d'apport quotidien est en moyenne estimée à environ 2 µg/kg de masse corporelle pour le lait maternel, et environ la moitié pour des préparations à base de lait de vache. Un apport individuel quotidien atteint 0,4–0,6 µg/kg de masse corporelle à 4–6 µg/kg de masse corporelle. Il n'est pas indiqué d'augmenter à l'avenir le dosage en sélénium dans les aliments pour nourrissons, bien que l'apport quotidien moyen soit en dessous des recommandations américaines de 2 µg/kg de masse corporelle.

Summary "Assessment of the Daily Intake of Selenium by Infants in Switzerland"

The selenium concentration of human milk as a function of the maternal daily intake and the plasma/serum concentration, the daily requirements of infants as well as its toxicity in infants are discussed based on literature data. An individual daily intake of «natural» selenium in the range of 0.3–5 µg/kg body mass (b.m.) appears adequate and safe provided the other nutrients meet the requirements. Selenium was analyzed in 126 human milk samples from Berne and Basel (transitional, mature) as well as in 53 infant formulas of the Swiss market. The samples were mineralized in a high-pressure asher (HNO₃) and selenium was subsequently measured by atomic fluorescence as its hydride. For a group of infants three month of age the mean daily intake estimates are about 2 µg/kg b.m. for mature human milk (Basel 1998/99) and about half for cow milk formulas, respectively. The individual daily intakes of

breast or formula fed infants at three months of age ranges from 0.4–0.6 µg/kg b.m. to 4–6 µg/kg b.m. These data suggest that there is no conclusive evidence to justify future fortification of infant formulas with selenium, although the mean daily intake of a formula fed collective amounts to distinctly less than the US recommendations of 2 µg/kg b.m.

Key words

Selenium, Human milk, Infant formulas, Assessment, Daily intake, Switzerland

Literatur

- 1 Akre, J. (Ed.): Infant feeding. The physiological basis. Bull. WHO, Supplem. to 67 (1989), WHO, Geneva 1990.
- 2 Anonymous: Principles of evaluating health risks from chemicals during infancy and early childhood: the need for a special approach. Environ. Health Criteria 59, WHO, Geneva 1986.
- 3 Mertz, W.: General considerations regarding requirements and toxicity of trace elements. In: Chandra, R.K. (ed.), Trace elements in nutrition of children – II, 23 (Nestlé nutrition workshop series), p. 1–13. Nestec Vevey/Raven Press, New York 1991.
- 4 Anonymous: Minor and trace elements in breast milk. Report of a joint WHO/IAEA collaborative study. WHO Geneva, IAEA Vienna 1989.
- 5 Krachler, M., ShiLi, F., Rossipal, E. and Irgolic, K.J.: Changes in the concentration of trace elements in human milk during lactation. J. Trace Elem. Med. Biol. 12, 159–176 (1998).
- 6 Lönnerdal, B.: Effects of milk and milk components on calcium, magnesium, and trace element absorption during infancy. Physiol. Rev. 77, 643–669 (1997).
- 7 Allan, C.B., Lacourciere, G.M. and Stadtman, T.C.: Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. Annu. Rev. Nutr. 19, 1–16 (1999).
- 8 Combs, G.F. Jr. and Combs, S.B.: The role of selenium in nutrition. Academic Press, Orlando 1986.
- 9 Behne, D. und Kyriakopoulos, A.: Neue Selenproteine: Verteilung, Funktion und Selenbedarf. In: Lombeck, I. (Hrsg.), Spurenelemente. Bedarf, Vergiftungen, Wechselwirkungen und neuere Messmethoden, S. 73–77. Wiss. Verlagsgesellschaft Stuttgart 1997.
- 10 Behne, D., Kyriakopoulos, A. Weiss-Nowak, C., Kalklösch, M., Westphal, C. and Gessner, H.: Newly found selenium-containing proteins in the tissues of the rat. Biol. Trace Elem. Res. 55, 99–110 (1996).
- 11 Stadtman, T.C.: Selenocysteine. Annu. Rev. Biochem. 65, 83–100 (1996).
- 12 Haldimann, M., Venner, T.Y. and Zimmerli, B.: Determination of selenium in the serum of healthy Swiss adults and correlation to dietary intake. J. Trace Elem. Med. Biol. 10, 31–45 (1996).
- 13 Haldimann, M., Dufossé, U. und Zimmerli, B.: Vorkommen von Selen in schweizerischen Cerealien. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 87, 267–295 (1996).
- 14 Zimmerli, B., Haldimann, M. und Sieber, R.: Selenstatus der schweizerischen Bevölkerung 2. Vorkommen in Lebensmitteln und im Blutserum. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 89, 147–176 (1998).
- 15 Zimmerli, B., Haldimann, M. und Sieber, R.: Selenstatus der schweizerischen Bevölkerung 3. Veränderungen und deren Ursachen. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 89, 257–293 (1998).
- 16 Haldimann, M., Mompart, A. und Zimmerli, B.: Vorkommen von Selen in Lebensmitteln tierischer Herkunft des Schweizer Marktes. Mitt. Lebensm. Hyg. 90, 241–281 (1999).
- 17 Zimmerli, B., Haldimann, M. und Sieber, R.: Selenstatus der schweizerischen Bevölkerung 1. Biologische Wirkungen, Bedarf und Toxizität von Selen. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 88, 732–754 (1997).

- 18 Sanz Alaejos, M. and Diaz Romero, C.: Selenium concentration in milks. *Food Chemistry* **52**, 1–18 (1995).
- 19 Smith, A.M., Picciano, M.F. and Milner, J.A.: Selenium intakes and status of human milk and formula fed infants. *Am. J. Clin. Nutr.* **35**, 521–526 (1982).
- 20 Higashi, H., Tamari, H., Kuroki, Y. and Matsuda, I.: Longitudinal changes in selenium content of breast milk. *Acta Paediatr. Scand.* **72**, 433–436 (1983).
- 21 Roekens, E., Deelstra, H. and Robberecht, H.: Trace elements in human milk, selenium a case study. *Sci. Total Environ.* **42**, 91–108 (1985).
- 22 Bratakos, M.S. and Ioannou, P.V.: Selenium in human milk and dietary selenium intake by Greeks. *Sci. Total Environ.* **105**, 101–107 (1991).
- 23 Tamari, Y., Chayama, K. and Tsuji, H.: Longitudinal study on selenium content in human milk particularly during early lactation compared to that in infant formulas and cow's milk in Japan. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **9**, 34–39 (1995).
- 24 Trafikowska, U., Sobkowiak, E., Butler, J.A., Whanger, P.D. and Zachara, B.A.: Organic and inorganic selenium supplementation to lactating mothers increase the blood and milk Se concentrations and Se intake by breast-fed infants. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **12**, 77–85 (1998).
- 25 Cervilla, J.R., Fraga, J.M., Cocho, J.A., Dominguez Gonzalez, R. and Bermejo, P.: Transfer of trace elements in the human milk. In: Köhrle, J. (Hrsg.), *Mineralstoffe und Spurenelemente, Molekularbiologie, Interaktionen mit dem Hormonsystem, Analytik*, S. 121–130. Verlagsgesellschaft Stuttgart 1998.
- 26 Li, F., Rossipal, E. and Irgolic, K.J.: Determination of selenium in human milk by hydride cold-trapping atomic absorption spectrometry and calculation of daily selenium intake. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3265–3268 (1999).
- 27 Lombeck, I., Kasperek, K., Bonnermann, B., Feinendegen, L.E. and Bremer, H.J.: Selenium content of human milk, cow's milk and cow's milk infant formulas. *Eur. J. Pediatr.* **129**, 139–145 (1978).
- 28 Brätter, P., Negretti de Brätter, V.E., Rösick, U. and von Stockhausen, H.B.: Selenium in the nutrition of infants: influence of the maternal selenium status. In: Chandra, R.K. (ed.), *Trace elements in nutrition of children-II*. **23**, 79–90. Nestec Ltd., Vevey/Raven press Ltd., New York 1991.
- 29 Schramel, P., Hasse, S. and Ovcár-Pavlu, J.: Selenium, cadmium, lead, and mercury concentrations in human breast milk, in placenta, maternal blood, and the blood of the newborn. *Biol. Trace Elem. Res.* **15**, 111–124 (1988).
- 30 Jochum, F., Fuchs, A., Menzel, H. and Lombeck, I.: Selenium in German infants fed breast milk or different formulas. *Acta Paediatr.* **84**, 859–862 (1995).
- 31 Sanz Alaejos, M. and Diaz Romero, C.: Selenium in human lactation. *Nutr. Rev.* **53**, 159–166 (1995).
- 32 Kumpulainen, J., Salmenperä, L., Siimes, M.A., Koivistoinen, P., Lehto, J. and Perheentupa, J.: Formula feeding results in lower selenium status than breast-feeding or selenium supplemented formula feeding: longitudinal study. *Am. J. Clin. Nutr.* **45**, 49–53 (1987).
- 33 Kumpulainen, J., Vuori, E., Kuitunen, P., Mäkinen, S. and Kara, R.: Longitudinal study on the dietary selenium intake of exclusively breast-fed infants and their mothers in Finland. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **53**, 420–426 (1983).
- 34 McGuire, M.K., Burgert, S.L., Milner, J.A., Glass, L., Kummer, R., Deering, R., Boucek, R. and Picciano, M.F.: Selenium status of infants is influenced by supplementation of formula or maternal diets. *Am. J. Clin. Nutr.* **58**, 643–648 (1993).
- 35 Levander, O.A., Moser, P.B. and Morris, V.C.: Dietary selenium intake and selenium concentrations of plasma, erythrocytes, and breast milk in pregnant and postpartum lactating and nonlactating women. *Am. J. Clin. Nutr.* **46**, 694–698 (1987).

- 36 McGuire, M.K., Burgert, S.L., Milner, J.A., Glass, L., Kummer, R., Deering, R., Boucek, R. and Picciano, M.F.: Selenium status of lactating women is affected by the form of selenium consumed. *Am. J. Clin. Nutr.* **58**, 649–652 (1993).
- 37 Kumpulainen, J., Salmenperä, L., Siimes, M.A., Koivistoinen, P. and Perheentupa, J.: Selenium status of exclusively breast-fed infants as influenced by maternal organic or inorganic selenium supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.* **42**, 829–835 (1985).
- 38 Rodríguez Rodríguez, E.M., Sanz Alaejos, M. and Díaz Romero, C.: Concentrations of selenium in human milk. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. A.* **207**, 174–179 (1998).
- 39 Cumming, F.J., Fardy, J.J. and Woodward, D.R.: Selenium and human lactation in Australia: milk and blood selenium levels in lactating women, and selenium intakes of their breast-fed infants. *Acta Paediatr.* **81**, 292–295 (1992).
- 40 Mannan, S. and Picciano, M.F.: Influence of maternal selenium status on human milk selenium concentration and glutathione peroxidase activity. *Am. J. Clin. Nutr.* **46**, 95–100 (1987).
- 41 Grandjean, P., Weihe, P., Needham, L.L., Burse, V.W., Patterson, D.G. (Jr.), Sampson, E.J., Jørgensen, P.J. and Vahter, M.: Relation of a seafood diet to mercury, selenium, arsenic, and polychlorinated biphenyl and other organochlorine concentrations in human milk. *Environ. Res.* **71**, 29–38 (1995).
- 42 Yang, G., Zhou, R., Yin, S., Gu, L., Yan, B., Lin, Y., Liu, Y. and Li, X.: Studies of safe maximal daily dietary selenium intake in a seleniferous area in China. I. Selenium intake and tissue selenium levels of the inhabitants. *J. Trace Elem. Electrolytes Hlth. Dis.* **3**, 77–87 (1989).
- 43 Kantola, M., Mand, E., Viitak, A., Juravskaja, J., Purkunen, R., Vartiainen, T., Saarikoski, S. and Pasanen, M.: Selenium contents of serum and human milk from Finland and neighboring countries. *J. Trace Elem. Med.* **10**, 225–232 (1997).
- 44 Mangels, A.R., Moser-Veillon, P.B., Patterson, K.Y. and Veillon, C.: Selenium utilization during human lactation by use of stable-isotope tracers. *Am. J. Clin. Nutr.* **52**, 621–7 (1990).
- 45 Cumming, F.J., Fardy, J.J. and Briggs, M.H.: Trace elements in human milk. *Obstet. Gynecol.* **62**, 506–508 (1983).
- 46 Dubois, F., Teby, A., Belleville, F., Nabet, P. et Paysant, P.: Valeurs usuelles du sélénium sérique dans une population de l'Est de la France. *Ann. Biol. clin.* **48**, 28–32 (1990).
- 47 Brätter, P., Negretti de Brätter, V.E., Rösich, U. and v. Stockhausen, H.B.: Trace element concentration in serum of infants in relation to dietary sources. In Brätter, P. and Schramel, P. (eds.), *Trace element analytical chemistry in medicine and biology* 4, p. 133–143. Walter de Gruyter Berlin, New York 1987.
- 48 Daniels, L., Gibson, R. and Simmer, K.: Selenium status of preterm infants: the effect of post-natal age and method of feeding. *Acta Paediatr.* **86**, 218–288 (1997).
- 49 Daniels, L.A.: Selenium metabolism and bioavailability. *Biol. Trace Elem. Res.* **54**, 185–199 (1996).
- 50 Shen, L., Van Dael, P., Luten, J. and Deelstra, H.: Estimation of selenium bioavailability from human, cow's, goat and sheep milk. *Intern. J. Food Sci. Nutr.* **47**, 75–81 (1996).
- 51 Daniels, L.A., Gibson, R.A. and Simmer, K.: Glutathione peroxidase is not a functional marker of selenium status in the neonatal period. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **26**, 263–268 (1998).
- 52 Anonymous: National Research Council, Food and Nutrition Board, Commission on Life Science: *Recommended Dietary Allowances*, 10th ed., p. 217–224. National Academic Press, Washington DC 1989.
- 53 Anonym: *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*, 1. Auflage. DGE, ÖGE, SGE und SVE, Umschau/Braus, Frankfurt a.M., 195–200, 2000.
- 54 Zachara, B.A., Wardak, C., Didkowski, W., Maciag, A. and Marchaluk, E.: Changes in blood selenium and glutathione concentrations and glutathione peroxidase activity in human pregnancy. *Gynecol. Obstet. Invest.* **35**, 12–17 (1993).

- 55 Brätter, P., Negretti, S., Rösick, U. and Stockhausen, H.B.: Development of selenium deficiency in the total parental nutrition of infants. In: Combs, G.F.Jr., Spallholz, J.E., Levander O.A. and J.E. Oldfield (eds.), Selenium in biology and medicine, Part B, p. 652–656. AVI, Van Nostrand Reinhold New York 1987.
- 56 Levander, O.A.: Upper limit of selenium in infant formulas. *J. Nutr.* **119**, 1869–1873 (1989).
- 57 Anonymous (WHO/FAO/IAEA): Trace elements in human nutrition and health, pp. 105–122 (selenium) and pp. 49–71 (iodine). World Health Organization, Geneva 1996.
- 58 Jochum, F., Terwolbeck, U., Meinhold, H., Behne, D., Menzel, H. and Lombeck, I.: Effects of low selenium state in patients with phenylketonuria. *Acta Paediatr.* **86**, 775–777 (1997).
- 59 Lombeck, I., Jochum, F. and Terwolbeck, U.: Selenium status in infants and children with phenylketonuria and in maternal phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr.* **155**, (Supplem. 1), S140–S144 (1996).
- 60 Salemperä, L.: Defeating subclinical deficiency of essential trace elements in children with special reference to zinc and selenium. *Clin. Biochem.* **30**, 115–120 (1997).
- 61 Kumpulainen, J.: Selenium: requirement and supplementation. *Acta Paediatr. Scand.*, Supplem. **351**, 114–117 (1989).
- 62 Finley, J.W., Duffield, A., Pengcheng, Ha., Vanderpool, R.A. and Thomson, C.D.: Selenium supplementation affects the retention of stable isotopes of selenium in human subjects consuming diets low in selenium. *Br. J. Nutr.* **82**, 357–360 (1999).
- 63 Arthur, J.R., Beckett, G.J. and Mitchell, J.H.: The interactions between selenium and iodine deficiencies in man and animals. *Nutr. Res. Rev.* **12**, 55–73 (1999).
- 64 Arthur, J.R. and Beckett, G.J.: Thyroid function. *Br. Med. Bull.* **55**, 658–668 (1999).
- 65 Brätter, P., Negretti de Brätter, V.E., Jaffé, W.G. and Mendez Castellano, H.: Selenium status of children living in seleniferous areas of Venezuela. *J. Trace Elem. Electrolyt. Hlth. Dis.* **5**, 269–270 (1991).
- 66 Haldimann, M. and Zimmerli, B.: Hydrid-ICP-MS-Bestimmungen von Selen in Weizen mit Isotopenverdünnungskalibration. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **85**, 111–131 (1994).
- 67 Corns, W.T., Stockwell, P.B., Ebdon, L. and Hill, S.J.: Development of an atomic fluorescence spectrometer for the hydride-forming elements. *J. Anal. Atom. Spectrom.* **8**, 71–77 (1993).
- 68 Farhat, A., Picciano, M.F., Lammi-Keefe, C.J. and DeSilva H.N.: Evidence for altered selenium status in pregnant women with diabetes. *J. Trace Elem. Experim. Med.* **8**, 29–39 (1995).
- 69 Anonym: Tätigkeitsbericht der Sektion Lebensmittelchemie und -analytik für das Jahr 1998. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **90**, 376–377 (1999).
- 70 Aeschlimann, A.: persönliche Mitteilung, November 1999
- 71 Van Dael, P., Vlaemynck, G., Van Renterghem, R. and Deelstra, H.: Selenium content of cow's milk and its distribution in protein fractions. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **192**, 422–426 (1991).
- 72 Debski, B., Picciano, M.F. and Milner, J.A.: Selenium content and distribution of human, cow and goat milk. *J. Nutr.* **117**, 1091–1097 (1987).
- 73 Erard, M., Miserez, A. et Zimmerli, B.: Exposition des nourrissons au plomb, cadmium, zinc et sélénium de provenance alimentaire. *Trav. chim. aliment. hyg.* **73**, 394–411 (1982).
- 74 Yang, G.Q., Zhu, L.Z., Liu, S.J., Gu, L.Z., Qian, P.C., Huang, J.H. and Lu, M.D.: Human selenium requirements in China. In: Combs jr., G.F., Levander, O.A., Spallholz, J.E. and Oldfield, J.E. (eds), Selenium in biology and medicine. Part B, p. 589–607. AVI, van Nostrand Reinhold Comp. New York 1987.
- 75 Kantola, M. and Vartiainen, T.: Selenium content of breast milk in Finland after fertilization of soil with selenium. *J. Trace Elem. Electrolyt. Hlth. Dis.*, **5**, 283–284 (1991).
- 76 Tiran, B., Tiran, A., Petek, W., Rossipal, E. and Wawschinek, O.: Selenium status of healthy children and adults in Styria (Austria). *Trace Elem. Med.* **9**, 75–79 (1992).

- 77 Pfannhauser, W.: Das essentielle Spurenelement Selen: Bedeutung, Wirkung und Vorkommen in der Nahrung. Ernährung, **16**, 642–646 (1992).
- 78 Vertongen, F., Nève, J., Cauchie, P. and Molle, L.: Zinc, copper, selenium and glutathione peroxidase in plasma and erythrocytes of Down's syndrom (trisomy 21) patients. Interpretation of some variations. In: Brätter, P. and Schramel, P. (eds.), Trace element analytical chemistry in medicine and biology, **3**, p. 175–181. Walter de Gruyter, Berlin, New York 1984.
- 79 Roekens, E.J., Robberecht, H.J. and Deelstra, H.A.: Dietary selenium intake in Belgium for different population groups at risk for deficiency. Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. **182**, 8–13 (1986).
- 80 Robberecht, H.J. and Deelstra, H.A.: Dietary selenium intake in Belgium. Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. **178**, 266–271 (1984).
- 81 Oster, O. and Prellwitz, W.: The daily selenium intake of West German adults. Biol. Trace Elem. Res. **20**, 1–14 (1989).
- 82 Oster, O., Schmiedel, G. and Prellwitz, W.: Correlations of blood selenium with hematological parameters of West German adults. Biol. Trace Elem. Res. **15**, 47–81 (1988).
- 83 Wang, W.-C., Mäkelä, A.L., Nântö, V., Mäkelä, P. and Lagström, H.: The serum selenium concentrations in children and young adults: a long-term study during the Finnish selenium fertilization program. Eur. J. Clin. Nutr. **52**, 529–535 (1998).
- 84 Mandić, Z., Mandić, M.L., Grgić, J., Hasenay, D. and Grgić, Z.: Selenium content of breast milk. Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. **201**, 209–212 (1995).
- 85 Maksimović, Z.J. †, Djujić, I., Jović, V. and Ršumović, M.: Selenium deficiency in Yugoslavia. Biol. Trace Elem. Res. **33**, 187–196 (1992).
- 86 Klavec, T., Mandić, M.L., Grgić, J., Primorac, Lj., Ikić, M., Lovrić, T., Grgić, Z. and Herceg, Z.: Daily dietary intake of selenium in eastern Croatia. Sci. Total Environ. **217**, 127–136 (1998).
- 87 Marchaluk, E., Persson-Moschos, M., Thorling, E.B. and Åkesson, B.: Variation in selenoprotein P concentration in serum from different European regions. Eur. J. Clin. Nutr. **49**, 42–48 (1995).
- 88 Schelenz, R.F.W.: Intake of Zn, Mn and Se by adult females. – A total diet study. In: Brätter, P. and Schramel, P. (eds), Trace element analytical chemistry in medicine and biology, **3**, p. 73–89. Walter de Gruyter, Berlin, New York 1984.
- 89 Lombeck, I., Kasperek, K., Harbisch, H.D., Feinendegen, L.E. and Bremer, H.J.: The selenium state of healthy children. Eur. J. Pediat. **125**, 81–88 (1977).
- 90 Hirai, K., Noda, K. and Danbara, H.: Selenium intake based on representative diets in Japan, 1957 to 1989. Nutr. Res. **16**, 1471–1477 (1996).
- 91 Trafikowska, U., Zachara, B.A., Wiacek, M., Sobkowiak, E. and Czerwionka-Szaflarska, M.: Selenium supply and glutathione peroxidase activity in breastfed Polish infants. Acta Paediatr. **85**, 1143–1145 (1996).
- 92 Smith, A.M., Chen, L.W. and Thomas, M.R.: Selenate fortification improves selenium status of term infants fed soy formula. Am. J. Clin. Nutr. **61**, 44–47 (1995).

Korrespondenzadresse: Dr. Bernhard Zimmerli, Bundesamt für Gesundheit, Abteilung Lebensmittelwissenschaft, Sektion Lebensmittelchemie und -analytik, CH-3003 Bern; ab 1. Januar 2001 Birkenweg 80, CH-3322 Mattstetten

Fluoreszenzdetektion von Dihydrostreptomycin und Streptomycin in Fleisch, Leber und Niere mit HPLC und Nachsäulenderivatisation

Dominik Guggisberg, Christoph Aeppli* und Herbert Koch, Bundesamt für Veterinärwesen, Liebefeld-Bern

Eingegangen 8. August 2000, angenommen 5. September 2000

Einleitung

Dihydrostreptomycin (DHS) und Streptomycin (STR) gehören in die Familie der Aminoglycosid-Breitband-Antibiotika. Sie wirken gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien und werden sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin häufig eingesetzt. Dabei ist in der Veterinärmedizin praktisch ausschliesslich DHS alleine oder in Kombination mit Benzylpenicillin, Nafcillin und Flumethason bekannt. DHS wird nur langsam ausgeschieden und als Nebenwirkungen sind Ohren- und Nierenschädigungen bekannt. STR wird in der Schweiz gemäss Tierarzneimittelkompendium 1997/8 nicht als Tierarzneimittel eingesetzt.

Aus Kulturlösungen von *Streptomyces griseus* wird Streptomycin isoliert. Durch Reduktion der Aldehydfunktion kann Dihydrostreptomycin «semi-synthetisch» hergestellt werden (Abb. 1). Als Besonderheit innerhalb der Aminoglycosid-Antibiotika zählen die zwei Guanidinogruppen im Molekül der beiden Streptomycine STR und DHS.

Dihydrostreptomycin (Handelsnamen: Combisec, Streptopenicillin, Dihydrostreptomycin, Pen-Strep usw.) mit seinem breiten Wirkungsspektrum als Antibiotika ist in der Veterinärmedizin sowohl in der Therapie als auch in der Prophylaxe von Mastitis und anderen bakteriellen Infektionen stark verbreitet.

Rückstände dieses Arzneimittels in der Milch, im Honig und im Fleisch können für den Konsumenten eine potentielle gesundheitliche Gefahr darstellen (Resistenzbildung und Allergien).

Generelle Wartezeiten sind wie folgt vorgeschrieben: Fleisch, Leber: 5–14 Tage, Niere, Injektionsstelle: bis 45 Tage

* Teil einer Praktikumsarbeit

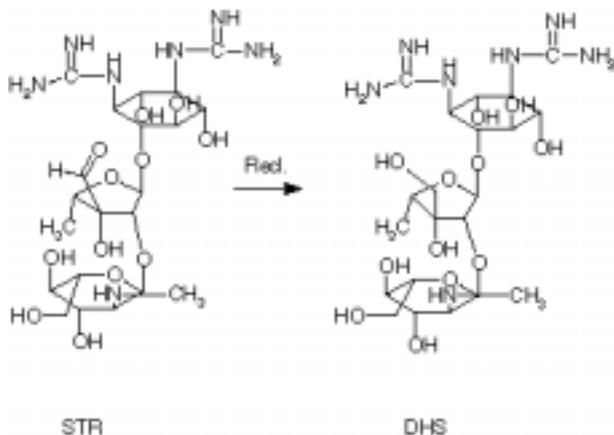


Abbildung 1 Chemische Strukturen von STR und DHS

In der Schweiz gilt gemäss der Fremd- und Inhaltsstoffverordnung (FIV 1998) für Streptomycin ein Grenzwert für Fleisch und Leber von 500 ppb und 1000 ppb für Niere (DHS ist nicht namentlich vermerkt).

Damit eine möglichst grosse Anzahl von tierischen Gewebeproben auf Dihydrostreptomycin-Rückstände in Fleisch und Innereien überprüfbar ist, benötigten wir eine HPLC-Analysenmethode mit genügender Empfindlichkeit und hohem Durchsatz.

Dihydrostreptomycin ist eine sehr polare Substanz, die aufgrund der Struktur recht thermo- und pH-stabil ist (Stabilitätsoptimum zwischen pH 3 und 7 (1)). Weder Streptomycin noch Dihydrostreptomycin selber besitzen einen UV-aktiven Chromophor oberhalb 220 nm, deshalb müssen sie zwingend zwecks Nachweis im UV- oder Fluoreszenzdetektor vorsäulen- oder nachsäulenderivatisiert oder im Massenspektrometer detektiert werden.

Bisher sind einige Arbeiten erschienen, die aufzeigen, wie Dihydrostreptomycin (DHS) und/oder Streptomycin (STR) in Milch, Fleisch und Innereien bestimmt werden können. Allgemein werden STR und DHS nach einem mehr oder weniger zeitaufwendigen «Clean up» mit 1,2-Naphthochinon-4-sulfonsäure (NQS) nachsäulenderivatisiert und im Fluoreszenzdetektor nachgewiesen, nach der Originalvorschrift von Kubo *et al.* (2) oder mit einem Massenspektrometer detektiert (3).

B. Shaikh *et al.* und N. Isoherranen *et al.* (4) geben einen Überblick, wie Aminoglycoside grundsätzlich aus Fleisch und Flüssigkeiten von Schlachttieren nachgewiesen werden können. G. Gerhardt *et al.* (5) zeigen den Nachweis von STR und DHS in Milch, Fleisch und Niere auf. Das Verfahren beruht auf der «on-line»-Pro-

benanreicherung und einem Fluoreszenznachweis mit Nachsäulenderivatisierung. Die Nachweisgrenze wird mit 10 ppb bzw. 20 ppb angegeben. *H. Abbasi et al.* (6) beschreiben eine HPLC-Methode, die darauf basiert, dass DHS aus Fleisch, Niere und Milch durch Ionenaustausch (SCX-SPE) gereinigt wird und anschliessend mit NQS nachsäulenderivatisiert wird. Die Nachweisgrenze liegt bei 10 bzw. 15 ppb. *P. Edder et al.* (7) haben kürzlich eine HPLC-Methode vorgestellt, bei der Streptomycin aus Fleisch, Leber, Milch und Honig durch Ionenaustausch (SCX-SPE), anschliessend auf einer C18-Kartusche aufgereinigt wird und nach der Trennung durch Ionenpaarchromatographie mit NQS nachsäulenderivatisiert wird. Die Nachweisgrenze liegt je nach Matrix bei 5–100 ppb.

J. Henion et al. (3) berichten über eine Aminoglycosid-Multianalysenmethode mit LC-MS-MS Detektion, hauptsächlich als Bestätigungsmethode eingesetzt. Dabei können neben STR und DHS, Gentamicin und Neomycin noch Spectinomycin und Hygromycin nachgewiesen werden. Als interner Standard wird Tobramycin verwendet. Für die Extraktion und Aufreinigung wird eine modifizierte MSPD-Methode mit Cyanopropyl-Material eingesetzt.

Wir berichten in der folgenden Arbeit von einer HPLC-Analysenmethode für DHS und STR in Fleisch, Leber und Niere vom Rind, Kalb und vom Schwein. Es geht in der Methode darum, DHS und STR mittels Ionenaustausch auf einer schwachen Kationentauschersäule (CBA) möglichst rein und quantitativ anzureichern, um es dann mit Ionenpaarchromatographie möglichst vollständig von der Fleischmatrix abzutrennen und durch Nachsäulenderivatisierung mit NQS sehr selektiv nachzuweisen. Das «Clean up» wurde auf einen hohen Probendurchsatz optimiert. Zudem ist bei positivem Befund geplant, die gleiche Analysenprobe nochmals (ohne weitere Reinigungsschritte) mit LC-MS zu bestätigen.

Kurzbeschreibung der Methode

Rind-, Kalb- und Schweinefleisch: Die Probe wird homogenisiert, mit wässriger Perchlorsäurelösung (20 ml) mittels Polytron behandelt und zentrifugiert. Der Überstand wird mit festem di-Kaliumhydrogenphosphat auf $\text{pH} = 6,8 \pm 0,3$ justiert und die rot-gelbe Lösung erneut zentrifugiert und anschliessend auf eine konditionierte CBA-SPE-Kartusche (schwacher Kationentauscher) appliziert. DHS und STR werden direkt mittels einer sauren Methanolösung eluiert, eingengt und in mobiler Phase aufgenommen. Die Analyse geschieht an einer Spezialsäule (Nucleosil AB) mittels Ionenpaar-Reagenzien. DHS und STR werden nach der Analyse mit NQS derivatisiert und mittels Fluoreszenzdetektor nachgewiesen. Erwartungsgemäss wird in Fleisch nur DHS detektiert, da nur dieses Tierarzneimittel zugelassen ist.

Bestätigungsmethode

Bei positivem Befund könnten die Proben nochmals mit LC-MS nachbestätigt werden. Es wäre aber durchaus denkbar, die hier vorliegende Arbeit auch als Bestä-

tigungsmethode nach einem immunchemischen Screening (8) oder nach dem Charm-Test zu verwenden.

Material und Methode

Standardsubstanz, Standardlösungen

Dihydrostreptomycinsulfat, Streptomycinsulfat

Lieferant der Substanz: Sigma D7253, S6501

Herstellung der Stammlösung und der Verdünnungslösungen:

(Die Wirkstoffkonzentration kann je nach Charge geringfügig schwanken, deshalb ist die Gehaltsangabe des Lieferanten wenn möglich zu beachten!)

DHS Stammlösung	12,5 mg Dihydrostreptomycinsulfat werden mit Wasser zu 10 ml gelöst (1 µg DHS/µl)
Standard I	100 µl der Stammlösung werden mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt (10 ng DHS/µl)
Standard II	1 ml des Standards I wird mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt (1 ng DHS/µl)
STR Stammlösung	12,5 mg Streptomycinsulfat werden mit Wasser zu 10 ml gelöst (1 µg STR/µl)
Standard I	100 µl der Stammlösung werden mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt (10 ng STR/µl)
Standard II	1 ml des Standards I wird mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt (1 ng STR/µl)

Chemikalien für das Clean up

- Wasser, Milli-Q (Millipore-Waters)
- Perchlorsäure (Merck z.A. 518, 60 %)
- K_2HPO_4 (Merck z. A.5099)
- Ameisensäure (p.a. Merck)
- Perchlorsäure = 0,01 M (1+ 899 = 1:900 verdünnt)
- 0,01 M Perchlorsäure mit festem K_2HPO_4 auf pH = 6,9 bringen
- Methanol (Merck, LiChrosolv)

Reagenzien für HPLC

- Acetonitril (Chromasolv)
- d,l-Campher-10-sulfonat (Aldrich 97-98 %)
- EDTA (Titriplex III Merck z. A.)
- Salzsäure (1M): Titrisol (Merck 9970)

Mobile Phase

A = Acetonitril

B = 0,05 mol/l (12,7 g/l) d,l-Campher-10-sulfonat und 20 mg EDTA in Wasser, mit 1M Salzsäure auf pH = 2,4 ± 0,3 eingestellt

Reagenzien für Nachsäulenderivatisierung

- 1,2-Naphthochinon-4-sulfonsäure Kaliumsalz (NQS, techn., 90%, Aldrich 18,918-9)
- Natriumhydroxid (Merck z. A. 6498)

Herstellung der Lösungen A und B für die Nachsäulenderivatisierung

Lösung A: (Die Lösung ist zu filtrieren und im Eisbad während der ganzen Chromatographiezeit zu kühlen)

- 20 mg NQS in 100 ml Wasser

Lösung B: (Die Lösung ist zu filtrieren)

- 2 g Natriumhydroxid in 100 ml Wasser

Die Weglängen der Teflonschläuche von T-Stück zum nächsten T-Stück bzw. bis zum Fluoreszenz-Detektor:

- A – B: 27 cm (Ø 0,25 mm)
- B – Detektor: 4 m (Ø 0,25 mm), bei 60 °C thermostatisiert mit Reaktionseinheit (z.B. Timberline)

Geräte und Hilfsmittel

- Probenzerkleinerungsgerät (Moulinex)
- Homogenisiergerät (Polytron) mit 12 mm-Mixstab
- Analysenwaage (0,1 mg, Mettler), Laborschnellwaage
- Zentrifuge (Hettich, Rotanta bis 4000 U/min)
- Magnetrührer mit Magnetrührstäbchen
- SPE Baker CBA, 7211-03, 3ml (Stehelin, Basel) oder IST-CBA (520-0050B), 500 mg/3ml
- Vakuumeinheit für SPE-Trennsäulen (J&W)
- Wasserstrahlvakuum
- 1000 µl-Spritze, 250 µl-Spritze, 100 µl-Spritze, 50 µl-Spritze (Hamilton)
- 1500 µl-Micro-Vials (HP)
- FLAWA-Milchfilter
- Millex GP Filter (Millipore)
- 10 ml Reagenzglas
- HPLC 600 E (Waters)
- Nachsäulenderivatisierung: z. B. Reaktionspumpe Hitachi 655A-13 mit Reaktionseinheit z. B. Timberline
- Autosampler (z. B. Gilson 231-401)

- Jasco FP920 Fluoreszenzdetektor
- Auswertestation Baseline (Waters)

Probenaufbereitung

Extraktion der Probe

(Rindsleber, Rindsniere, Kalbsleber, Kalbsniere, Schweineleber und Schweineniere)

Die Probe wird aufgetaut und mit der Moulinette zu einem feinen Brät bzw. Brei zerkleinert, nachdem das sichtbare Fett weggeschnitten wurde. 5 g der Probe werden in ein Zentrifugenglas eingewogen und mit 20 ml 0,01M Perchlorsäurelösung (pH = 2) mittels Polytron behandelt. Es wird 15 min bei ca. 2900 g und 18° C zentrifugiert.

Die rot-gelbe Lösung wird durch einen FLAWA-Milchfilter in einen Messzylinder dekantiert und der Filter mit 2 ml Wasser nachgewaschen. Die rötliche Lösung wird mit ca. 180 mg festem K_2HPO_4 auf einen pH von 6,6–7,0 eingestellt. Darauf wird die leicht trübe Lösung erneut 10 min zentrifugiert (2900 g). Eine Filtration über Millex-GP kann zwar noch erfolgen, ist jedoch meist gar nicht nötig.

Reinigung der Probe

Eine CBA-SPE-Baker-Säule wird mit 5 ml MeOH, 5 ml Milli-Q-Wasser und 5 ml 0,01M Perchlorsäure/Phosphat-Puffer (pH = 6,9) vorkonditioniert. Der Probeextrakt wird anschliessend appliziert und wenn möglich ohne Vakuum laufen gelassen. (Achtung! Ein Verstopfen der Säule erzwingt meist ein Vakuum und die Recovery kann absinken.) Der Waschschrift beinhaltet 5 ml Wasser und 1 ml Methanol. Darauf wird die Säule für 3 min trocken gesaugt. Eluiert wird in ein RG mit 3 ml 5 % Ameisensäure/Methanol (immer frisch herstellen). Das Eluat wird mit Stickstoff bei 40° C zur Trockene eingengt, mit 3 ml mobiler Phase B gelöst, in ein Autosampler-Vial abgefüllt und davon 20 µl injiziert.

Analyse mit HPLC: Bedingungen, Vorgehen und Auswertung

Mobile Phase	A = 14–16% Acetonitril B = 86–84% (0.05 mol/l) d,l-Campher-10-sulfonatpuffer pH = 2,4 ± 0,3
Vorsäule	Nucleosil 5-C18-AB (5 µm)
Stationäre Phase	Nucleosil 5-C18-AB (5 µm) 125 mm × 3 mm × 5 µm
Fluss	0,6 ml/min
Ofentemperatur	45° C
Einspritzvolumen	20 µl
Elutionsdauer	10–15 min
Fluoreszenz-Detektor	Anregung/Emission: 260/435 nm oder 347/418 nm
Auswertestation	Baseline Millipore Waters

Nachsäulenderivatisierung mittels Merck-Hitachi 655A-13, Flow 0,15¹, der Reaktionsweg 2 (4 m) ist auf 60° C thermostatisiert.

Validierung der Methode

Tabelle 1

Wiederfindungen bei dotiertem Rindsmuskel

Rindsmuskel: ¹ dotierter Gehalt (ppb)	Anzahl	Mittelwert (ppb)	Standard- abweichung (ppb)	Relative Standard- abweichung (%)	Mittlere Wiederfindung (%)
500	5	402	51	13	80

¹ Die Methode wurde auch für Schweinemuskel getestet.

Aus der Abbildung 2 geht die Linearität der Standards hervor.

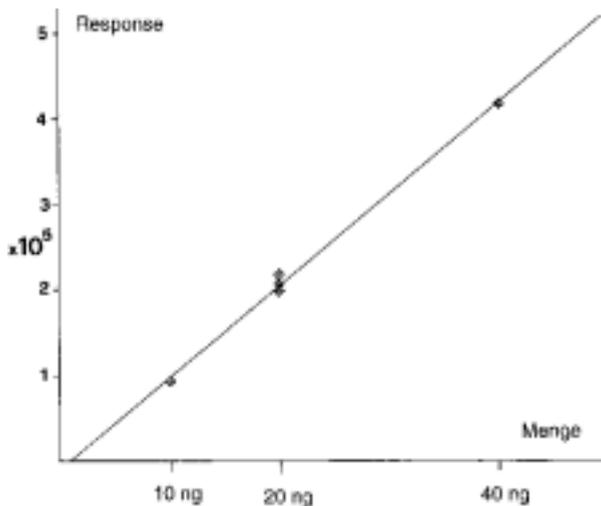


Abbildung 2 Kalibrierkurve von DHS zur Auswertung über externen Standard

Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze/Auswertung

Die probenbezogene Bestimmungsgrenze für DHS in Muskel liegt bei 150 ppb, die analytische Nachweisgrenze bei umgerechnet 50 ppb DHS. Es ist aber möglich, die Bestimmungsgrenze tiefer zu wählen, wenn die Probe in entsprechend weniger

¹ Ein Flow von 0,15 entspricht ca. 0,20 ml/min als Gesamtmenge der Lösungen A und B

mobiler Phase B aufgenommen wird oder mehr als 20 µl injiziert wird. Da die Grenzwerte gem. FIV aber sehr hoch liegen, ist die hier angegebene Bestimmungsgrenze für Kontrollzwecke ausreichend.

Die Auswertung der Resultate erfolgt über externen Standard. Dabei entsprechen 20 µl × 1 ng/µl (Standard II) genau 600 ppb DHS bei 100% Wiederfindung.²

Diskussion

STR und DHS sind Aminoglycoside und wegen ihrer Struktur (Hydroxy-Gruppen, sekundäres Amin und Guanidinogruppen) sehr polar und daher nur in Wasser gut löslich. Die Reinigung und Konzentration von STR und DHS (aus einem Fleischextrakt) in einem organischen Lösungsmittel ist demnach nicht möglich. Es ist schwierig, die positive Ladung von STR und DHS zu neutralisieren. Es mussten mit starken Kationentauscher-Kartuschen bis 25 ml Eluierungslösung eingesetzt werden, um eine gute Recovery zu erhalten (7). Deshalb wurde hier ein «Clean up» entwickelt, bei dem STR und DHS auf einer schwachen Kationentauscher-Kartusche angereichert werden, um anschliessend mit möglichst wenig saurer Methanollösung eluiert zu werden. Dabei werden die negativen Positionen der Kartusche protoniert (pKs = 4,8). Als mögliche Lösung bietet sich die CBA-Kartusche an, die als schwacher Kationentauscher wirkt. STR und DHS werden bei einem pH von 6,9 als positiv geladene Teilchen auf der Kationentauscher-Säule gebunden und bei einem pH < 2,5 eluiert. Dadurch können Wiederfindungen von ca. 80% erreicht werden.

Für die anschliessende Chromatographie auf einer Nucleosil-AB-Säule muss mit Ionenpaarreagenz gearbeitet werden, da sonst die Retentionszeiten viel zu kurz sind.

Aus mehreren möglichen Spezialsäulen und Ionenpaar-Reagenzien wurde folgendes System als leistungsfähigstes bezüglich Trennverhalten ausgewählt:

- Verwendung der Spezial-Säule Nucleosil-AB mit polymermodifiziertem C18 Material.
- d,l-Campher-10-sulfonatpuffer (pH = 2,4 ± 0,3) als mobile Phase.
- Nachsäulenderivatisierung von STR und DHS mit NQS.

Der pH-Wert und das Verhältnis A : B wirken sich sehr stark auf die Retentionszeit aus und müssen daher auf das HPLC-System abgestimmt sein.

Dabei ist festzuhalten, dass STR und DHS nicht basisliniengetreunt werden (Abb. 3). In Anbetracht dessen, dass nur DHS für Tiere registriert ist, spielt dies eine untergeordnete Rolle. Es ist sinnvoll, nur DHS als Standard einzusetzen und mit Hilfe der Methode des externen Standards zu quantifizieren. Positive Proben

² Umrechnung:

100 ppb entsprechen 100 ng DHS pro Gramm Fleisch oder 500 ng DHS pro 5 Gramm Fleisch. Dies entspricht nach der Aufarbeitung von 5 Gramm Fleisch einer gesamten Flüssigkeitsmenge von 3000 µl. Davon werden 20 µl direkt ins HPLC-System eingespritzt.

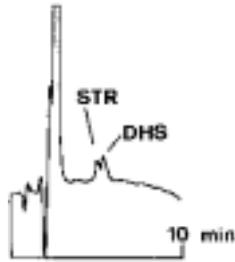


Abbildung 3 Chromatogramm: Muskelfleisch mit DHS und STR. Chromatographische Bedingungen siehe Text

sollten nachträglich mit der Standardadditionsmethode überprüft oder mit LC-MS bestätigt werden (9).

Nach der Auftrennung des Fleischextraktes in einzelne Komponenten auf der analytischen Säule wird der Eluent zur Reaktionspumpe geführt. Von der Reaktionspumpe aus werden die zwei Lösungen A und B über je ein T-Stück zum Eluenten gemischt, wobei der Reaktionsweg der Lösung (A) 27 cm und der Lösung (B) 4 m betragen soll. Der 4 m lange Reaktionsweg wird in einer thermostatisierten Reaktionseinheit (Timberline) bei 60° C erwärmt (ein Wasserbad ist möglicherweise auch genügend). Die Lösungen A und B müssen vor Gebrauch filtriert werden, A ist mittels Eisbad zu kühlen.

Die Lösung A (NQS) derivatisiert vorhandenes STR oder DHS, die Lösung B erhöht den pH auf > 10. Die Reaktion von NQS mit primären und sekundären Aminen ist bekannt, aber auch Kondensationsreaktionen mit Aldehyden/Ketonen sind möglich (1). Die Reaktion von NQS mit der Guanidinogruppe ist schon erwähnt worden (2). Da STR einen intensiveren «Peak» ergibt, kann angenommen werden, dass die Kondensationsreaktion mit der Aldehydfunktion eine wesentliche Rolle spielt.

Es ist speziell zu beachten, dass die angegebenen Parameter der Nachsäulenderivatisation strikte eingehalten werden. Die Chromatogramme zeigen die hohe Selektivität im Fluoreszenzbereich und die saubere Abtrennung von DHS bzw. STR gegenüber der Fleischmatrix (Abb. 4–6). Wichtig ist die Analyse von Standards vor und nach der Messung von Proben. Die Nachweisempfindlichkeit kann wegen der Instabilität von NQS im Laufe von mehreren Stunden abnehmen!

Die Selektivität der Methode wurde durch Injektion einer ganzen Reihe von Tierarzneimitteln überprüft. Es waren keinerlei Interferenzen für folgende Substanzen zu bemerken: Apramycin, Kanamycin, Gentamicin, Neomycin, Amoxicillin, Ampicillin, 13 Sulfonamide, Spectinomycin und Spiramycin.

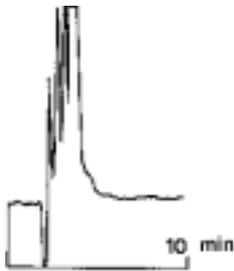


Abbildung 4
Negative Muskel-
probe

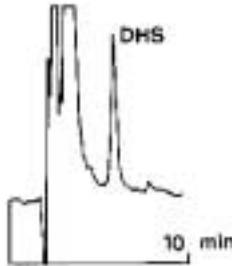


Abbildung 5
Muskelprobe mit
700 ppb DHS dotiert

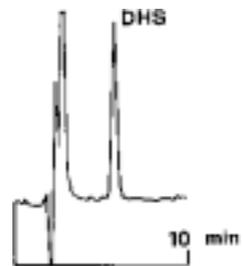


Abbildung 6
Positive Leberprobe;
ca. 720 ppb DHS

Leider konnten Streptomycin B und Streptonicozid³ nicht getestet werden, da diese Substanzen momentan nicht käuflich sind.

Vorläufige Resultate 1999/2000

Im Zeitraum von Oktober 1999–Dezember 1999 wurden 14 Schweinemuskel untersucht. Sämtliche Proben waren negativ.

Im Zeitraum vom Januar 2000–April 2000 wurden 30 Kalbslebern untersucht. Dabei wurden in neun Proben Peaks entdeckt, die sich mit LC-MS nicht als STR oder DHS identifizieren liessen. Weitere Abklärungen dazu sind im Gange. Es wäre denkbar, dass es sich um einen in der Leber bisher nicht bekannten Metaboliten handeln könnte.

Zusammenfassung

Es wird eine Nachsäulenderivatisations-Methode zur quantitativen Bestimmung von Dihydrostreptomycin und Streptomycin in Fleisch, Niere und Leber von Schweinen, Rindern und Kälbern beschrieben. Die Rückstände werden mit Perchlorsäure aus der Matrix extrahiert und an einer schwachen Kationentauscher-Kartusche aufgereinigt. Die Analyse wird mit HPLC an einer polymermodifizierten C-18-Säule und einem Ionenpaarreagenz durchgeführt. DHS und STR werden anschliessend mit NQS nachsäulenderivatisiert und im Fluoreszenzdetektor hochspezifisch detektiert und quantifiziert (Exitation: 260 oder 347 nm, Emission: 435 oder 418 nm).

Die Wiederfindung für DHS im Bereich 500 ppb für Leber beträgt 80%. Die Bestimmungsgrenze beträgt 150 ppb.

³ Für die chemischen Strukturen und Formeln siehe Merck Index 11. Ausgabe, Seite 1391

Résumé

Une méthode de dérivation post-colonne est présentée pour la détermination quantitative des résidus de dihydrostreptomycine et streptomycine dans le muscle, le foie et le rein de porc et de bœufs. Les résidus sont extraits en milieu perchlorique et purifiés sur une cartouche échangeuses de cations. L'analyse est effectuée par HPLC à l'aide d'une chromatographie à paires d'ions et d'une colonne C18 modifiée. Une dérivation post-colonne avec un détecteur à fluorescence permet d'augmenter considérablement la sécurité des résultats (excitation: 260 ou 347 nm, émission: 435 ou 418 nm).

Le taux de récupération pour la dihydrostreptomycine pour une concentration de 500 ppb est de l'ordre de 80%. La limite de détermination est de 150 ppb.

Summary "Fluorescence Detection of Dihydrostreptomycin and Streptomycin in Meat, Liver and Kidney by HPLC and Post-column Derivatization"

A method is presented for the quantitative determination of dihydrostreptomycin (DHS) and streptomycin (STR) in muscle, liver and kidney from swine and beef. Residues are extracted from the matrix with perchloric acid and further clean up was achieved by a solid-phase extraction on a weak cation-exchanger column. DHS is separated from the matrix by reversed-phase HPLC on a C18-polymer modified column. DHS and STR are highly specifically detected and quantified after post-column derivatization and fluorescence detection (excitation: 260 or 347 nm, emission 435 or 418 nm).

The recovery for DHS at 500 ppb is about 80%. The limit of quantification is 150 ppb.

Key words

Dihydrostreptomycin, Streptomycin, Meat, Kidney, Liver, Post-column derivatization, Fluorescence detection

Literatur

- 1 Roth, H., Eger, K. und Troschütz, R.: Pharmazeutische Chemie II, Arzneistoffanalyse, 3. Auflage, Seite 358–362. Thieme-Verlag, Stuttgart 1990.
- 2 Kubo, H., Kobayashi, Y. and Kinoshita, T.: Fluorescence determination of streptomycin in serum by reversed-phase ion-pairing liquid chromatography. *Anal. Chem.* **58**, 2653–2655 (1986).
- 3 McLaughlin, L.G., Henion, J.D. and Kijak, P.J.: Multi-residue confirmation of aminoglycoside antibiotics and bovine kidney by ion spray high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* **23**, 417–429 (1994).
- 4 Shaikh, B. and Allen, E.H.: Overview of physical-chemical methods for determining aminoglycoside antibiotics in tissues and fluids of food-producing animals. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**, 1007–1013 (1985).
Shaikh, B. and Moats, W.A.: Liquid chromatographic analysis of antibacterial drug residues in food products of animal origin. J. Chromatogr. **643**, 369–378 (1993).

- Isoherranen, N. and Soback, S.:* Chromatographic methods for analysis of aminoglycoside antibiotics. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **82**, 1017-1045 (1999).
- 5 *Gerhardt, G.C., Salisbury, C.D.C. and MacNeil, J.D.:* Analysis of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **77**, 765-767 (1994).
- Gerhardt, G.C., Salisbury, C.D.C. and MacNeil, J.D.:* Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in animal tissue by on-line sample enrichment liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **77**, 334-337 (1994).
- 6 *Abbasi, H. and Hellenäs, K.-E.:* Modified determination of dihydrostreptomycin in kidney, muscle and milk by HPLC. *Analyst* **123**, 2725-2727 (1998).
- 7 *Edder, P., Cominoli, A. and Corvi, C.:* Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection. *J. Chromatogr. A*, **830**, 345-351 (1999).
- 8 *Schnappinger, P., Usleber, E., Märtelbauer, E. and Terplan, G.:* Enzyme immunoassay for the detection of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk. *Food and Agric. Immunol.* **5**, 67-73 (1993).
- 9 Methode in Bearbeitung

Korrespondenzadresse: Dr. Dominik Guggisberg, Bundesamt für Veterinärwesen, Sektion Chemie, Schwarzenburgstrasse 161, CH-3003 Bern

Migration of Novolac Glycidyl Ether (NOGE) and its Chlorohydrins into Aqueous Canned Foods

Sandra Brem and Koni Grob, Official Food Control Authority of the Canton of Zurich, Zurich

Received 18 April 2000, accepted 14 July 2000

Introduction

Novolac glycidyl ether (NOGE)

Novolac glycidyl ether (NOGE), also called “epoxy novolac”, is a complex mixture of epoxy compounds used for coatings, such as those of food cans and the lids of glass jars. Novolac is the technical name for the mixtures obtained by reaction of phenol with formaldehyde under acidic conditions (for structures, see (1)). Its smallest molecular weight component is called bisphenol F and exists in three isomers. There are seven isomers with three aromatic rings and 27 4-ring components. Novolac is reacted with epichlorohydrin to result in the glycidyl ether (NOGE).

NOGE as additive in organosols

In Europe, NOGE became a problem after 1996, when it was used to substitute bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) in organosols. BADGE was under pressure since it widely exceeded national legal limits (2) as well as the limit defined by the Council of Europe. NOGE replaced BADGE as an additive for scavenging hydrogen chloride from the PVC in order to increase the thermostability of the coating during curing (3). Added to the coating at the level of several percents and being largely extracted into some foods, NOGE again reached concentrations in the can content which substantially exceeded 1 mg/kg.

NOGE was not approved as an additive because of lacking data on toxicity. In the US, its use is, nevertheless, legal because it was already applied before legislation requiring testing was introduced. In December 1999, the Scientific Committee for

Food (SCF) of the EU expressed the opinion that the evaluation of the safety of using NOGE is not possible on the basis of the data available and that it should, therefore, not be used as an additive. The EU plans to ban the use of NOGE as additive and to set a specific migration limit (SML) for the products still on the market. The limit might be at 1 mg/kg for the NOGE components with at least one epoxy or chlorohydrin function and a molecular weight below 1000 Dalton. Such a limit calls for analytical control methods.

NOGE with a molecular weight up to 1000 D comprises compounds with up to six aromatic rings, existing in large numbers of isomers. Some of the epoxy groups are converted to chlorohydrins by reaction with hydrochloric acid cleaved from PVC during curing of the coating. In foods with a coherent fat or oil phase in contact with the can coating, these components are almost exclusively located in the oil phase, which protects the epoxy function from hydrolysis. In aqueous foods, the epoxy groups are hydrolyzed or react with food components (4).

Subjects of this paper

This paper describes experimentation on the analysis of NOGE in aqueous foods. The epoxy groups are virtually completely hydrolyzed, i.e. the compounds of interest comprise diol and chlorohydrin functions on the glycidyl moiety. As the fully hydrolyzed components are considered to be of no toxicological concern, the analysis is directed on to the chlorohydrins. Another paper (5) will describe the analysis of NOGE in oily foods, where the components of concern are those containing epoxy and/or chlorohydrin functions. Since the analysis of epoxy compounds requires special attention, the analytical approach differs.

The paper first deals with questions about the extent NOGE components migrate into foods, in particular up to which molecular weight (ring number) migration is significant. Transfer of BADGE from organosol coatings into aqueous, sterilized foods ranged from 16 to more than 96 %, averaging around 50 % (referring to acetonitrile extraction of the coating, which is fairly complete for organosols (6)). For its chlorohydrins, migration is higher, with an average of almost 80 % for BADGE.2HCl. This suggested that also higher molecular weight NOGE and particularly the chlorohydrins might be found in aqueous foods.

Another subject concerns approximations by which the control method could be simplified. The total migration could, for instance, be extrapolated from easily determined components, such as BFDGE. However, previous findings were confirmed that in some can coatings NOGE is almost free of BFDGE. In fact, the percentage of BFDGE in NOGE recovered from coatings varied between 0.05 % (7) and some 10 % (20–30 % being the typical concentration in the NOGE added to the organosol). BFDGE seems to evaporate to a variable extent during curing of the coating, which renders the relationship between BFDGE and NOGE unstable and unsuitable for extrapolations. 3-Ring NOGE is present in a more constant proportion of the 3- to 6-ring components.

Simal Gandara et al. (8) were the first to analyze BFDGE, but no method has been described for the analysis of a broader range of NOGE components. Since individual analysis of 2- and 3-ring components in a single separation seemed impossible, size exclusion chromatography (SEC) was used for pre-separation (9), followed by reversed phase liquid chromatography (RPLC) with fluorescence detection (FD) as introduced by *Paseiro Losada et al.* (10).

Methods

Preparation of hydrolyzed 2- and 3-ring chlorohydrins as reference materials

200 mg (in 2 ml dichloromethane/hexane 1:1) of a commercial NOGE (Araldit EPN 1179, Ciba, Basel, CH) was fractionated preparatively using a 16 mm i.d. column packed with 20 g of silica gel Merck 60, 70–230 mesh (Darmstadt, Germany). The first 85 ml of hexane/dichloromethane/propanol 87/10/3 were discarded. The following 10 ml contained the bulk of the BFDGE. The following 30 ml of the same eluent were discarded. Then the 3-ring NOGE was eluted with 25 ml of hexane/dichloromethane/propanol 77/20/3.

The 2- and 3-ring fractions were converted into mixed diols/chlorohydrins: to 0.5 mg of the material dissolved in 1.5 ml of dioxane, 4 ml of 0.2% hydrochloric acid was added. The mixture was heated to 120°C in a pressure cooker for 1 h and then neutralized using 10% sodium hydroxide solution.

Opening of the can

To facilitate the extraction of emptied cans with acetonitrile, lids of filled cans were opened less than half. Three-piece cans with a side stripe over the seam (fig. 1) were opened such that the stripe was outside the opened section, but in reach to get a probe for a Beilstein test. The cans were emptied, rinsed with water containing some detergent, dried at 100°C in an oven and laid on their side. They were filled with acetonitrile to a known proportion of the internal volume, often to 50%, such

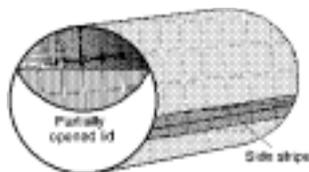


Figure 1 Opening of cans in order to enable extraction of the coating

that the solvent was in contact with half of the surfaces of all parts. Extraction was performed for 24 h at 25°C. 10 µl of the extract was injected into RPLC.

For the Beilstein test, a small amount of coating was brought onto a copper wire which was introduced into the tip region of a blue flame. Strong green color was considered as an indication of organically bonded chlorine and organosol ("Beilstein-positive").

Analysis of foods

Foods were analyzed as proposed by *Bas* and *Rijk* (11). The liquid phase was discarded when consumers were assumed to do so (e.g. water from sweet corn). The can content was homogenized by a Polytron blender (Kinematica, Luzern, Switzerland). 4 g of the homogenate (containing 2 g of food) was mixed with 10 ml of acetonitrile, centrifuged, and the liquid phase decanted. The solids were extracted a second time with 10 ml of acetonitrile. The combined liquid phases were defatted by extraction into some 5 ml of pentane and evaporated to dryness after addition of 2 ml of 1-propanol (azeotropic evaporation of water).

Size exclusion chromatography

SEC-FD was performed on a 30 cm × 7.8 mm i.d. Phenomenex (St. Torrance, CA, USA) Phenogel 5 µm, 500 A column, using tetrahydrofuran (THF)/2% methanol at 400 µl/min as mobile phase (Phoenix SFC syringe pump, Fisons/ThermoQuest, Milan, Italy; Merck F1050 fluorescence detector). FD was performed at 225 (ex)/295 (em) nm. A manual 6-port injection valve (Valco) was used with a 100 µl loop.

Retention windows of the fractions including the hydrolyzed 2- and 3-ring NOGE as well as their chlorohydrins were determined by injection of the reacted 2- and 3-ring fractions obtained as described above. The residue of the evaporated acetonitrile extract from foods was picked up in 400 µl of THF, of which 100 µl were injected. Fractions were collected at the outlet of the detector, brought to dryness, and re-dissolved in 200 µl of acetonitrile. 800 µl of water was added and 500 µl injected into RPLC-FD.

Reversed Phase HPLC (RPLC)

A 25 cm × 4.6 mm i.d. column packed with Spherisorb ODS-2, 5 µm (Grom, Herrenberg, Germany) was used with a gradient of water (A), methanol (B), and ethanol (C) at a flow rate of 750 µl/min: 0–5 min: 65% B; 5–32 min, 65–90% B; 32–42 min, 90% B, 42–43 min 0–100% C; 43–47 min, 100% C; 47–49 min, back to initial. Injection volume, 500 µl. Fluorescence was detected at 225/295 nm.

Results

Figure 2 shows an RPLC-FD chromatogram of a mixture of 2- and 3-ring NOGE converted to diols and chlorohydrins. As components are not sufficiently

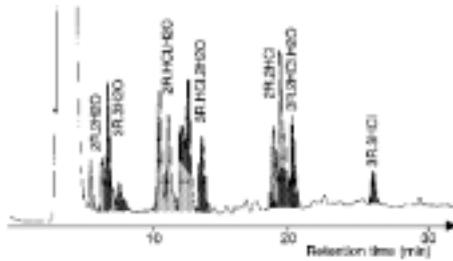


Figure 2 RPLC-FD of 2- and 3-ring NOGE after conversion of the epoxy groups to diols and chlorohydrins. Abbreviations: number of aromatic rings (2R or 3R) followed by the reactants (.H2O or .HCl)

well resolved to enable a separate determination of 2- and 3-ring components, pre-separation by SEC was introduced.

Preseparation by SEC

SEC well separated the 2- to 4-ring NOGE, i.e. the epoxy compounds (fig. 3, bottom). Reaction of the epoxy groups of BFDGE with HCl or water shortened the retention time by more than a phenyl glycidyl moiety, whereby the 2R.2HCl and

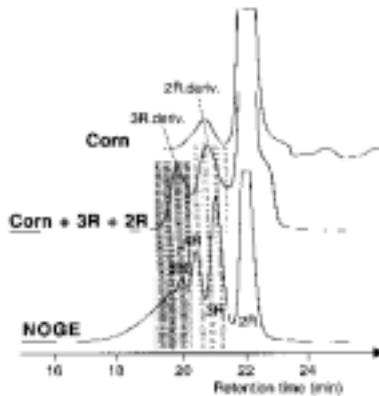


Figure 3 SEC-FD of a commercial NOGE (Araldit EPN 1179) as well as of an extract of sweet corn with and without admixture of 2- and 3-ring NOGE reacted with HCl and water. The fractions analyzed by RPLC are shaded

the 2R.2H₂O had a similar retention time (the chlorohydrins being eluted slightly later). This strong shift in retention time upon a small change in molecular weight/size is not obvious. The mobile phase (acetonitrile, dichloromethane, methanol, THF, or mixtures thereof) influenced the relative retention times, but did not result in a fundamental change.

The top chromatogram shows an extract from sweet corn packed in a pouch, i.e. free of the compounds of interest. The two signals are from unidentified endogenous material. The center chromatogram shows the same extract after addition of 2- and 3-ring NOGE reacted with HCl and water (mixture shown in fig. 2). The reacted 2-ring NOGE coeluted with 3- and 4-ring epoxy compounds, the reacted 3-ring NOGE with 5- to 7-ring NOGE. The fractions collected for RPLC are shaded.

Preseparation by SEC was tested with the reacted 2- and 3-ring standards (diols and chlorohydrins) shown in figure 2. The chromatograms at the left in figure 4 show the standards before mixing. They were combined, picked up in THF/2% methanol, chromatographed through the SEC system and brought back to the initial volume before being injected into RPLC-FD. Fraction 1, the window from 18 to 19 min, did not contain material of interest. Fraction 2 (19–20.25 min) comprised the 3-ring components with the worst recovery exceeding 85% for the 3R.3H₂O. Fraction 3 (20.25–21.75 min) contained the 2-ring components, again with a maximum loss for the 2R.2H₂O (less than 20%). Fraction 4 (21.75–22.75 min) merely contained unidentified by-products. This experiment,

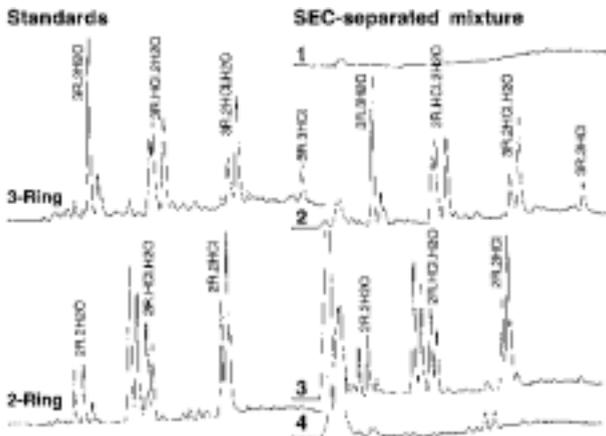


Figure 4 Standards of reacted 2- and 3-ring NOGE (left) and the same products after being combined and re-separated by SEC (fractions 1–4)

performed three times, confirmed that preparative SEC was sufficiently quantitative for the application.

Sweet corn

Figure 5 shows RPLC-FD chromatograms from sweet corn packed in a deep-drawn 2-piece can (USA, bought 1998). The coating of the cup was Beilstein-positive, while the conventional lid was negative. The bottom chromatogram resulted from the acetonitrile extract of the emptied can. There were little hydrolyzed material (eluted in the early part of the chromatogram), 2-ring NOGE (BFDGE), and 2-ring chlorohydrins. In fact, the 2-ring components were almost completely extracted into the food (see below). The broad peaks of the 3- to 6-ring components contain the many isomers with epoxy and chlorohydrin functions, the epoxy compounds being eluted in the early part of the signals. It is concluded that epoxy groups have retention characteristics similar to the chloro hydroxy groups. The large amounts of 3- to 6-ring components recovered from the used can suggests that little had migrated into the food.

The corn contained 1.8 mg/kg of 2-ring components (top chromatogram, fraction 3 from SEC). Some 60% of the functions were reacted with chloride primarily from degraded PVC, while the remaining epoxy groups were hydrolyzed. The chromatogram of the 3-ring compounds is four times less attenuated and represents a total of 110 µg/kg in the corn. The mixed 3R.HCl.2H₂O and 3R.2HCl.H₂O predominate. No traces of 4-ring components were detected in this or the previous SEC fraction (less than 20 µg/kg).

Tuna in water

The tuna in water (Thailand, bought 1998), shown in figure 6, was in a 2-piece can with a conventional lid, the cup being coated by a Beilstein-positive lacquer. The fish contained some fat, even though hardly any forming a coherent phase in contact with the can surface to enable a direct transition from the coating to the oil and protecting the epoxy groups from hydrolysis.

The acetonitrile extract of the emptied can contained an amount of NOGE which corresponded to 25 mg/l can volume. The broad signals of the 3- and 4-ring NOGE suggest a high conversion of the epoxides to chlorohydrins (5). The upper chromatograms show fractions from SEC covering the whole range of retention times some NOGE components could be eluted.

Fraction 1 could have comprised derivatized 5- or 6-ring NOGE, but nothing alike is visible in the chromatogram. Fraction 2 contained a small amount of non-hydrolyzed 4-ring NOGE with an undefined, but high number of chlorohydrin functions (4R.xHCl). The larger part of this material, with a lower number of chloro hydroxy groups, was found in fraction 3. The unreacted 4-ring NOGE (exclusively epoxy groups) would have been eluted in fraction 4, but is not observed. The material eluted earlier in fraction 2 (with a retention time similar to

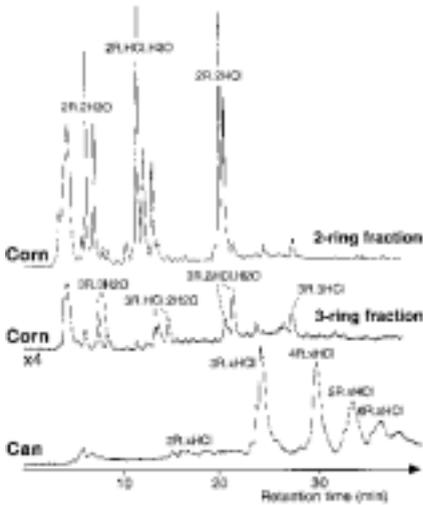


Figure 5 RPLC-FD chromatograms from sweet corn (top and center, the latter being four times less attenuated) and an acetonitrile extract of the emptied, deep-drawn can (bottom). The peaks of the can extract comprise components with a number of chlorohydrin functions equal to zero up to the number of rings ("x")

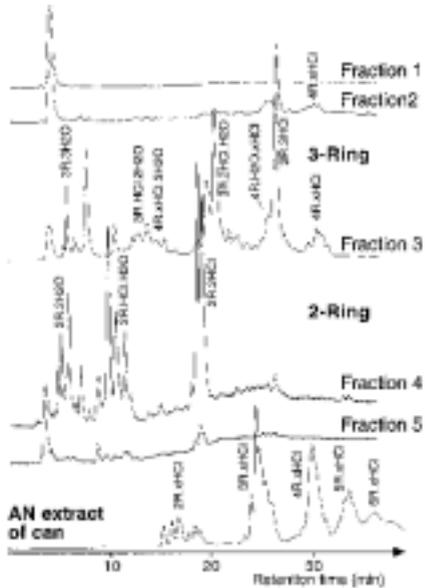


Figure 6 Tuna in water with fully hydrolyzed 2- and 3-ring NOGE and its chlorohydrins, as well as partially hydrolyzed 4-ring compounds. Bottom, acetonitrile extract of the emptied can

3R.3HCl) was probably mono-hydrolyzed 4R.xHCl (3R.3HCl was eluted near the end of fraction 3, slightly reaching into fraction 4).

Fraction 3 contained 1.4 mg/kg of 3-ring components with a high proportion of HCl derivatives (small 3R.3H₂O versus a large 3R.3HCl). It also contained 4-ring components at a roughly estimated concentration of 600 µg/kg. They probably contained an epoxy group (as they would have been in fraction 2 otherwise). 4R.xHCl.2H₂O was co-eluted with 3R.2HCl.H₂O.

Fraction 4 predominantly contained HCl-reacted 2-ring components at a concentration of 2.3 mg/kg. It comprised as little 3-ring components with epoxy func-

tions as fraction 5 contained epoxy 2-ring structures. The small signals in fraction 5 belong to 2R.HCl.H₂O and 2R.2HCl, but the composition is different and suggests some unusual isomers (abnormal substitution?).

Apart from some signals in the early part, all relevant peaks in the chromatograms belonged to NOGE derivatives from the can coating; there was hardly any interference by the tuna. Hence, summing up all areas of the peaks eluted after 3R.3H₂O provided a good estimate of the chlorohydrins present in the food. It must, however, be considered that the total concentration exceeded 4 mg/kg. At a ten times lower migration, distinction from endogenous components would become difficult. Furthermore, the lid did not release relevant amounts of material, which may also complicate the analysis if its coating is different.

Salmon in water

Figure 7 reports RPLC-FD chromatograms from canned salmon in water with a fairly high fat content in the fish (Canada, bought in 2000). Both parts of the deep-drawn two-piece can with easy open lid were Beilstein-positive. The acetonitrile extract of the emptied can shows little 2-ring NOGE, but 3- to 6-ring NOGE and chlorohydrins corresponding to 15 mg/l can volume. Adding the 2-ring components transferred to the can content, there were 0.8 mg/l of 2-ring components in the original can coating. Compared to 5 mg/l of 3-ring compounds and taking into

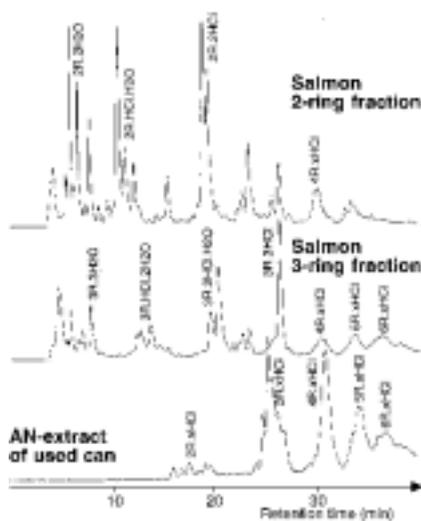


Figure 7 RPLC-FD chromatograms from canned salmon in water

account that commercial NOGE typically contains clearly more BFDGE than 3-ring NOGE, over 90 % of the BFDGE must have evaporated during curing of the coating.

The 2-ring fraction from SEC contained 300 µg/kg of virtually completely hydrolyzed 2-ring components (no epoxy compounds detected, as confirmed by normal phase LC-FD). Hence there was not enough fish oil to protect the epoxy groups. Some 75% of the original epoxy groups were converted to chlorohydrins (strong predominance of 2R.2HCl over 2R.2H₂O). The peak following 2R.2H₂O probably represents BADGE.2H₂O. In the rear of the chromatogram, there are unidentified peaks, perhaps representing partially or non-hydrolyzed 3- and 4-ring components (the epoxy groups being responsible for a relatively late elution from SEC).

The sum of the 3-ring components was 140 µg/kg and again shows a high degree of reaction with chloride. In addition, the 3-ring fraction contained higher molecular weight epoxy and chlorohydroxy derivatives. As already observed for the tuna sample, the higher molecular weight compounds seem not to be hydrolyzed, presumably because of low solubility in water.

The fish contained enough oil to extract some higher molecular weight NOGE (in contrast to sweet corn). The oil protected the poorly soluble NOGE components from hydrolysis, but not the 2- and 3-ring constituents. Hence salmon in water should be considered border line between aqueous and oily foods.

Extent of the migration

Table 1 summarizes data from 9 products in cans with Beilstein-positive coatings, for three of which some chromatograms have been shown above. The amounts of 2- to 6-ring NOGE extracted with acetonitrile from the emptied can corresponded to a concentration related to the can volume between 8.3 and 44 mg/l

Table 1
NOGE components in acetonitrile extracts from the emptied can (µl/l) and foods (µg/kg), as well as percentages of migrated material

Product	Can size	Extract emptied can				Food			% Migration	
		2-ring	3-ring	4-ring	Sum 2-6	2-ring	3-ring	4-ring	2-ring	3-ring
Sweet corn 1	340 g	700	6000	5500	18000	1000	120		59	2
Sweet corn 2	340 g	1800	18000	12000	44000	1800	110		50	0.6
Sweet corn 3	340 g	200	3700	3100	8300	3010	180		94	5
Tuna in water 1	200 g	4100	10000	12000	16000	1530			27	<1
Tuna in water 2	200 g	1800	8600	6000	25000	2300	1400	750	56	14
Tuna in water 3	200 g	1800	5900	4800	20000	510	100		22	2
Tuna in water 4	195 g	3100	5500	7500	25000	1250	230		30	4
Asparagus	460 g	<10	<10	<10	<50	550	35		>95	>80
Salmon	200 g	500	5000	4000	15000	300	140		38	3

(extracts from organosols are fairly complete). The canned asparagus was an exception since merely the side stripe of this 3-piece can contained NOGE.

From the three cans from the same producer of sweet corn and of apparently identical make, acetonitrile extracted between 8.3 and 44 mg/l of NOGE or 2.7–15 mg per can, suggesting that migration may vary strongly within different samples of the same product. The surface coated by an organosol (cup) comprised 2.5 dm² and the NOGE migration 1–5.7 mg/dm².

The amount of NOGE material transferred to the can content was between 3 and 6% for corn and salmon, but reached 18% for tuna 2. This low migration results from low transfer of high molecular weight components: migration averaged about 50% for the 2-ring components, dropped into the range of a few percents for the 3-ring derivatives, and was negligible for higher molecular weight components. Tuna 2 is an exception, because it contained enough fat to enhance migration. The other exception concerned the canned asparagus: migration of the low molecular weight NOGE must have been almost complete.

Conclusions

Only 2- and 3-ring NOGE migrate

In aqueous foods, no NOGE components with epoxy groups are to be expected. The migration of chlorohydrins seems to be restricted to 2- and 3-ring components. Components with 4–6 rings, often with preserved epoxy groups, are only found in foods containing a few percents of fat at least (such as fish in water).

Disregarding the somewhat oily tuna 2 and salmon, the concentrations of 3-ring components in the aqueous foods never exceeded 12% of those of the BFDGE derivatives. This might suggest that the analysis of the 2-ring compounds alone provides a sufficient approximation for the total relevant migration. However, this conclusion results from the fact that among the samples analyzed there happened to be none with a coating containing NOGE virtually free of BFDGE (BFDGE being evaporated during curing of the coating, as has been encountered fairly frequently other times). Hence no stable ratio of 2-ring to 3-ring components can be expected because the proportion of evaporated BFDGE varies widely.

It remains that the migration of 3-ring chlorohydrins into aqueous foods tends to be low. Only in the somewhat fatty tuna it exceeded 1 mg/kg. However, in an unfortunate situation, where a 5% transfer (sweet corn 3) is combined with a large amount of 3-ring chlorohydrins in the coating (sweet corn 2), the migration could reach as much as 900 µg/kg.

Analytical procedure

The procedure shown in figure 8 is designed to focus on the critical products.

1. The can is partially opened and emptied as described in the experimental part.



Figure 8 Screening aqueous foods on relevant NOGE components, assuming an SML of 1 mg/kg for the chlorohydrins <1000 D

2. All parts, including the side stripe (3-piece cans) are checked for organosols using the Beilstein test. If the result is negative, the coatings are likely to consist of polyesters or epoxies and the analysis is ended. When epoxy coatings release BADGE, it is present as BADGE.2H₂O which is considered un toxic.
3. Cans with Beilstein-positive parts are extracted with acetonitrile. 1 h at 25° C is sufficient to determine the presence of BADGE or NOGE. If both are absent, the analysis is again stopped, but the question arises by what other material the organosol was stabilized.
4. If the extract shows the presence of BADGE, the three chlorohydrins are analyzed, e.g. according to (12).
5. If NOGE is detected, the can content is extracted with acetonitrile, followed by RPLC-FD.
6. All peaks eluted after 3R.3H₂O are summed up (all chlorohydrins are eluted later) and quantitated through an external standard, such as BFDGE or BADGE. If this concentration corresponds to less than 1 mg/kg, the analysis is ended.
7. If it exceeds 1 mg/kg, the peaks are identified by co-chromatography, eliminating those which are not belonging to NOGE chlorohydrins. Work is ended as soon as a sufficient amount of interfering material, such as from the food or an epoxy coating from another part of the can, has been identified to reduce the sum below 1 mg/kg.
8. If the identified NOGE material exceeds 1 mg/kg, peak identity must be confirmed. Often the peak pattern is sufficiently characteristic (qualitative and

water. This is why the extraction is performed twice: in the first step, the water concentration is too high.

2. *Defatting with pentane* (or another hydrocarbon). Again, the epoxy compounds are most critical. They remain in the acetonitrile provided the water content does not exceed 20 % (5).
3. *Solvent evaporation* is a critical step since epoxy groups easily react with food components (they are no longer protected by an oil or fat phase), resulting in losses of corresponding NOGE components. This is why epoxy compounds, present in oily foods, are analyzed by a modified procedure (5).
4. *Preseparation by SEC*. This step was checked by the experiment reported above.
5. *RPLC-FD*. As far as not checked by the above experiment, the main problems concern recognition of the peaks and of possible interference.

The accuracy of the results is largely determined by the last step and the composition of the sample. With careful peak identification it is assumed that at a 1 mg/kg level the results will be reliable at $\pm 25\%$. When NOGE migrants are present at concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ only, interfering material often render the analysis extremely difficult. For routine analysis, a limit for quantitating NOGE chlorohydrins should be assumed to be around 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Summary

Migration of NOGE derivatives into aqueous samples (such as sweet corn) was investigated and a method devised for a control directed to an SML of 1 mg/kg for the NOGE chlorohydrins < 1000 Dalton, as it might be imposed by the EU (epoxy compounds are hydrolyzed in aqueous foods). Size exclusion chromatography (SEC) was used for the preseparation primarily into a 2- and a 3-ring fraction. The main analysis involved reversed phase liquid chromatography with fluorescence detection. A procedure is proposed for efficient screening of samples.

Even in foods fairly free of fat, the migration of the 2-ring NOGE components easily exceeds 50%. Only few percents of the 3-ring components are transferred, but considering their often large concentration in the coating, this may still correspond to several hundreds of $\mu\text{g}/\text{kg}$ in the food. The transfer of 4-ring components is negligible unless the sample contains some fat or oil (such as tuna in water).

Zusammenfassung

Die Migration von NOGE-Derivaten in wässrige Lebensmittel (z.B. Süßmais) wurde untersucht und eine Methode für die Kontrolle von Lebensmitteln entwickelt im Hinblick auf eine mögliche Einführung einer EU-Limite von 1 mg/kg für NOGE-Chlorhydrine < 1000 Dalton (in wässrigen Produkten werden Epoxyverbindungen hydrolysiert). Size Exclusion-Chromatographie (SEC) diente der Vortrennung vor allem in eine 2- und eine 3-Ring-Fraktion. Die Hauptanalyse erfolgte mittels Reversed phase-Flüssigchromatographie und Fluoreszenzdetektion. Ein Analysenverfahren für ein schnelles Screening von Proben wird vorgeschlagen.

Auch in ziemlich fettfreien Lebensmitteln überschreitet die Migration von 2-Ring-NOGE-Komponenten oft 50%. Andererseits werden nur wenige Prozente der 3-Ring-Verbindungen übertragen. Da aber deren Gehalte in den Lacken oft hoch sind, muss im Lebensmittel trotzdem mit Konzentrationen von einigen 100 µg/kg gerechnet werden. Der Transfer von 4-Ring-Verbindungen ist vernachlässigbar, ausser die Probe enthält etwas Fett oder Öl (z.B. Thunfisch in Wasser).

Résumé

La migration des dérivés du NOGE dans des aliments aqueux a été étudiée et une méthode développée pour le contrôle des produits en vue d'une introductions possible d'une limite de 1 mg/kg pour les chlorhydrines de NOGE < 1000 Dalton par la CE (dans les aliments aqueux, les composées epoxy sont hydrolysées). La size exclusion chromatography (SEC) était utilisée pour préséparer surtout les composées de deux ou trois anneaux. L'analyse principale était fait par chromatographie liquide en phase inverse et avec détection fluorimétrique.

Même pour les aliments sans graisse, la migration des composées de NOGE de deux anneaux souvent exige 50%. Celle des chlorhydrines à trois anneaux reste sur peu de pourcents, mais comme le teneur dans les vernis est souvent haut, les concentrations dans l'aliments peuvent quandmême arriver à plusieurs 100 µg/kg. Le transfer des composées a quatres anneaux est négligeable sauf l'échantillon contient un peu de graisse ou huile (comme le thon dans l'eau).

Key words

Canned foods, Organosol coatings, Migration of novolac glycidyl ether (NOGE), Preseparation by size exclusion chromatography (SEC)

References

- 1 Wagner, Ch., Grob, K. and Biedermann, M.: Migration of novolac glycidyl ether (NOGE) into foods: analytical problems. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **91**, 146–157 (2000).
- 2 Biedermann, M., Grob, K., Bronz, M., Curcio, R., Huber, M. and Lopez-Fabal, F.: BADGE in edible-oil-containing canned foods: determination by LC-LC-fluorescence detection. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **87**, 547–558 (1996).
- 3 Biedermann, M., Wagner, Ch., Grob, K., Imhof, D. and Beuggert, H.: Bisphenol-A-diglycidyl ether (BADGE) and novolac glycidyl ether (NOGE) as additives in can coatings. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **91**, 274–286 (2000).
- 4 Richard, N., Biedermann, M. and Grob, K.: Reaction of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) from can coatings with food components. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **90** (1999) 532–545.
- 5 Brem, S. and Grob, K.: Migration of novolac glycidyl ether (NOGE) and its chlorohydrins into oily canned foods. (submitted to *Food Addit. Contam.*)
- 6 Biedermann, M., Bronz, M., Bürchler, B., Grob, K., Keller, F., Neukom, H.-P., Richard N. and Spinner Ch.: Reaction products of bisphenol-A-diglycidyl ether (BADGE) and bisphenol-F-diglycidyl ether (BFDGE) with hydrochloric acid and water in canned foods with aqueous matrix. 2. results from a survey of the Swiss market. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **90**, 177–194 (1999).

- 7 Biedermann, M. and Grob, K.: Food contamination from epoxy resins and organosols used as can coatings; analysis by gradient NPLC. *Food Addit. Contam.* **15**, 609–618 (1998).
- 8 Simal Gandara, J., Paz Abuin, S., Lopez Mahia, P., Paseiro Losada, P. and Simal Lozano, J.: Identification of RP-HPLC peaks of bisphenol F and of bisphenol F diglycidyl ether and its hydrolysis products by thermospray MS and GC-MS. *Chromatographia* **34**, 67–72 (1992).
- 9 Bronz, M., Biedermann, M. and Grob, K.: Characterization of migrates from can coatings by size exclusion chromatography; total amounts of phenolics with molecular weight below 1000 D. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **89**, 327–338 (1998).
- 10 Paseiro Losada, P., Paz Abuin, S., Vazquez Oderiz, L., Simal Lozano, J. and Simal Gandara, J.: Quality control of cured epoxy resins. Determination of residual free monomers (m-xylylenediamine and BADGE) in the finished products. *J. Chromatogr.* **585**, 75–81 (1991).
- 11 Bas, R.C. and Rijk, R.: TNO Voeding, NL, draft method provided to EU on Jan. 21, 2000.
- 12 Biedermann, M., Bronz, M., Bürchler, B., Grob, K., Keller, F., Neukom, H.-P., Richard, N. and Spinner, Ch.: Reaction products of BADGE and bisphenol-F-diglycidyl ether (BFDGE) with hydrochloric acid and water in canned foods with aqueous matrix. 1. Analytical methods. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **90**, 177–194 (1999).
- 13 Roubtsova, S., Hollaender, J. and Franz, R.: A rapid and convenient method for the quantitative determination of BADGE in foodstuffs. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **93**, 273–276 (1997).
- 14 Berger, U. and Oehme, M.: Identification of derivatives of BADGE and NOGE in can coatings by HPLC/ion trap MS. *J. AOAC* (submitted).

Corresponding author: Koni Grob, Official Food Control Authority of the Canton of Zurich, P.O. Box, CH-8030 Zurich

Migration from the Internal Coatings of Food Cans and the Lids of Glass Jars: Campaign 2000 on the Swiss Market

Sandra Brem, Maurus Biedermann, Koni Grob and Christoph Spinner, Official Food Control Authority of the Canton of Zurich, Zurich

Vincent Dudler, Swiss Federal Office of Public Health, Berne

Received 6 June 2000, accepted 29 June 2000

Introduction

During January to March 2000, 101 critical samples of canned foods were collected in the region of Zürich, which can be considered representative for the Swiss market. This campaign served for control, but also to provide a picture of the cans presently sold in Switzerland. In the last few years, the internal coatings of food cans have undergone fast changes. To contrast them with the past, published data on previous campaigns is summarized, all of which refers to cans produced in early 1998 or before.

Previous campaigns in Switzerland

In the early 1996, high concentrations of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) were found in many canned oily foods, primarily sea food in oil or sauces. Referring to the oil phase, 10 of 142 samples contained BADGE in excess of 10 mg/kg, another 22 between 1 and 10 mg/kg (1). Recalculated for the whole can content, BADGE concentrations exceeded 10 mg/kg in two samples and ranged between 1 and 10 mg/kg in 21 products (15%). The first part of this campaign took place before legal measures were taken (confiscation), while in the second, the worst cans had already been withdrawn from the shelves. As nearly all these products were imported, it is assumed that the results were representative for the European market at that time.

In the winter 1996/1997, the situation had improved drastically as a result of strict control by the Swiss trade: among 242 samples of oily or fatty products, a single one contained more than 1 mg/kg of BADGE (1.7 mg/kg plus 0.37 mg/kg of the

chlorohydrin BADGE.HCl) (2). Three samples contained more than 1 mg/kg of bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and its monochlorohydrin (BFDGE.HCl). When 3- and 4-ring novolac glycidyl ether (NOGE) was included, seven samples exceeded 1 mg/kg, reaching up to 3.3 mg/kg. In July 1997, none of 30 samples selected as most critical contained more than 35 µg/kg of BADGE. One of them contained 110 µg/kg of BFDGE. However, screening by the importers and distributors through BFDGE missed detecting that six of these samples contained more than 1 mg/kg of 3- to 5-ring components of novolac glycidyl ether (NOGE), with a maximum of 14.4 mg/kg in a canned tuna (about 20 mg/kg with the 6-ring NOGE and the chlorohydrins). The BFDGE content was extremely low (7 µg/kg in the sample with the maximum concentration of NOGE), which indicates that NOGE cannot be reliably detected using BFDGE as an indicator.

In summer 1998, 270 samples of canned aqueous foods were analyzed (3). No BADGE or NOGE with epoxy functions were found and, hence, the survey focused on the chlorohydrins. 11 samples (4%) exceeded legal restrictions. Four contained more than 1 mg/kg of BADGE chlorohydrins (maximum of 8.6 mg/kg), while the other seven contained NOGE. BFDGE chlorohydrins were determined at concentrations between 0.34 and 2.9 mg/kg. Nine of the 11 contested samples concerned sweet corn and asparagus.

Previous campaigns in other countries

Summerfield et al. (4) analyzed samples bought between 1995 and 1997 from the British market. BADGE concentrations exceeded 1 mg/kg in seven of 15 samples of anchovies in oil (4 of which even exceeded 10 mg/kg) and five from 22 samples of sardines in oil. All of the 20 samples of tuna contained less than 20 µg/kg of BADGE, but were probably more than two years old. Considering that BADGE concentrations decrease by a factor 10–20 per year, this is little indicative about the BADGE content at the time most of these products were consumed.

In 1997–1999, *Uematsu et al.* analyzed cans from the Japanese market. In a first survey (5), BADGE (without the chlorohydrins) was found in 11 from 16 samples of canned fish. In four products, its concentration exceeded 1 mg/kg and reached 12.9 mg/kg in a tuna in oil. In 1998 (6), 26 products were analyzed. BADGE concentrations were always below 1 mg/kg, but the sum of BADGE, its dimer and trimer reached 15 mg/kg. Four samples contained NOGE, with a maximum for the sum of the 2- and 3-ring components of 6.9 mg/kg.

Simoneau et al. (7) reported results on BADGE from 382 samples of canned fish in oil from all EU member states and Switzerland, bought in 1997, and estimated the exposure to be below 9 µg per person and day. In merely 3% of the products, mostly anchovies, BADGE exceeded 1 mg/kg (8) and reached up to 11.8 mg/kg. This was a substantial improvement compared to the Swiss and the British results from 1996. In 1999, *Theobald et al.* (9) published data showing that no sample of canned milk products contained BADGE in excess of 1 mg/kg.

Rauter *et al.* (10) determined BADGE and its hydrolysis products in 67 samples from the Austrian market. 16% of these exceeded the 1 mg/kg limit (without including the chlorohydrins). The date of sample collection was not indicated, but could have been winter 1997/1998.

Legal restrictions on BADGE and NOGE

According to EU toxicological assessments and legislation, the sum of BADGE, its monohydrolysis product (BADGE.H₂O), and its chlorohydrins (BADGE.HCl, BADGE.2HCl, and BADGE.H₂O.HCl) should not exceed 1 mg/kg in the can content. In Switzerland, there is an additional limit for BADGE of “not detectable at a limit of 20 µg/kg”. The use of NOGE has not been authorized in any European country and is considered illegal in Switzerland. In a letter to the EU authorities dated 8 February 2000, the Joint Industry Group (JIG), representing the producers of resins, additives, lacquers, coated cans, and canned foods, made the commitment to phase out the use of NOGE as additive to organosol coatings in Europe. In the EU, the use of NOGE as additive will probably be banned. These restrictions largely determined the tasks of our analyses.

Analytical strategy

The analysis was focussed on critical samples by taking into account results from previous investigations (1,4).

1. In foods without a coherent fat or oil phase, coating-related epoxy compounds are hydrolyzed and only chlorohydrins are of concern.
2. Relevant migration of NOGE is only expected from organosol (PVC) coatings (including side stripes).
3. BADGE- or NOGE-related chlorohydrins in concentrations exceeding 200 µg/kg are only found in cans with organosol coatings. Thus, among the cans with aqueous foods, only those with organosols need to be controlled.

Derived from this experience, the following analytical strategy was applied (fig. 1).

1. Cans containing aqueous foods were emptied and the coatings of all parts checked on the presence of organically bonded chlorine, applying the Beilstein test.
2. Aqueous foods in Beilstein-negative cans (epoxy or polyester coatings) were not further analyzed, since the concentrations of the chlorohydrins in the foodstuff can be assumed to be below 200 µg/kg and epoxy compounds hydrolyzed. In a few selected samples (white epoxy/anhydride lacquers), BADGE.2H₂O was determined.
3. Cans with Beilstein-positive coatings were extracted with acetonitrile. If BADGE, NOGE, or related chlorohydrins were detected in the lacquer, the can content was homogenized and analyzed for chlorohydrins. Otherwise the analysis was stopped.

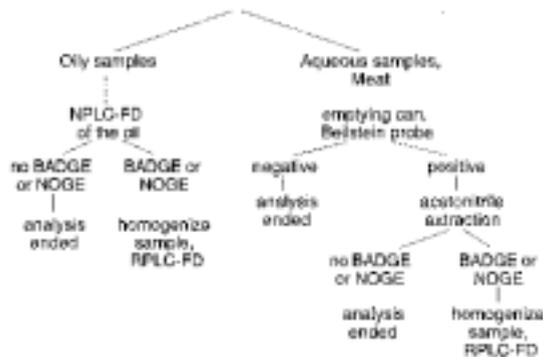


Figure 1 Scheme of the analytical procedure

4. For oily foods, the oil was analyzed by normal phase HPLC (NPLC) in order to determine BADGE, NOGE and reaction products thereof, including reaction products of BADGE with phenols (chain stoppers) and hydroxylic solvents. In case of positive findings, the can content was homogenized, extracted, and analyzed.

Analyses were performed by reversed phase HPLC (RPLC) and fluorescence detection (FD), NPLC-FD, or GC-MS, sometimes involving size exclusion chromatography (SEC) for fractionating food extracts. These methods were described in the literature (11-13).

Samples

The selection of the products to be analyzed focussed on the can types and foods considered most critical based on the results of previous campaigns. Hence, only few cans with fruits, tomatoes or vegetables in aqueous media were analyzed, but many with sweet corn and asparagus. Oily or fatty foods (such as fish in oil, meat, soups, or sauces), cans with easy open end, and 2-piece cans were selected preferentially. Since about half of all the canned products sold in Switzerland are tomatoes, vegetables, and fruits, and also numerous other products were disregarded, at best a third of the assortment was sampled (table 1).

Table 1
Samples analyzed within the campaign

Total of cans analyzed	101
products in water	72
products in oil	29
Products in glass jars	5

Samples were from all major food distributors in the Canton of Zurich except small speciality shops. Products imported in small numbers, often from exotic countries, were not included into the survey. Samples were taken in a number approximately corresponding to the importance of the distributor.

Results

Results are summarized in table 2. The second column characterizes the cans by the number of pieces (3-piece cans consisting of a side wall and two ends, 2-piece cans of a deep-drawn cup and a lid) and the color of the internal coating. The three columns under the heading of "Beilstein test" indicate the presence or absence of organically bonded chlorine in the coatings of the cup or side wall, the lid (and bottom end for 3-piece cans), and the side stripe (welded side walls). The concentrations in the can contents listed under summed BADGE refer to the components included in the 1 mg/kg EU-limit. BADGE.2H₂O is listed separately. The column "NOGE <1000 D" lists summed concentrations of NOGE epoxy and chlorohydrin components up to 1000 D (including 6-ring compounds). Under "can extracts by acetonitrile", concentrations referring to the total can volume are reported. When RPLC-FD or NPLC-FD did not show a significant peak, the chromatogram is characterized by "empty". The glass jars nr. 107–110 were collected in summer 1999, and the values given under NOGE merely refer to the 2-ring components.

Side stripes

69 of the 101 cans consisted of 3-pieces with welded bodies and usually a side stripe on the seam. 16 side stripes were Beilstein-positive, seven of them contained BADGE, 2 NOGE, and seven contained neither BADGE nor NOGE.

Calculated on the can volume, acetonitrile extracted 250 and 400 µg/l of NOGE and its chlorohydrins (MW <1000 Dalton) from cans nrs. 14 and 71. No NOGE was detectable in the foods at a detection limit of 50 µg/kg. The seven BADGE-containing side stripes released between 125 and 10,000 µg/l of the epoxy compounds and chlorohydrins into acetonitrile and up to 410 µg/kg of hydrolyzed chlorohydrins into the food (sweet corn, sample nr. 82).

Apparently side stripes may contain widely varying amounts of BADGE and NOGE. Migration of the chlorohydrins into aqueous foods did not reach 1 mg/kg. However, it would exceed 1 mg/kg for the chlorohydrins plus the epoxides if these cans had been filled by an oily food. Assuming that 50% of BADGE or NOGE are extracted into the food (extreme values are beyond 80%), migration would have exceeded 1 mg/kg in 2 out of 7 cans analyzed.

Two-piece cans

32 samples consisted of deep-drawn 2-piece cans. Merely eight of them had a Beilstein-positive coating in the cup. Six of these eight samples released neither BADGE nor NOGE. On the other hand, both samples with BADGE in the

Table 2

Samples analyzed and results. Can type, 2- or 3-piece cans; ea, easy open lid; g, gold lacquer; w, white; m, opaque.

Net, labelled net weight. Origin, country of origin

Nr.	Can type cup	Can type lid	Net (g)	Origin	Product	Bellstein test			Migration (µg/kg)		Can extract acetone/nitrite
						Cup	Lid	Stripe	Sum	BADGE ₂ H ₂ O	
1	2 g	ea g	27	E	Anchovies in oil	+	-	-	< 5	< 10	
2	2 g	ea g	50	E	Anchovies in oil	+	+	-	< 5	< 10	
3	2 g	ea g	50	E	Anchovies in oil	-	-	-	< 5	< 10	
4	2 g	ea g		E	Anchovies in oil	+	-	-	< 5	< 10	
5	3 m	g	390	E	Artichokes	-	-	-			
6	3 gm	gm	215	RSA	Asparagus	-	-	-			
7	3 gr	gr	280	China	Asparagus	-	-	+			
8	3 gm	gm	290	RSA	Asparagus	-	-	-			empty
9	3 g	g	280	China	Asparagus	-	-	+			NOGE?
10	3 g	g	280	China	Asparagus	-	-	+			empty
11	3 g	g	425	USA	Asparagus	-	-	-			
12	3 g	g	400	D	Baby corn	-	-	-			
13	3 g	g	230	Thailand	Bamboo shoots	-	-	-			
14	3 g	g	400	F	Beans	-	-	+			NOGE: 400 µg/l
15	3 w	w	425	CH	Beans	-	-	-	480	< 100	
16	3 gm	gm	420	E	Beans	-	-	-			
17	3 w	g	800	F	Beans	-	-	-			
18	3 m	m	450	USA	Beans	-	-	+	270	310	BADGE: 0.6 mg/l
19	3 w	w	550	D	Cabbage	-	-	-			
20	3 g	g	340	GB	Corned beef	-	-	-			
21	3 mg	mg	340	Brazil	Corned beef	-	-	-			
22	2 gm	ea gm	190	D	Fish in sauce	+	+	-	< 5	< 10	
23	3 w	w	430	CH	Fruits	-	-	-			
24	3 w	ea w	310	CH	Meat	-	-	-			
25	3 w	w	195	CH	Meat loaf	-	-	-			
26	3 w	ea g	140	I	Meat loaf	-	-	-			
27	2 g	g	120	CH	Meat loaf	-	+	-		1000	NOGE: 5 mg/l

Nr.	Can type	Net (g)	Origin	Product	Beilstein test		Migration (µg/kg)		Can extract acetone/trile
					Cup	Lid	Sum	BADGE .2H2O	
28	3 g	190	China	Mushrooms	-	+			empty
29	3 w	200	FL	Mushrooms	-	-			
30	3 m	400	PL	Mushrooms	-	-			
31	3 w	200	D	Mushrooms	-	-			
32	3 g	184	China	Mushrooms	-	+			empty
33	3 g	184	PL	Mushrooms	-	-			
34	3 w	200	PL	Mushrooms	-	-			
35	3 g	184	China	Mushrooms	-	-			
36	3 g	184	China	Mushrooms	-	+			empty
37	3 g	184	China	Mushrooms	-	-			
38	3 w	200	D	Mushrooms	-	-			
39	2 m	140	E	Octopus in sauce	-	-	< 20		< 20
40	2 g	115	GR	Octopus in sauce	+	+	4200		< 5
41	2 g	160	GR	Octopus in sauce	+	+	< 5		< 10
42	2 g	115	E	Octopus in sauce	+	+	< 5		< 10
43	3 g	180	GR	Octopus in sauce	-	-			
44	3 w	360	E	Octopus in water	-	+	340		BADGE: 1.2 mg/l
45	3 w	425	CH	Olives	-	-		470	
46	3 w	425	FL	Peas	-	-		320	
47	3 g	400	CH	Peas	-	-			
48	3 w	800	F	Peas	-	-			
49	2 w	400	F	Peas	-	+			empty
50	3 w	1000	F	Peas	-	-			
51	3 g	400	F	Peas	-	-			empty
52	3 w	850	CH	Ravioli	-	+			
53	3 w	240	CH	Salade	-	-		450	
54	3 g	80	D	Salmon	-	-			
55	2 w	125	E	Sardines in oil	-	-	< 5		< 10
56	2 w	120	E	Sardines in oil	-	-	< 5		< 10
57	2 w	56	E	Sardines in oil	-	-	< 5		< 5
58	2 w	125	Marocco	Sardines in oil	-	-	< 5		< 5

Nr.	Can type	Net (g)	Origin	Product	Bellstein test		Migration (µg/kg)		Can extract
					Cup	Lid	Sum	BADGE	
59	2 m	ea g	Marocco	Sardines in oil	-	+	< 5	< 10	Can extract
60	2 g	ea g	E	Sardines in oil	-	-	< 5	< 10	acetone/trile
61	3 g	g	CH	Sauce	-	-			
62	3 gm	290	Thailand	Sea food	-	-			
63	3 gg	400	D	Soup	-	-			
64	3 w	380	D	Soup	-	-			
65	3 w	420	FL	Soup	-	-			
66	3 w	400	D	Soup	-	-			
67	3 m	400	A	Soup	-	-			
68	3 w	400	A	Soup	-	+	< 20	< 20	empty
69	3 g	170	GR	Squids in sauce	-	-	< 10	5600	NOGE: 58 mg/l
70	3 g	440	Turkey	Stuffed peppers	-	+	< 10	< 100	NOGE: 250 µl/l
71	3 g	300	F	Sweet corn	-	-			
72	2 w	340	F	Sweet corn	-	-			
73	3 gm	340	USA	Sweet corn	-	-			
74	2 w	300	F	Sweet corn	-	+		75	empty
75	3 gm	340	USA	Sweet corn	-	-		130	BADGE: 500 µl/l
76	3 g	340	USA	Sweet corn	-	+			BADGE: 125 µl/l
77	3 g	340	USA	Sweet corn	-	-			
78	3 g	340	USA	Sweet corn	-	-			
79	2 g	340	USA	Sweet corn	-	+	380	250	BADGE: 10 mg/l
80	3 g	340	USA	Sweet corn	+	-	3600	370	BADGE: 5.7 mg/l
81	3 g	340	USA	Sweet corn	-	-	250	210	BADGE: 1.8 mg/l
82	3 g	340	USA	Sweet corn	-	-	230	180	BADGE: 1.8 mg/l
83	3 m	400	I	Sweet corn	-	-	410	240	BADGE: 6 mg/l
84	3 w	400	I	Tomatoes	-	-			
85	2 m	100	Thai	Tomatoes	-	-	< 20	< 10	< 10
86	2 gr	92	Philippines	Tuna in oil	-	-	< 5	< 10	< 10
87	2 m	100	Thailand	Tuna in oil	-	+	< 5	< 10	< 10
88	2 m	200	Thailand	Tuna in oil	-	-	< 5	< 20	< 20
89	2 m	200	Thailand	Tuna in oil	-	-	< 5	< 5	Epoxy

Nr.	Can type cup	Can type lid	Net (g)	Origin	Product	Beilstein test		Migration (µg/kg)		Can extract acetone/trile
						Cup	Lid	Stripe	BADGE Sum	
90	2 gm	g	170	F	Tuna in oil	-	-	< 5	< 5	
91	3 g	ea g	160	I	Tuna in oil	-	-			
92	2 m	m	185	Thailand	Tuna in oil	-	-	< 5	< 20	
93	3 w	ea g	120	E	Tuna in oil	-	-	< 5	< 10	
95	2 g	ea g	160	P	Tuna in oil	-	+	< 20	10	
96	2 w	ea w	115	E	Tuna in oil	-	-	< 5	20	
97	2 m	ea m	200	Thailand	Tuna in oil	-	-	< 5	10	
98	2 m	m	100	Thailand	Tuna in oil	-	-			
99	3 w	ea g	160	I	Tuna in water	-	-			
100	2 m	m	200	Thailand	Tuna in water	-	-			
101	3 g	ea g	280	G.R	Vegetables in oil	-	-	≤ 150	< 20	
102	Glass jar		340	I	Dried tomatoes		+		< 50	NOGE
103	Glass jar		280	I	Artichokes		+		< 50	NOGE
104	Glass jar		280	I	Peppers		+		220	NOGE
105	Glass jar		190	I	Pesto		+		< 100	NOGE
106	Glass jar		280	I	Dried tomatoes		+		< 50	NOGE
107	Glass jar*			I	Artichokes		+	65	42	NOGE
108	Glass jar**			I	Artichokes		+	10	20	NOGE
109	Glass jar*			I	Dried tomatoes		+	20	30	NOGE
110	Glass jar**			I	Mushrooms		+	5	75	NOGE

organosol contaminated the content with BADGE and its reaction products at a level exceeding 1 mg/kg, confirming that BADGE- and NOGE-stabilized organosol coatings are still a high risk.

Sample nr. 40 in table 2 contained octopus in an oily tomato sauce, and the migration reached 2.4 mg/kg for BADGE, 0.4 mg/kg for BADGE.HCl, and 1.4 mg/kg for BADGE.2HCl. Also the lid was coated with a BADGE-stabilized organosol. Sample nr. 79 contained sweet corn; 1 mg/kg of BADGE.HCl.H₂O and 2.6 mg/kg of BADGE.2HCl were detected. From the emptied can, acetonitrile extracted another 5.7 mg/l of non-hydrolyzed stabilizer, indicating that a third of the BADGE components were extracted by the aqueous food (from organosols, acetonitrile extraction is quite complete).

Easy open lids

35 cans carried an easy open lid, only 14 of which had a Beilstein-positive coating. In 10 of the PVC-containing lacquers, neither BADGE nor NOGE was detected. Of the four samples with BADGE- or NOGE-stabilized organosols, two clearly exceeded the 1 mg/kg limit and a third was at the limit.

Sample 27 contained meat loaf (meat cheese). The product was contaminated with about 1 mg/kg of largely hydrolyzed NOGE derivatives (insufficiently coherent fat phase). Acetonitrile extracted an amount of NOGE and its chlorohydrins from the lid corresponding to another 5 mg/l referring to the can content, reflecting relatively weak extraction by the food, perhaps owing to limited contact with the fat phase.

Sample nr. 70 consisted of stuffed peppers with some 15% of edible oil and was contaminated by 5.6 mg/kg of NOGE and its chlorohydrins. Acetonitrile extracted another 5.8 mg/l of these components, i.e. the food extracted about half of the NOGE originally present in the coating.

Results regarding migration

From the analytical results listed in Table 2, the following conclusions can be drawn regarding the canned foods.

1. Four products violated Swiss regulations: stuffed peppers, sweet corn, meat loaf and octopus (see above). Three products contained more than 1 mg/kg of BADGE, NOGE, and their chlorohydrins, the fourth about 1 mg/kg of NOGE. All four were products sold in rather small quantities, three of them through minor food distributors.
2. Two additional products contained NOGE in the side stripe, but no NOGE components were detected in the foods.
3. There was no further product exceeding the Swiss 20 µg/kg limit specifically for BADGE.
4. No product contained the restricted BADGE components at a concentration between 500 and 1000 µg/kg, and only six of those analyzed in the range between

- 100 and 500 µg/kg. For the products not further analyzed after a negative screening result, it can be assumed that concentrations were below 200 µg/kg.
5. The concentrations of BADGE.2H₂O in aqueous foods packed in the frequently used 3-piece cans with a white epoxy-anhydride coating ranged between 200 and 500 µg/kg and did not significantly decrease since 1998 (4). Only a small proportion originated from BADGE or its hydrolysis products in the coating. Most BADGE.2H₂O is the hydrolysis product of a still unknown material.
 6. None of the oily products contained more than 100 µg/kg of BADGE mono-reaction products, i.e. derivatives with one epoxy group and the other being reacted with a phenol or a solvent (14). However, there were rather few oily products in cans with epoxy coatings.

Products in glass jars

The internal coatings of twist-off caps for glass jars usually consist of organosols stabilized with NOGE. Previous investigations indicated that the transfer into the foods is mostly below the detection limit (varying between 10–100 µg/kg, depending on interfering food components).

Nine (four from 1999) of the most critical products were analyzed, namely vegetables in oil. All lids contained NOGE. One of the packed foods contained 220 µg/kg of NOGE and its chlorohydrins <1000 Dalton, which was the highest result obtained so far (from some 30 samples analyzed in different surveys). In the other eight products, NOGE concentrations were below 100 µg/kg.

Key points

- The results of the survey may be summarized by the following points.
1. Only four out of the 101 canned products analyzed violated Swiss regulations. Assuming that the two thirds of non-controlled (non-critical) cans really met the requirements, this represents less than 1.5% of the canned products. This is a strong improvement compared to the previous campaigns.
 2. Two of the four products violated the European 1 mg/kg limit for BADGE and its derivatives. The EU regulation for NOGE is in preparation. National regulations in the EU member states vary.
 3. Over 90% of all products contained less than 200 µg/kg of BADGE, NOGE and their chlorohydrins, i.e. those exceeding the restrictions were exceptions, rather than the tip of an iceberg.
 4. Focussing on the critical products, the analysis of some 100 samples achieved a fairly complete control of the market.
 5. Initially the improvement on the Swiss market was principally achieved through screening of the products. In the mean time, industry has improved their coating systems. It would be of high interest to obtain analogous results from other European markets in order to compare the importance of the two actions.

6. It seems that the manufacturing of 2-piece cans and easy open lids does not necessarily require the use of organosol coatings: 56% of the easy open lids and 75% of the deep-drawn cans did not contain PVC.
7. BADGE or NOGE were detected in only six of 22 organosol coatings. This indicates that industry moves away from BADGE and NOGE as stabilizers for organosols. The substitutes are still unknown. It remains to hope that the replacements were selected after careful evaluation of safety.
8. Migration from the lid into products in glass jars is lower than that into canned products. The European coating industry has decided to phase out the use of NOGE also for lids of glass jars.

Summary

101 samples of the most critical canned products and nine samples in glass jars with twist-off lids were checked for the BADGE and NOGE components with epoxy and/or chlorohydroxy functions. Only four of them violated Swiss regulations, two because of the corresponding BADGE components exceeding the 1 mg/kg limit (3.6 and 4.2 mg/kg) and two because of the presence of NOGE (1 and 5.6 mg/kg). These products were clear exceptions (no other canned product was nearly as seriously contaminated) and represented a minor share of the market. Only few cans had an organosol coating, and most organosols were stabilized neither with BADGE nor NOGE.

Zusammenfassung

101 Proben der aus früheren Untersuchungen als kritisch eingestuften Dosenkonserven und neun Produkte in Gläsern mit Twist-off Deckeln wurden auf BADGE- und NOGE-Komponenten mit einer Epoxy- und/oder Chlorhydroxy-Funktion analysiert. Nur vier davon verstießen gegen die Schweizer Regelungen: Zwei Produkte enthielten mehr als 1 mg/kg der entsprechenden BADGE-Komponenten (3,6 und 4,2 mg/kg) und zwei das unerlaubte NOGE (1 und 5,6 mg/kg). Es handelte sich um klare Ausnahmen (keine andere Probe war auch nur annähernd ähnlich stark belastet) und um Produkte mit geringem Volumen auf dem Markt. Nur wenige Dosen enthielten einen Organosolinnenlack, und nur wenige Organosole waren mit BADGE oder NOGE stabilisiert.

Résumé

Les composés du BADGE et du NOGE contenant des groupes époxy et/ou chlorohydroxy ont été analysés dans 101 échantillons de conserves en boîtes considérées comme critiques dans des études précédentes et dans neuf échantillons de pots en verre munis d'un couvercle de type "twist-off". Seulement quatre de ces échantillons ne respectaient pas les exigences suisses: deux contenaient plus de 1 mg/kg de composés du BADGE (3,6 et 4,2 mg/kg) et deux autres du NOGE, substance non autorisée (1 et 5,6 mg/kg). Il s'agit clairement d'exceptions, tant par le

niveau de la contamination (élevé comparativement aux autres échantillons) que par la part de marché anecdotique des produits en question. Une petite partie seulement des boîtes possédaient un vernis organosol et peu de ces derniers étaient stabilisés avec du NOGE ou du BADGE.

Key words

Canned foods, Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), Novolac glycidyl ether (NOGE), Organosol coatings, Food survey

References

- 1 Biedermann, M., Grob, K., Bronz, M., Curcio, R., Huber, M. and Lopez-Fabal, F.: BADGE in edible-oil-containing canned foods: determination by LC-LC-fluorescence detection. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **87**, 547–558 (1996).
- 2 Biedermann, M., Bronz, M., Grob, K., Gfeller, H. and Schmid, J.P.: BADGE and its accompanying compounds in canned oily foods: further results. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **88**, 277–292 (1997).
- 3 Biedermann, M., Bronz, M., Bürchler, B., Grob, K., Keller, F., Neukom, H.-P., Richard, N. and Spinner, Ch.: Reaction products of BADGE and BFDGE with hydrochloric acid and water in canned foods with aqueous matrix. 2. Results from a survey of the Swiss market. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **90**, 177–194 (1999).
- 4 Summerfield, W., Goodson, A. and Cooper, I.: Survey of BADGE in canned foods. *Food Addit. Contam.* **15**, 818–830 (1998).
- 5 Uematsu, Y., Hirokadu, M., Hirata, K., Ito, K. and Suzuki, S.: Analysis of BADGE in edible-oil-containing canned fish with LC/LC fluorescence detector. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **39**, 135–142 (1998).
- 6 Uematsu, Y., Hirata, K., Iida, K. and Saito, K.: BADGE and related compounds in fish products packed in cans and multilayer laminated film packages from the Japanese market. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **41**, 23–29 (2000).
- 7 Simoneau, C., Theobald, A., Wiltshko, D. and Anklam, A.: Estimation of intake of BADGE from canned fish consumption in Europe and migration survey. *Food Addit. Contam.* **16**, (1999) 457–463.
- 8 Simoneau, C., Theobald, A., Hannaert, P., Roncari, P., Roncari, A., Rudolph, T. and Anklam, E.: Monitoring of BADGE in canned fish in oil. *Food Addit. Contam.* **16**, 189–195 (1999).
- 9 Theobald, A., Simoneau, C., Roncari, P., Roncari, A. and Anklam, E.: Monitoring BADGE in canned milk products and vegetable oils. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **95**, 362–365 (1999).
- 10 Rauter, W., Dickinger, G., Zihlarz, R. and Lintschinger, J.: Determination of BADGE and its hydrolysis products in canned oily foods from the Austrian market. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **208**, 208–211 (1999).
- 11 Biedermann, M. and Grob, K.: Food contamination from epoxy resins and organosols used as can coatings; analysis by gradient NPLC. *Food Addit. Contam.* **15**, 609–618 (1998).
- 12 Biedermann, M., Bronz, M., Bürchler, B., Grob, K., Keller, F., Neukom, H.-P., Richard, N. and Spinner, Ch.: Reaction products of BADGE and BFDGE with hydrochloric acid and water in canned foods with aqueous matrix: 1. Analytical methods. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **90**, 195–210 (1999).
- 13 Brem, S. and Grob, K.: Migration of novolac glycidyl ether (NOGE) and its chlorohydrins into aqueous canned foods. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **91**, 551–566 (2000).

- 14 *Biedermann, M., Grob, K., Böhler, P. and Widmer, H.R.: Identification of migrants from coatings of food cans and tubes: reaction products of BADGE with phenols and solvents. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 89, 529–547 (1998).*

Corresponding author: Koni Grob, Official Food Control Authority of the Canton of Zurich, P.O. Box, CH-8030 Zurich

Determination of some Ionic Additives in Meat Products by Ion Chromatography

Anton Kaufmann, Bruno Pacciarelli, Sven Roth and Bianca Ryser, Official Food Control Authority of the Canton of Zurich, Zurich

Received 15 March 1999, accepted 14 July 2000

Introduction

Meat products like sausages, cold cuts etc. are made of meat, connective tissues, and fat. Additives like salt, nitrate and nitrite are used to suppress the growth of harmful micro-organisms as well as to achieve pleasant sensorial properties. Furthermore, different condensed phosphates are used because of technological reasons. Polyphosphates like di- and tri-phosphate improve certain rheological properties and increase the water binding ability. Most countries have set up regulations concerning the maximum amount of the stated additives.

There are several analytical approaches to measure *nitrite* and *nitrate* in meat products: The coupling of nitrite with sulfanilamide and N-1-naphthylethylenediamine to a reddish-purple azo dye is successfully used for spectroscopic determinations (1). Nitrate ions can be reduced to nitrite by metallic cadmium (2) or nitrate reductase (3) to make them accessible for the coupling reaction. There are also purely enzymatic methods which reduce nitrite to ammonia by nitrite reductase. The resulting NADH/NAD⁺ ratio is measured photospectrometrically (4). Several separation techniques utilise the ionic character of nitrite and nitrate: Ion-interaction HPLC (ion-pair chromatography) can be used to determine nitrite and nitrate in one run (5, 6). The detection is based on UV or UV and electrochemical signals. Encouraging results were reported by the use of capillary ion electrophoresis (7). Ion chromatography (IC) has been used by several authors (8–10).

There are very few reports concerning the determination of *polyphosphates* in meat products. Thin layer chromatography (TLC) was the only reported technique (11, 12). However, this method is neither quantitative nor does it provide the required sensitivity. The most commonly used P-number (P₂O₅) is of limited value, because it is a composite value combining the different inorganic phosphates and

phospholipides as well. HPLC or IC methods were reported for polyphosphates in the detergent and chemical industry (13–15). Flame photometry (13) or dual post column derivatization (14), as well as suppressor based conductivity detection (15, 16) were reported.

Chloride is commonly determined by argentometric titration. Meat products are homogenised, acidified and titrated with silver nitrate (17).

The ever increasing demand to analyse more parameters and more samples with less manpower has created a considerable interest to determine several parameters in one analytical run. This demand has been partially met by the use of continuous flow auto-analysers (2).

It is the aim of this work to present a fast, simple and affordable IC method for the quantification of all the relevant anions in meat and sea food products.

Method

Instruments and columns

IC was performed with a stainless steel LC: quaternary pump HP1100 (Agilent Technology) GINA, UV-detector UVD 170S and column oven STH 585 (all GynkoteK). The IC 753 suppressor module and IC 732 IC detector (both Metrohm) served as electrolytic conductivity detector. As analytical columns Metrosep Anion Dual 1 (3,0×150 mm) with precolumn Anion Dual 1 (3,0×35 mm) and a Hypercarb (4.6×10 mm, 5 µm) post column were used (all Metrohm, Herisau). For sample preparation a Polytron PT 3000 (Kinematica, Littau) mixer and a centrifuge Sorvall RC 5C (Kendro Laboratry, Zurich) were employed.

Chemicals, materials

Sulphuric acid 98% p.a, tetra-sodium pyrophosphate decahydrate, penta sodium triphosphory (all Fluka). Di-sodium hydrogen phosphate dodecahydrate, sodium hydrogencarbonate, sodium carbonate (waterfree), sodium chloride, nitrate standard (1 g/l), nitrit standard (1 g/l) (all Merck, Darmstadt). Bidest. water. Micro filter: Chromafil PES-20/25.

Alkaline phosphatase from calf intestine mucous membrane (Fluka).

Solutions standards

Mobile phase A:	water
Mobile phase B:	50 mmol sodium hydrogencarbonate and 50 mmol sodium carbonate/l water
Suppressor regenerent:	sulfuric acid 80 mmol/l
Extraction solution:	60 ml mobile phase B/l water

Standard stock solutions

Chlorid and phosphate:	3 g NaCl; 2.019 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$; 0.314 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$; 0.173 g $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ dissolved in 100 ml bidest water
Nitrite	nitrite standard 1 g/l
Nitrate	nitrate standard 1 g/l

Working standard solution

Working standard A:	10 ml of chlorid and phosphate stock solution, 1 ml of nitrite and 2 ml of nitrate stock solution is added into a 100 ml graduated flask and filled with water to volume. One liter contains: 3000 mg NaCl 400 mg P_2O_5 (as NaH_2PO_4) 100 mg P_2O_5 (as $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) 100 mg P_2O_5 (as $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) 10 mg NO_2 20 mg NO_3
Working standard B:	50 ml working standard A, filled with water to 100 ml
Working standard C:	25 ml working standard A, filled with water to 100 ml
Working standard D:	10 ml working standard A, filled with water to 100 ml
Working standard E:	5 ml working standard A, filled with water to 100 ml

Procedure

- Weigh 5.00 g sample into a plastic centrifugation vessel.
- If desired spiking solutions might be added: 5 ml chloride and phosphate, 0.5 ml nitrite and 0.2 ml nitrate stock solution.
- Add 150 ml extraction-solution.
- Close the screw cover of the vessel and put it immediately into a boiling water bath for 10 minutes.
- Use the polytron to homogenise the still hot sample solution.
- Put the closed vessel again into the boiling waterbath for 10 min.
- Let the vessel cool in an ice bath for 1 hour.
- Centrifuge at 14 500 rotations per minute (equivalent of 15 000 g) for 5 minutes.
- Filtrate the supernant liquid (below the fat film) through a microfilter directly into a HPLC vial.

All fermented sausage samples or sea products should be quickly processed because of the present enzymatic activities.

HPLC conditions

Flow: 0.5 ml/min

Gradient: 0 min: 6% B; 5 min: 6% B; 14 min: 20% B; 20 min: 100% B; 20.9 min: 100% B; 21 min: 6% B; 29 min: 6% B

UV detector: 215 nm (nitrite and nitrate)
Conductivity: chloride, mono-, di- and triphosphate
Suppressor switch time: 0.2 min
Injection volume: 10 µl

Positive results can be confirmed by adding a drop of phosphatase solution to the final HPLC vial and by incubating it for one hour at 30° C. di- and triphosphate peaks disappear selectively after this treatment.

Calibration

Chromatograms can be more easily integrated if a blank (extraction solution) is electronically subtracted. Peak areas are used for quantification. A nonlinear quadratic calibration (cubic, if available) should be applied. If spiking solutions are added, resulting dilutions have to be considered in the calculation.

Validation

Meat products present a number of different matrixes, hence the validation did not focus on a single type of meat product. Hence, the described method was validated thrice. Two important Swiss meat products and fish were chosen (a cooked sausage "Servelat", a fermented sausage "Landjäger" and a plaice fillet). The samples were repeatedly spiked with different volumes of stock solutions (see procedure). The highest spike represented a fortification of 60 g NaCl, 8 g PO₄³⁻ (calculated as P₂O₅), 2 g P₂O₇⁴⁻ (calculated as P₂O₅), 2 g P₃O₁₀⁵⁻ (calculated as P₂O₅), 0.2 g NO₂¹⁻ and 0.5 g NO₃¹⁻ to 1 kg matrix sample. The linearity was tested by reducing the volumes of added stock solutions. Five different spiking levels were produced. In terms of chloride, this represents fortifications of 60 g; 30 g; 12 g; 6 g; 3 g; 0 g NaCl/1 kg calibration matrix. Three repetitions (independent sample processing and analysing) were performed for each matrix and each level, resulting in a total of 54 HPLC injections.

Linear regression

Figure 1 represents the calibration curves (peak areas of the various analytes versus spike concentration). Table 1 shows the statistical data (spiked concentrations explained by calculated concentrations $y = a + b * x$). The squared coefficient of correlation "r²" was always higher than 0.994. The intercept of the linear regression "a" is in many cases clearly above zero. This can be explained by the presence of analyte in the unspiked matrix (e.g. NaCl). There are instances where the slope of the calibration curve "b" lies outside 1 ± the confidence limit. This can be best understood by the non-linear character of the calibration curve, as discussed later. Hence the quadratic calibration function used by the HPLC integration system is not anymore sufficient to describe the uppermost part of the calibration curve. This is clearly visible when comparing the slope for chloride produced by spiking the different matrixes. The slope "b" measured in fish is close to one. On the other hand, a sig-

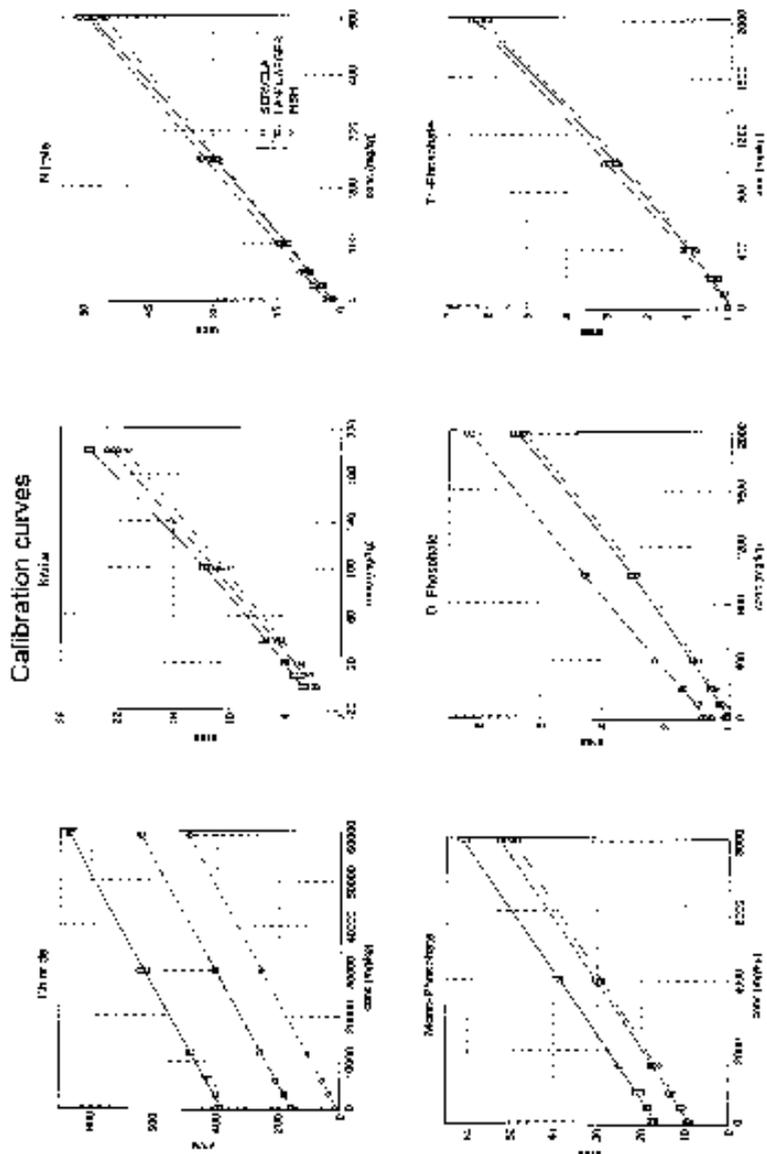


Figure 1 Calibration curves for all analytes in the three matrices (peak area versus spike concentration)

Table 1

Linear regression (spike concentration predicted by the measured concentrations. Each of the three matrices was spiked with five levels. For each spike level three independent extractions and analysis were performed

Validation		Matrix		
Analyt	Parameter	Servela	Landjäger	Fish
NaCl	r ²	0.99969	0.99792	0.99946
	a	+16980 ±180	+44020 ±747	+2110 ±2110
	b	+0.940 ±0.0041	+0.92 ±0.0104	+1.012 ±0.0097
	Spike min.	3000	3000	3000
	Spike max.	60000	60000	60000
PO ₄ (P ₂ O ₅)	r ²	0.99926	0.99913	0.99585
	a	+2150 ±37	+3600 ±50	+2500 ±91
	b	+0.931 ±0.0063	+0.928 ±0.0069	+1.062 ±0.0171
	Spike min.	400	400	400
	Spike max.	8000	8000	8000
P ₂ O ₇ (P ₂ O ₅)	r ²	0.99893	0.9986	0.9984
	a	+98 ±8.2	-30 ±8.5	-32 ±9.1
	b	+0.94 ±0.0077	+1.02 ±0.0095	+1.063 ±0.011
	Spike min.	100	100	100
	Spike max.	2000	2000	2000
P ₃ O ₁₀ (P ₂ O ₅)	r ²	0.9948	0.9966	0.9957
	a	-48 ±16	-63 ±13	-58 ±15
	b	+0.963 ±0.017	+0.969 ±0.0142	+0.969 ±0.016
	Spike min.	100	100	100
	Spike max.	2000	2000	2000
NO ₂	r ²	0.99636	0.99914	0.9975
	a	+1.5 ±1.4	+13.2 ±0.8	+4.3 ±1.2
	b	+0.933 ±0.0141	+1.011 ±0.0074	+1.029 ±0.013
	Spike min.	10	10	10
	Spike max.	200	200	200
NO ₃	r ²	0.99787	0.99946	0.9994
	a	+25.7 ±2.9	+15.5 ±1.4	+15.1 ±1.5
	b	+0.967 ±0.0113	+0.963 ±0.0056	+1.017 ±0.0061
	Spike min.	25	25	25
	Spike max.	500	500	500

nificant deviation from 1 was observed when spiking the Landjäger. The high concentration of chloride in unspiked Landjäger (see intercept “a”) adds to the spiking concentration. Hence, the strongest spike produced a sample which contained almost 11% of sodium chloride! Such very large concentration ranges should be processed rather by a cubic than the used quadratic calibration function.

Limits of detection

Nitrite: 2.5 mg/kg, nitrate 2 mg/kg, di- and triphosphate: 20 mg/kg each. Figure 2 shows a chromatogram (conductivity signal) of a “Landjäger” spiked with

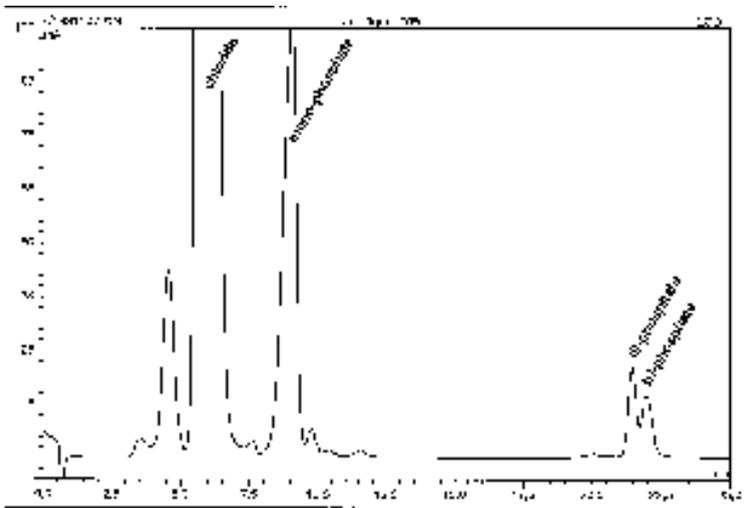


Figure 2 Chromatogram of a fermented sausage "Landjäger" spiked according to the method. (Conductivity signal)

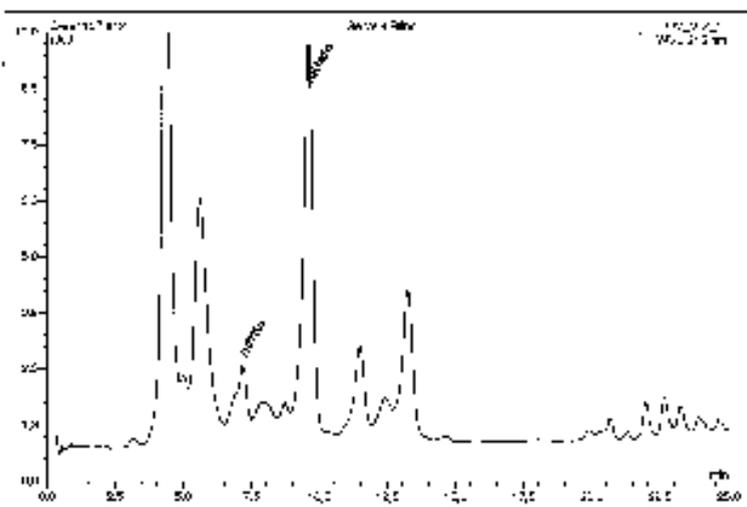


Figure 3 Chromatogram of a cooked sausage "Servela" unspiked (UV signal)

stock solution. Figure 3 shows a chromatogram (UV signal) of a "Servela" without spike.

Comparison with classical methods

A variety of different meat products was analysed within different batches spreading over several months. Each batch contained two spiked samples for Q-purposes. The recoveries of the observed spike level (average of $n=2$) were determined (table 2). 30 samples consisting of "Fleischkäse", meat pie, and Balkan sausages were analysed by the proposed method and results were compared to classical methods. Argentometry was used to determine the chloride content (17). Nitrite and nitrate were determined by ion-interaction (ion pair) chromatography (18). Data concerning the linear correlation ($y = a + b \cdot x$) are listed in figure 4. Some very high concentration (encircled data points) were not included in the calculation. Such values are expected to affect very strongly the slope of the regression. However, not all elevated concentrations values were excluded, because such concentrations do not represent genuine outliers, but samples found in the market. Nitrate showed the poorest correlation (correlation coefficient $r = 0.811$). It is known from literature that the determination of low nitrate concentrations presents certain difficulties. A comparison (6) between the cadmium reduction and an HPLC method reported (for a similar nitrate concentration range) a correlation coefficient of 0.67. A significant improvement of the correlation is observed at higher concentrations

Table 2
Recoveries of spikes (average of $n = 2$) in different matrices (Results were obtained by analyzing series of different meat products within a period of 10 months)

	<i>Chloride</i>	<i>Mono-phosphate</i>	<i>Di-phosphate</i>	<i>Tri-phosphate</i>	<i>Nitrite</i>	<i>Nitrate</i>
Balkan sausage	97	99	116	109	110	102
	93	92	89	91	97	104
Fleischkäse	97	99	135	112	105	97
	103	86	90	92	105	93
Hamburger	96	95	111	106	103	93
Ham	100	95	86	107	98	94
	97	94	90	100	100	96
Fish sticks	100	101	88	99	105	85
	96	99	79	99	105	83
Meat pie	101	106	82	105	110	105
	96	99	75	104	110	102
Shrimps	101	93	130	112	-	-
	102	101	64	105	-	-
Prawns	103	86	90	92	65	100

Recoveries in % (Spiking level according to procedure)

Comparison IC versus classical methods

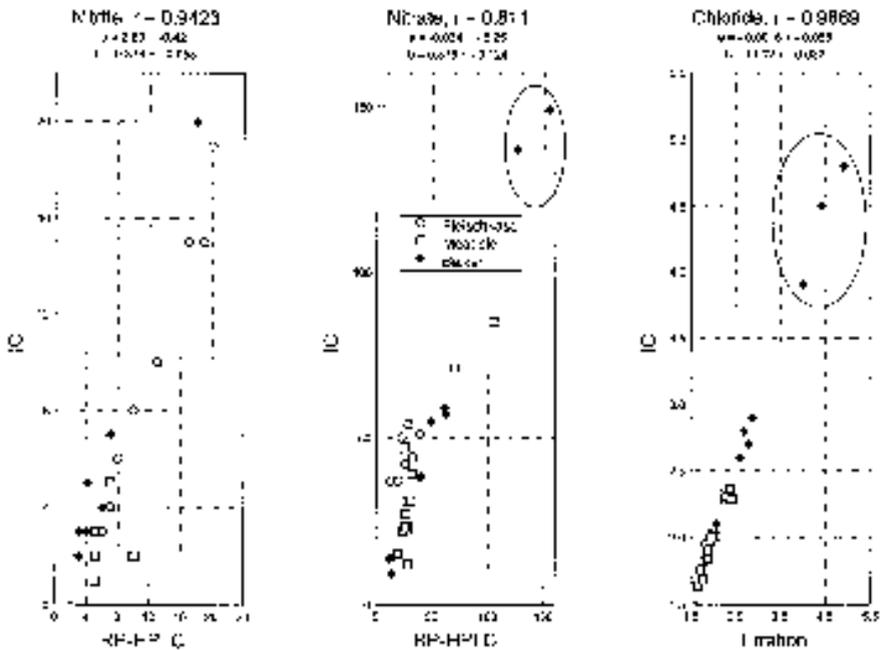


Figure 4 Comparison of results produced by IC versus classical methods (all 30 samples were unspiked). The encircled data points were not included in the calculation for linear regression

(natural occurring or spiked). Because of lack of an alternative method, the polyphosphate results could not be compared.

Discussion

Nitrite and nitrate

Liquid chromatography (ion-interaction chromatography and IC) are becoming increasingly often used to determine nitrite and nitrate in meat products. Capillary electrophoresis is a promising technique. However, a poor signal to noise ratio and a high sensitivity towards changing matrices presents major problems. Ion-interaction chromatography (C-18 column and mobile phase containing a cationic tensid) employs low wavelength UV detection (18). Most meat products produce rather

clean chromatograms without interferences. Still we observed in our laboratory some samples containing a number of interfering matrix peaks. The detection of nitrite can be enhanced by utilizing the more selective and sensitive electrochemical detection. However, according to our experience, such detectors are not always easy to operate. There are also methods utilizing non-suppressed IC with UV detection (19). This approach is sensitive enough, however, the presence of higher amounts of chloride, as found in many meat products, was reported to produce an interfering negative peak (19). Suppressed IC significantly reduces the eluent background signal, hence it permits a more sensitive detection. However, problems were reported for nitrite (6), it can be oxidized to nitrate in the acid environment of a suppressor device. Furthermore, the suppressor product of nitrite (HNO_2) is not chemically stable. The resulting nitrous oxides (unlike anions) are not anymore repelled by the ion-exclusion potential of the membrane suppressor and are likely to diffuse through the membrane of a membrane suppressor device. Modern self-regenerating suppressor devices use electrical potentials to remove the background conductivity. Therefore, it should be tested, if the applied electrical potentials, are low enough to prevent any electrochemical reaction of nitrite or nitrate.

Phosphates

The mentioned thin layer chromatographic (TLC) method lack the necessary sensitivity for the successful determination of polyphosphates in meat products. According to our knowledge, no methods besides TLC have been published for polyphosphates in meat products. However, IC methods were described for polyphosphates in detergent chemicals (13–16). The reported methods utilize gradient IC, because an isocratic elution of mono-, di- and triphosphate is not feasible. The k' -values of the various phosphates are too different to elute them by an isocratic chromatography. There are basically two approaches to separate polyphosphates on an IC column.

Initial work was performed by using acid eluents (HNO_3). Detection was achieved by different post column derivatization reactions. We have utilized iron-nitrate as reagent and UV as detection mode (14). A major problem observed by this approach was the periodic baseline ripples produced by the reagent pump. Chromatograms with such baselines can also be seen in (16). Minor pump pulses can cause spikes because of the high UV absorption of the iron-nitrate reagent. The observed spikes prevent a high sensitivity detection of polyphosphates.

Recently, alkaline eluents, membrane suppressor devices and conductivity detection (15, 16) has been suggested for the quality control of pure polyphosphate chemicals. Reported were high resolution separations from P_1 to P_{35} phosphate units. However, there are no reports how such high performance separations are affected by heavy matrixes like extract of food products.

The proposed method has been used to analyze a great variety of meat products without any interference. However, shrimps, some fish and ham samples produced

an interfering peak in the region of the di- and triphosphate. This peak was visible as a conductivity and a strong UV signal as well. Furthermore, this substance still produced false positives when employing the enzymatic confirmation reaction with phosphatase. We could demonstrate that adenosine-diphosphate (ADP) coelutes with the inorganic triphosphate and that ADP is also degraded by the enzymatic confirmation reaction. This rather insidious problem was solved by adding a porous graphitic carbon column (see instruments and columns) after the separation column. Planar molecules like adenosine are very strongly retained by such a pH stable carbon stationary phase. Hence, ADP and probably some other high energy organic phosphates can be completely eliminated from the chromatogram. It was rather surprising to find significant amounts of such high energy organic phosphates in dead tissue. However, this is not completely surprising, since many shrimps and fish are killed by freezing them alive. Therefore, such samples can still contain such high energy phosphates.

Chloride

Chloride in meat products is almost exclusively determined by silver nitrate titration. A comparison between results, obtained by argentometry (17) and the proposed method, indicated systematic differences. IC determined slightly lower quantities of chloride. These differences were further investigated. In order to avoid possible interfering compounds, titration and IC analysis was performed by analysing the ash of the samples. Samples spiked with sodium chloride were included, in order to check possible losses due to sublimation. The results lead to the conclusion that argentometry delivers slightly higher results, possible because of some organic interference (probably proteins). This bias disappeared when the ash of the sample was analysed.

It is an important feature of this IC method that trace analytes like nitrite are analyzed together with chloride as major component. In order to quantify trace levels of nitrite, a rather concentrated sample has to be injected. On the other hand, high chloride levels tend to overload the column, which results in a non linear peak area response. Yet, the discussed validation showed satisfactory linearities for the three different matrices. However, non-linear calibration is required if lower or higher sodium chloride levels have to be analyzed.

Extraction, clean up

Our results demonstrated that all the mentioned analytes can be easily quantitatively extracted by homogenizing the sample in cold water. Hence we successfully performed initial experiments with cold water extraction. Upon validating the matrix of fermented sausages (e.g. salami), we observed very low recoveries of di- and triphosphates. The reason for this behaviour was attributed to the activity of *phosphatase enzymes* in raw meat products. Surprisingly, decomposition of tri- and di- to monophosphates still proceeded in the HPLC vial. Therefore a hot water

extraction was reintroduced. The high extraction temperature is not important in terms of extraction efficiency, but in terms of enzyme denaturation. Hence the extraction conditions are similar to the ones specified by Charrière (18).

A centrifugation step separates the extraction solution from the insoluble protein and fat. Still, a rather significant portion of protein does not precipitate and remains dissolved in solution. These charged molecules are prone to *contaminate the IC column* (10) and possibly membrane suppressor. However, the standard method for protein precipitation, Carrez solution fails. Because it precipitates mono-, di- and triphosphates almost quantitatively. Perchloric and trichloric acetic acid produced huge, broad IC peaks which occupies large tracts of the chromatogram. But there are other methods to remove proteins, however, such procedures are rather laborious. The risk of shortening the lifetime of expensive latex-type IC columns and membrane suppressors by such “dirty” samples has to be considered. Therefore, ways were sought to cope with the heavy matrix. A reasonable priced spherical hydroxyethyl methacrylate column was used with a pre-column consisting of the same material. This column does not provide the same resolution for polyphosphates as latex based columns. However, hydroxyethyl methacrylate columns are sold at much lower prices than latex based columns. The Anion Dual 1 column separates monophosphate clearly from di- and triphosphate, yet, di- and triphosphate are not completely baseline separated. Longer polyphosphates were not considered because di- and triphosphate are more useful than longer polyphosphates in the field of meat processing technology (20). Another important step was the use of a modern *solid phase suppressor* instead of a membrane suppressor device. The used solid phase suppressor shows low dead volume and is capable of suppressing eluent concentrations which enable the elution of triphosphate. A solid phase suppressor device consists of three mini-cation exchanger cartridges. The first is used to suppress the eluent stream, while the second column is being regenerated by sulfuric acid and the third column is rinsed with water. The three suppressor columns are located in a revolver which rotates from one position to the next. The first commercial introduced solid phase suppressors were known to affect the retention time of some analytes. Weakly dissociated acids were retained by ion-exclusion. The observed shift in retention time depended on the remaining capacity of the suppressor column. No such effects could be observed when employing the Metrohm device, probably because of the reproducible switching time. However, there was a problem concerning the reproducibility of peak areas when using gradient IC. It was observed that one of the three suppressor columns produced significant lower peak areas. This phenomena occurred only, when the suppressor was used until break-through. If a suppressor column is not completely regenerated after a break-through, some sodium ions will consequently remain in the regenerated suppressor column. Such an incompletely regenerated suppressor column permits some analyte anions to elute together with sodium, instead with hydrogen counter-ions. Since sodium has a much lower equivalent

conductivity than hydrogen, the detector registers a lower overall conductivity response. This problem was easily solved by the use of a more concentrated regenerate solution (sulfuric acid). With this solution, all residual sodium ions were removed from the suppressor column. This adjustment resulted in highly reproducible peak areas. Solid phase suppressors were found to be clearly less sensitive to contamination than membrane based devices. Until now (22 months), no replacement of the suppressor cartridge was needed. Furthermore, the replacement of a solid phase suppressor is much cheaper than of a membrane suppressor. The switching of the suppressor is done automatically by the LC data system and has been successfully used for routine analysis. However, because of the mechanics involved, solid phase suppressors require more attention than membrane suppressors. Besides, the present generation of solid phase suppressors show lower exchange capacities than membrane suppressors.

Probably one of the most significant advantages of modern solid phase suppressors is the capability to use *hydrogencarbonate/carbonate gradients*. Carbon dioxide is produced during the suppression of such eluents. Carbon dioxide ultimately degases and makes detection impossible. The application of a back pressure after the detector prevents successfully the formation of carbon dioxide gas bubbles. Unfortunately membrane suppressors cannot be used in this mode, because they are pressure sensitive devices. The needed back pressure would quickly disrupt the suppressor membrane. A hydrogencarbonate/carbonate gradient has major advantages over a classic (membrane suppressor friendly) sodium hydroxide gradient. Sodium hydroxide has no buffer capacity at all. Hence the dissociation of the eluting analytes is not controlled. Uncontrolled dissociation results in analyte concentration dependent retention time drifts. Multiple charged ions like phosphate are especially affected by these phenomena. These negative effects are clearly less observed when using the described method because of the large buffer capacity of the eluent. Furthermore, it is possible to analyze in one chromatogram ppm concentrations of nitrite and chloride in the ranges of up to ten percents. Otherwise a large dynamic range still presents a formidable challenge for the present day IC technology. There are additional benefits of sodium-carbonate as eluent. Sodium-carbonate is less caustic towards human and UV detector cells than sodium-hydroxide. Sodium-hydroxide eluents are known to adsorb carbon-dioxide from the air, which affects strongly the eluting strength of the eluent. This does not happen with the used carbonate/hydrogencarbonate eluent.

A disadvantage, related to the carbonat/hydrogencarbonat eluent, is the clearly higher background conductivity which is caused by carbonic acid. The presence of a dissociated analyte pushes the dissociation equilibrium of carbonic acid towards the undissociated form. Hence the conductivity of the eluent is locally decreased. This baseline dip is not visible since the analyte responsible for this effect produces a much stronger positive conductivity signal response. As a result, small analyte concentrations show peak areas which are lower than expected. Higher analyte con-

centrations are equally affected, however, the small loss in peak area is hardly noticeable, because of the large signal. An argument in favour of this theory is the observation that nitrite and nitrate produce non linear conductivity but linear UV calibration curves. However, all conductivity IC methods (carbonate and hydroxide eluents) produce slightly non-linear calibration curves. This is due to the dissociation of polyvalent anions and the ion activity coefficient. Both effects are affected by the concentration of the analyte ion.

Injection of “dirty” samples affect the performance of the separation system. We consider the replacement of the disposable pre-column as an efficient and affordable way to restore deteriorating separation efficiencies. Once we observed a situation, where phosphate peaks showed some tailing. This behaviour could be linked to a contaminated suppressor. The performance of the system was fully restored by rinsing it with nitric acid. All separations were performed with standard stainless steel HPLC instruments. No negative effects related to the metal environment were observed, hence in our opinion there is no need to use metal-free IC equipment.

Summary

A gradient ion chromatography method was described and validated which permits the determination of chloride, nitrate, nitrite, mono-, di- and triphosphate in meat products. *Detection*: UV and electrolytic conductivity. *Column type*: Metrosep Anion Dual 1. The sample clean up is very simple, as a result, somewhat “dirty” extracts are obtained. In order to minimize the costs for columns and suppressor replacements, affordable IC columns and robust solid-phase suppressors were employed. In addition, the use of a solid phase suppressor permitted the use of well buffered hydrogencarbonate/carbonate eluents. The stability of retention times, linearity of the detector response and extend of the dynamic range were found to be superior to classical latex based columns and unbuffered sodium hydroxide eluents.

Zusammenfassung

Eine Gradienten Ionenchromatographie-Methode für Chlorid, Nitrat, Nitrit, Mono-, Di- und Triphosphat in Fleischerzeugnissen wurde beschrieben und validiert. *Detektion*: UV- und elektrolytische Leitfähigkeit. *Säulentyp*: Metrosep Anion Dual 1. Die Probenaufarbeitung ist sehr einfach, was auf Kosten der Reinheit der Extrakte geht. Aus diesem Grund wurden preisgünstige IC-Säulen und robuste Festphasen-Suppressoren eingesetzt. Der Einsatz eines solchen Suppressors erlaubt die Verwendung von Hydrogencarbonat/Carbonat als Eluent. Die Puffereigenschaft dieses Mediums verbessert die Stabilität der Retentionszeiten. Der dadurch erweiterte dynamische Bereich stellt den Hauptvorteil gegenüber klassischen Latex-IC-Säulen mit ungepufferten Natronlauge Eluenten dar.

Résumé

Une méthode par chromatographie ionique (IC) à gradient est décrite et validée pour la détermination des chlorures, nitrates, nitrites, mono-, di- et tri-phosphates dans les produits carnés. *Détection*: UV et conductibilité électrolytique; *type de colonne*: Metrosep Anion Dual 1. La préparation d'échantillon est très simple et conduit à des extraits impurs. Pour cette raison, des colonnes peu coûteuses et des «solid phase suppressors» durables ont été utilisés. Cette technique permet l'utilisation d'un éluant hydrogénécarbonate/carbonate ce qui améliore la stabilité des temps de rétention. Comparé aux colonnes-IC classiques sur base latex et aux éluants de soude caustique non tamponés, ce système offre l'avantage d'un domaine de quantification plus étendu.

Key words

Meat products, Gradient IC, Polyphosphates, Nitrite, Nitrate, Chloride

References

- 1 Jochen, K. und Sedlmeier, H.: Zur Verbesserung der Bestimmung des Nitrit- und Nitratgehaltes in Fleischerzeugnissen. *Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem.* **42**, 39–42 (1988).
- 2 European Committee for Standardization: Determination of nitrate and/or nitrite content – Part 7: Continuous flow method for the determination of nitrite content of vegetables and vegetable products after cadmium reduction. prENV 12014–7.
- 3 European Committee for Standardization: Determination of nitrate and/or nitrite content – Part 3: Spectrometric determination of nitrate and nitrite content of meat products after enzymatic reduction of nitrate to nitrite. prENV 12014–3.
- 4 Hamano, T. and Mitsuhashi, Y.: Enzymatic method for the determination of nitrite in meat and fish products. *Analyst* **123**, 1127–1129 (1998).
- 5 Cheng, C. and Tsang, C.: Simultaneous determination of nitrite, nitrate and ascorbic acid in canned vegetable juices by reverse-phase ion-interaction HPLC. *Food Addit. Contam.* **15**, 753–758 (1998).
- 6 Eggers, N. and Cattle, D.: High-performance liquid chromatographic method for the determination of nitrate and nitrite in cured meat. *J. Chromatogr.* **354**, 490–494 (1986).
- 7 Marshall, P. and Trennery, C.: The determination of nitrite and nitrate in foods by capillary ion electrophoresis. *Food Chem.* **57**, 339–345 (1996).
- 8 European Committee for Standardization: Determination of nitrate and/or nitrite content – Part 4: IC method for the determination of nitrate and nitrite content of meat products. prENV 12014–4.
- 9 Di Matteo, V. and Esposito, E.: Methods for the determination of nitrite by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A.* **789**, 213–219 (1997).
- 10 Siu, D. and Henshall, A.: Ion chromatographic determination of nitrate and nitrite in meat products. *J. Chromatogr. A.* **804**, 157–160 (1998).
- 11 Jones, K.: Analysenverfahren zur Bestimmung von zugesetztem Polyphosphat in Fleischerzeugnissen. *Fleisch.* **43**, 34–337 (1989).
- 12 Krzynowek, J. and Panunzio, L.: Practical application of thin-layer chromatography for detection of polyphosphates in seafood. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **78**, 1328–1332 (1995).
- 13 Chester, T. and Smith, C.: Determination of inorganic phosphates in detergents by high-performance liquid chromatography on PRP-1 with phosphorus-selective detection. *J. Chromatogr.* **287**, 447–451 (1984).

- 14 *Vaeth, E. und Sladek, P.*: Ionen-Chromatographie von Polyphosphaten und Phosphonaten. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **329**, 584–589 (1987).
- 15 *Baluyot, E. and Hartford, C.*: Comparison of polyphosphate analysis by ion chromatography and by modified end-group titration. *J. Chromatogr. A.* **739**, 217–222 (1996).
- 16 *Skoglund, E. and Carlsson, N.*: High-performance chromatographic separation of inositol phosphate isomers on strong anion exchange columns. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1877–1882 (1998).
- 17 Schweizerisches Lebensmittelbuch: Bestimmung von Chlorid in Fleisch und Fleischwaren. Methoden Nr. 11/6.1. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1995.
- 18 *Charrière, R.*: Détermination du nitrite et du nitrate dans la viande et les produits carnes. SOP Migros Courtepin
- 19 Dionex Application Note 112: Determination of nitrate and nitrite using high-performance anion exchange chromatography (1996).
- 20 *Klettner, P.*: Wirkung unterschiedlicher Phosphate auf Brühwürste. *Mitt. Bundesanstalt für Fleischforschung* 239–247 (1998).

Korrespondenzadresse: Anton Kaufmann, Kantonales Laboratorium, Postfach, CH-8030 Zürich

Pheromone in kosmetischen Produkten – Die Beeinflussung des anderen Geschlechts mit körpereigenen menschlichen Duftstoffen

Eine Übersicht über Physiologie und Toxikologie

Judith Amberg-Müller, Bundesamt für Gesundheit, Abteilung Lebensmittelwissenschaft, Fachstelle Toxikologie, Zürich

Eingegangen 11. April 2000, angenommen 29. Juni 2000

Einleitung

Auf dem Markt sind in letzter Zeit kosmetische Produkte aufgetaucht, die gemäss Werbung menschliche Pheromone enthalten sollen. In verschiedenen deutschen Zeitschriften sowie im Internet wird entsprechend intensiv für solche pheromonhaltigen Düfte geworben. Das Thema «Pheromone in Parfüm» war bereits vor einigen Jahren aktuell, die entsprechenden Produkte vermochten sich allerdings nicht durchzusetzen.

Der Name «Pheromon» kommt vom Griechischen *pherein* (übertragen) und *hormon* (anregen, reizen). Pheromone sind flüchtige chemische Signale, die durch ein Individuum in die Umwelt abgegeben werden und die die Physiologie oder das Verhalten anderer Mitglieder derselben Spezies beeinflussen (1). Gemäss der klassischen Definition werden Pheromone nicht bewusst als Düfte erkannt (2). Es wird unterschieden zwischen olfaktorischen Pheromonen, die über beträchtliche Distanzen wirken können und solchen, die über die orale Aufnahme zur Wirkung kommen, wobei ein Teil der oral aufgenommenen Pheromone letztlich auch olfaktorisch wirken (1).

In (3) wird weiter unterschieden zwischen:

«Primer Pheromone»	Bewirken mit etwas Verzögerung über das neuroendokrine System physiologische oder Verhaltensänderungen; spielen bei verschiedenen Säugern eine wichtige
--------------------	---

Rolle für die sozio-sexuelle Stimulation des reproduktiven Prozesses.

«Releaser Pheromone» Auch «Signaling Pheromone» genannt; stimulieren rasche Verhaltensänderungen; sind bei verschiedenen Vertebraten an der Steuerung von Paarungssequenzen, Aggression und Mutter-Kind-Erkennung beteiligt.

«Information Pheromone» Indikatoren für Identität oder Territorium eines Tieres.

In kosmetischen Produkten werden folgende Substanzen (v.a. Steroide) aus dem Achselschweiss (Sekret der apokrinen Drüsen) verwendet: Androstenol (5 α -Androst-16-en-3 α -ol und auch 5 α -Androst-16-en-3 β -ol), Androstenon (5 α -Androst-16-en-3-on), Androstadienon (4,16-Androstadien-3-on), Androstadienol (5,16-Androstadien-3 β -ol), Estratetraenol, Dehydroepiandrostenon und Androsteron (3-Hydroxy-androstan-17-on), wobei letztere zwei Stoffe nur im frischen Sekret der apokrinen Drüsen nachzuweisen sind. Weiter werden auch Substanzen aus dem Vaginalsekret, sogenannte Kopuline (flüchtige Fettsäuren) verwendet.

Vorkommen

Männliche Geruchsstoffe treten im Schweiss der Achselhöhlen auf. Die Hauptbestandteile des männlichen Schweißes, der v.a. von den apokrinen Drüsen sezerniert wird, sind neben Wasser Fettsäuren und Steroide, wobei die letzteren frei, verestert oder konjugiert sein können. Für den charakteristischen Achselschweißgeruch verantwortlich sind v.a. gesättigte, ungesättigte und verzweigte C₆-C₁₁-Säuren mit (E)-3-Methyl-2-Hexen-Säure als Hauptkomponente (4). Cholesterin, Cholesterinester, Dehydroepiandrosteronsulfat (als wichtigstes C₁₉-Steroid), Androsteron (als Sulfat), Androstendiol (z.B. 5-Androsten-3 β ,17 β -diol-3-sulfat), Testosteronsulfat und Sulfate von 3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on (DHA), sind bereits früher bestimmt und quantifiziert worden (5). Weitere Substanzen von charakteristischem Geruch wie Androstenon, Androstenol, Androstadienol und Androstadienon wurden detektiert (6–8), aber erst später quantifiziert (9). Sie treten in weitaus geringeren Konzentrationen im Achselschweiss auf als die obigen C₁₉-Steroidsulfate. Als Beispiel sind die Konzentrationen an Androstenon bei Männern rund 2000-mal geringer als diejenigen von Dehydroepiandrosteronsulfat (5). Androstenol, mit moschusartigem oder sandelholzartigem Geruch, und Androstenon, mit urinähnlichem Geruch, sind Abbauprodukte von Testosteron und geruchlich die dominantesten Bestandteile des Achselschweißes. Androstenon tritt erst später im Schweiss auf und gibt den stärkeren Geruchseindruck. Androstenol und Androstenon treten auch im Achselschweiss von Frauen auf, jedoch in deutlich geringeren Konzentrationen (10). Andere Steroide als die hauptsächlich untersuchten Androstenon und Androstenol werden ebenfalls als urinös oder nach Moschus riechend eingeschätzt. Androstadienon wird als urinös riechend beschrieben, wobei die Geruchsschwelle dieser Substanz wesentlich tiefer liegt als die für Androstenon. Sie kommt zudem in höherer Konzentration vor als Androstenon. Die Vermutung,

dass Androstadienon ebenfalls eine wichtige Rolle in der humanen Geruchskommunikation spielen könnte, liegt nahe (11). Untersuchungen zur Wirkung dieser Substanz liegen keine vor.

Geschlechtstypische weibliche Geruchsstoffe sind v.a. im Vaginalsekret zu suchen. Diese als «Kopuline» (engl. copulins) bezeichneten Stoffe bestehen aus flüchtigen Fettsäuren (Essigsäure, Propionsäure, Isobuttersäure, Buttersäure, Isovaleriansäure und Isocaproensäure).

Androstenol

Androstenol (Androst-16-en-3 α -ol, MW 274.4) wurde erstmals 1944 aus Schweinehoden isoliert. Es ist ein Alkoholderivat der 16-Androstene und kann aus Cholesterin über 3 β -Hydroxypregn-5-en-20-on gebildet werden (12). Androstenol konnte schon früh auch im Urin von gesunden Männern und Frauen bestimmt werden, bei welchen die Ausscheidung auf durchschnittlich 1000 μ g pro 24 h geschätzt wurde (13). In grösseren Mengen konnte Androstenol aus dem Urin von Patienten mit Nebennierentumoren, -hyperplasie und Luteoma am Ovar isoliert werden (verschiedene Zitate in (14)). Im Urin von gesunden Männern wurden die höchsten Androstenolgehalte im Alter von 20–22 Jahren gefunden (Ausscheidung von 500 bis 2500 μ g/24 h). Jüngere und ältere Männer zeigten deutlich geringere Werte (30–1500 μ g/24 h). Bei Frauen wurden maximale Werte im Alter von 16–18 Jahren gemessen (400–1100 μ g/24 h) (14). Androstenol konnte auch im Plasma von Männern gemessen werden, wobei die Konzentrationen vergleichbar mit Testosteron waren (7). Androstenol tritt im menschlichen Achselschweiss auf und konnte auch in den Achselhaaren nachgewiesen werden (Tabelle 1). Androstenol kann auch durch die axilläre Mikroflora aus Androstenon, welches wiederum aus Androstadienon hervorgeht, gebildet werden (9).

Tabelle 1

Vorkommen von Androstenol im menschlichen Körper und seinen Sekreten
(aus (11))

	<i>Männer</i>	<i>Frauen</i>
Urin	3-mal mehr als Frauen	ja
Schweiss	1100 μ g/Tag	400 μ g/Tag

Es ist keine physiologische hormonelle Funktion von Androstenol im Körper bekannt (15). Androstenol scheint aber ein schwaches anaboles Steroid zu sein (11).

Androstenol hat einen bemerkenswerten, starken Geruch, der von vielen als angenehm, moschusartig oder sandelholzartig bezeichnet wird. Es hat ferner eine strukturelle Ähnlichkeit zu Civeton (Hauptkomponente von «civet» (engl.), dem Duftsekret der Zibetkatze *Viverra zibetha*) (14). Schon sehr geringe Mengen werden vom Menschen wahrgenommen (Geruchsschwelle bei 1–5 ng auf Wasser von 20°C bei einem Abstand von 10 cm von der Nase) (8, 11).

Androstenon

Androstenon (5 α -Androst-16-en-3-on, MW 272.4) ist ein Ketonderivat der 16-Androstene. Es hat bei Schweinen die Bedeutung eines männlichen Releaser Pheromons und löst die Duldungsstarre der Sau aus. Androstenon konnte im Achselsekret von Männern nachgewiesen werden. Die Bildung ist bei Männern starken Schwankungen unterworfen (12–1134 pmol/24 h entsprechend 0,0033–0,3089 $\mu\text{g}/24\text{ h}$) (6), wobei in der rechten Achselhöhle signifikant mehr Androstenon produziert wird als in der linken. Für diesen Unterschied findet sich allerdings keine Erklärung. Es wurde ein Zusammenhang zwischen der Menge Testosteron im Blutplasma und Androstenon in der Achsel gefunden (7). Bei Frauen ist die Bildung von Androstenon im allgemeinen gering (13–39 pmol/24 h entsprechend 0,0035–0,0106 $\mu\text{g}/24\text{ h}$) (Tabelle 2).

Tabelle 2

Vorkommen von 5 α -Androst-16-en-3-on im menschlichen Körper und seinen Sekreten (aus (6,11))

	Männer	Frauen
Plasma	3,26 ng/ml	ja
Schweiß	0,350 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ (Summe aus beiden Achselhöhlen)	ja
Fettgewebe	0,103 $\mu\text{g}/\text{g}$	nein
Urin	1050 $\mu\text{g}/\text{Tag}$	360 $\mu\text{g}/\text{Tag}^*$

* während Lutealphase

Androstenon hat beim Menschen keine bekannte Funktion als Sexualhormon (11).

Die Bildung von Androstenon in der Achselhöhle von Männern wird durch die Anwendung von keimhemmenden Substanzen (z.B. Iod-Povidon) stark vermindert. Androstenon scheint somit ein Produkt des Metabolismus von Mikroorganismen auf der menschlichen Haut zu sein (6, 10). Für Androstenon gibt es eine spezifische Anosmie (verminderte oder fehlende Geruchswahrnehmung), von der rund 50% der Bevölkerung betroffen sind. Dies entspricht der höchsten Inzidenz von spezifischer Anosmie, die für Geruchsstoffe je beschrieben wurde. Die Personen, die Androstenon riechen können, zerfallen in zwei Untergruppen; die eine Gruppe ist sehr sensitiv und beschreibt den Geruch als urinös, extrem unangenehm, die andere Gruppe ist weniger sensitiv, kann den Geruch von Androstenon erst in höheren Konzentrationen wahrnehmen und beschreibt den Geruch als süß, parfümartig und moschusartig oder sandelholzartig. Die Geruchsschwelle für Androstenon bei beiden Geschlechtern liegt mit 0,02–0,20 ng/ml relativ niedrig (diverse Zitate in (11)).

Androsteron

Androsteron (3-Hydroxy-androstan-17-on) kommt im menschlichen Urin und Plasma vor. Bezüglich seines Vorkommens im Achselsekret besteht Unklarheit (5, 15). Androsteron hat ähnliche olfaktorische Qualitäten wie Androstenol. Der Geruch wird als schwach moschusartig, urinös und sandelholzartig beschrieben. Androsteron hat eine schwache androgene Wirkung (5). Studien hinsichtlich einer möglichen Wirkung von Androsteron als olfaktorischer Stimulus auf den Menschen fehlen weitgehend (11).

Kopuline

Kopuline wurden erstmals bei Rhesusaffen beschrieben und bestehen bei letzteren aus den Fettsäuren (C2-C6) Essigsäure, Propionsäure, Isobuttersäure (2-Methylpropionsäure), Buttersäure, Isovaleriansäure (2-Methylbuttersäure) und Isocaproensäure (2-Methylvaleriansäure) (16, 17). Die verschiedenen Fettsäuren treten bei Rhesusaffen etwa in folgendem Verhältnis auf: Essigsäure 9,2 $\mu\text{g/ml}$, Propionsäure 8,8 $\mu\text{g/ml}$, Isobuttersäure 4,2 $\mu\text{g/ml}$, Buttersäure 12,8 $\mu\text{g/ml}$ und Isovaleriansäure 8,3 $\mu\text{g/ml}$ und nur sehr wenig Isocaproensäure. 2 ml dieser Mischung entspricht ca. 1,5-mal der Menge, die durch eine Vaginalspülung bei Rhesusaffen gewonnen werden kann, und zeigte im Versuch die gleiche Aktivität in Bezug auf das Verhalten (Stimulation von Besteigungsaktivität und Ejakulation bei Männchen) (16). Menschliche Vaginalsekrete sind denen von anderen Primaten sehr ähnlich und enthalten die gleichen flüchtigen Fettsäuren. Essigsäure wird aber anteilmässig viel mehr gebildet (18). Der Anteil der Fettsäuren im Vaginalsekret variiert im Laufe des Menstruationszyklus und ist individuell sehr unterschiedlich. Die höchste Konzentration wird kurz nach der Ovulation erreicht. Dabei variiert die Essigsäurekonzentration im Gegensatz zu den anderen Fettsäuren nur wenig. Bei einem Grossteil der Frauen (34%) wird ausschliesslich Essigsäure sezerniert. Die restliche weibliche Population (66%) produziert auch die weiteren fünf Fettsäuren, wobei die anteilmässigen Mengen im Bereich von $0,3 \pm 0,2 \mu\text{g}$ bis $8,3 \pm 2,6 \mu\text{g/Probe}$ (geringste Konzentration an Isocaproensäure, höchste Konzentration an Propionsäure) liegen, bei $91,0 \pm 4,1 \mu\text{g}$ Essigsäure/Probe und einem Total an Fettsäuren von $105,7 \pm 7,9 \mu\text{g/Probe}$ (Probennahme mittels Tampons, die jeweils 6–8 h in der Scheide belassen wurden). Durch die Einnahme von hormonellen Kontrazeptiva wird die Fettsäurekonzentration im Vaginalsekret reduziert. Es wird vermutet, dass Zersetzungsprozesse durch Bakterien zur Produktion dieser Säuren führen und dass der Bakterienanteil über die Geschlechtshormone reguliert wird (18).

Physiologische Wirkungen

Pheromone werden vom vomeronasalen Organ (VNO), einer kleinen tubulären Struktur mit Rezeptorzellen im Bereich des Nasendaches, detektiert. Das Vorhandensein des VNO beim Menschen wurde vor kürzerer Zeit mehrfach nachgewiesen (19, 20). Das VNO ist vom olfaktorischen System getrennt. Beim Menschen werden

Signale vom VNO zu Regionen des Hypothalamus im zentralen Nervensystem geleitet, welcher wichtige Regulationsvorgänge im Organismus steuert, u.a. auch die Sexualfunktionen. Bei vielen Säugern hat das VNO ein eigenes nervöses System, welches die Informationen weiterleitet, das akzessorische olfaktorische System (AOS). Vom VNO bestehen Verbindungen zum akzessorischen Bulbus olfactorius nicht aber zum eigentlichen Bulbus olfactorius und weiter in die corticomediale Amygdala, Hypothalamus und Area praeoptica. Die Existenz des AOS wird beim Menschen in Frage gestellt (20). Da die Geruchsinformation an das limbische System weitergeleitet wird, ist es nicht verwunderlich, dass diese auch die Hypothalamus-Hypophysen-Verbindung und damit die Kaskade gonadotropinfreisetzendes Hormon – follikelstimulierendes Hormon – luteinisierendes Hormon (bewirkt u.a. Gonadenwachstum, Testosteronausschüttung) und schliesslich die Sexualhormonkonzentrationen beeinflussen kann (21). Ein Zusammenhang zwischen den fertilisierenden Effekten von männlichem Schweiß und dem weiblichen Hormonhaushalt ist bisher nur über die Beobachtung der Zyklusveränderung beschrieben worden (22).

Viele Säugerpheromone werden durch direkten physischen Kontakt übertragen und greifen am olfaktorischen oder vomeronasalen System an. Damit ist die Wirkung von Pheromonen an eine sehr geringe Distanz zwischen Individuen gebunden. Säugerpheromone sind meistens mit Proteinen assoziiert, die z.B. als Rezeptorproteine wirken (23). Das VNO nimmt Substanzen auf, die ein hohes Molekulargewicht haben, nicht flüchtig sind und meistens Proteine enthalten, während das olfaktorische System darauf angewiesen ist, dass das Stimulusmaterial flüchtig ist.

Untersuchungen zur Reizverarbeitung am menschlichen VNO zeigten, dass eine Pheromon-Exposition von nur 300 Millisekunden ausreicht, um physiologische Veränderungen auszulösen. Die VNOs von Versuchspersonen sprachen bereits auf 15–25 pg Pheromon an (19, 24).

Befunde beim Menschen

Ob es menschliche Pheromone im eigentlichen Sinne gibt bzw. inwiefern Pheromone beim Menschen ihre ursprüngliche Funktion beibehalten haben oder nur noch als handlungsbeeinflussende Chemo-Signale anzusehen sind, die der Definition des Begriffes «Pheromon» nicht mehr gerecht werden, wird sehr kontrovers diskutiert. Für das menschliche Verhalten sind komplexere Wahrnehmungs- und Informationsverarbeitungssysteme verantwortlich als etwa bei niederen Säugern, wo einfache Stimulus-Response-Mechanismen ablaufen, die zu eng umgrenzten physiologischen Reaktionen führen. Ursprünglich spezifische olfaktorische Stimuli münden beim Menschen aufgrund hinzugekommener, entwicklungsgeschichtlicher Verarbeitungsprozesse nicht in eine festgelegte Reaktion, sondern lassen verschiedene Reaktionsmöglichkeiten zu. Zudem spielt die kognitive Verarbeitung von Umweltstimuli eine bedeutsame Rolle. Daher ist es beim Menschen wesentlich

schwieriger, die Wirkung von Pheromonen, nach der oben genannten Definition, eindeutig nachzuweisen. Die Verwendung der Begriffe «Chemo-Signale» bzw. «olfaktorische Signale» für olfaktorische Stimulanzien im menschlichen Achsel- schweiss und Vaginalsekret erscheint daher sinnvoller.

Es wurde erst in letzter Zeit wissenschaftlich untersucht und erkannt, dass die olfaktorische Botschaft für die Partnerwahl des Menschen von Bedeutung ist (25, 26). Der Einfluss der Androstene auf die individuelle Fremd- und Selbstbeurteilung und Stimmungsbeeinflussung wurde mehrfach untersucht (27, 28). Dabei zeigte Androstenol durchwegs positive Stimmungsverschiebungen bei Frauen, wobei die Wahrnehmung von Androstenol durch Frauen zyklusabhängig zu sein scheint. Die Hauptkomponente des männlichen Achselschweisses, Androstenon, wurde von Frauen immer negativ beurteilt. Zum Zeitpunkt der höchsten Empfängnisbereitschaft verlieren Frauen allerdings ihre aversive Haltung gegenüber dem urinähnlichen Geruch des Androstenons (29). Damit lässt sich für Männer am Verhalten der Frauen ablesen, in welchem Zykluszustand sie sich befinden. Grundsätzlich unterlaufen Männer damit die bei Frauen, im Gegensatz zu allen andern Primaten, versteckte Ovulation¹.

Androstenol

Männliche und weibliche Probanden, die angewiesen wurden, über Nacht Halsketten zu tragen, die Androstenol emittierten, wurden nach ihren sozialen Interaktionen (Konversationen) am nächsten Morgen befragt. Während für Interaktionen von Männern mit Männern oder Frauen und für Interaktionen von Frauen mit Frauen keine Effekte beobachtet wurden, waren weibliche Interaktionen mit Männern viel häufiger und intensiver als bei Kontrollen. Erklärungen für den Befund fehlen in der Studie (28). Unter natürlichen Bedingungen werden hohe Androstenolexpositionen bei Frauen nur durch direkten Körperkontakt mit Männern erreicht. Die Wirkung und Funktion von Androstenol beim Menschen wird demnach auch verschiedentlich als Stärkung der Paarbindung beschrieben. Männer und Frauen beurteilen unter der Einwirkung von Androstenol Frauen positiver. Frauen beurteilen unter Androstenol männliche (schriftlich charakterisierte) Stellenbewerber positiver, Männer dagegen entsprechende Bewerberinnen weitaus kritischer (28). Ob Männer oder Frauen stärker durch Androstenol beeinflusst werden, geht aus verschiedenen Studien (siehe (11)) nicht klar hervor. Bei Frauen scheint die Wirkung im Zusammenhang mit dem reproduktiven Status zu stehen.

Eine Studie zu möglichen Effekten von Androstenol (und Androsteron) auf das Wahl- bzw. Vermeidungsverhalten zeigte, dass Männer Toilettenabteile, die mit

¹ Mit Ausnahme des Menschen wird bei allen Primaten die Empfängnisbereitschaft durch deutliche olfaktorische Anzeichen (spezifische Geruchsstoffe im Vaginalsekret) oder visuelle Signale (Perinealschwellungen und/oder Verfärbungen im Genitalbereich) angezeigt. Beim Menschen ist im Laufe der Evolution der genaue Zeitpunkt der Ovulation nicht mehr von aussen abzulesen und die Frau ist während des gesamten Zyklus potentiell sexuell rezeptiv.

Androstenol behandelt wurden, mieden, nicht aber auf Androsteron reagierten, das als Kontrollgeruch mit ähnlicher Note verwendet wurde. Frauen zeigten keine Beeinflussung durch Androstenol (und Androsteron). Demnach könnte Androstenol bei Männern die Funktion und Wirkung eines sogenannten «spacing» Pheromones (Markierung, Abgrenzung) haben. Ob unter physiologischen Bedingungen ein ähnliches Verhalten ausgelöst wird, geht aus dem Versuch nicht hervor, da die verwendete Androstenolkonzentration deutlich über der natürlicherweise im Schweiß und Urin auftretenden lag. Deutlich wird aber, dass beim Menschen eine pheromonale Kommunikation grundsätzlich auslösbar ist (15).

Frauen, die während eines Monats täglich Androstenol auf die Oberlippe applizierten, tendierten dazu, ihren Gemütszustand in der Mitte ihres monatlichen Zyklus eher als unterwürfig denn als aggressiv zu beurteilen. Die Substanz beeinflusste dagegen die Einschätzung bezüglich glücklich/depressiv, lethargisch/lebhaft, sexy/unsexy, reizbar/gutmütig nicht. Das weibliche Geruchsempfinden scheint zyklusabhängig zu variieren (30).

Eine einzige Studie beschreibt einen fehlenden Einfluss von Androstenol auf die Beurteilung der Attraktivität anderer, gegengeschlechtlicher Individuen, die Androstenol (je 5 Tropfen einer Lösung von 1% in Ethanol an beiden Handgelenken und hinter den Ohren, d.h. rund 3 mg) an sich trugen (31).

Untersuchungen zu einer möglichen Beeinflussung der sexuellen Erregung durch Androstenol ergaben, dass Frauen (100 freiwillige Probanden, 0,3 mg Androstenol in Ethanol auf Maske) selbst unter offengelegter Manipulation (Lesen eines sexuell erregenden Textes aus dem Magazin «Penthouse») durch Androstenol nicht in ihren sexuellen Gefühlen beeinflusst wurden. In der Studie wurden allerdings die Phasen des weiblichen Zyklus nicht berücksichtigt (32).

Androstenon

Versuche mit Androstenon, das einem Parfüm beigefügt wurde, ergaben, je nach Konzentration der beigemischten Menge an Androstenon, unterschiedliche Präferenzen der Probanden für das Parfüm. Höhere Konzentrationen an Androstenon wurden bevorzugt. Die Autoren kommen zur Schlussfolgerung, dass Androstenon (allein präsentiert) als unangenehm bewertet wird, jedoch einen gegenteiligen Effekt hat, wenn es mit anderen Substanzen gemischt wird. Personen, die Androstenon nicht riechen können, also dafür anosmisch sind, werden entsprechend in ihrer Präferenz nicht beeinflusst (33).

In zwei unabhängigen Versuchen wurde beobachtet, dass Stühle, die mit Androstenon besprüht worden waren, von Frauen bevorzugt, von Männern dagegen gemieden wurden (34, 35). Die Befunde sind allerdings kritisch zu bewerten, da wenig über den experimentellen Ablauf bekannt ist bzw. methodische Mängel bestehen.

Die regelmässige Applikation von Androstenon bzw. von männlichem Achselsekret auf die Oberlippe, wie auch die olfaktorische Präsenz eines Mannes, vermö-

gen den Zyklus von Frauen zu verändern. Es kommt zu einer Verkürzung und höheren Regelmässigkeit des Menstruationszyklus (22).

Die Bewertung von Männer- und Frauenphotos unter dem Einfluss von Androstenon scheint stark von der Geruchssensitivität bzw. dem Zyklusstadium abhängig zu sein. Männer, die Androstenon als angenehm empfinden, schätzen Männerphotos positiver ein. Androstenon wirkt sich im letzten Drittel des Zyklus bei Frauen am stärksten aus. Androstenon beeinflusst die Selbsteinschätzung der Befindlichkeit von Frauen. Die Versuche ergaben aber keine einheitlichen Befunde. Frauen schätzten sich unter Androstenon als erhitzter, sympathischer, unangenehmer und aufgeputzter ein (36). Androsteron und Androstenol beeinflussten die weibliche Beurteilung von Männerphotographien in positiver Weise (11).

Kopuline

Der Einfluss von Kopulinen auf die Bewertung weiblicher Attraktivität wurde ebenfalls wissenschaftlich untersucht. Es konnte eine deutliche Tendenz in Richtung positiver Einschätzung sowie eine physiologische Reaktion des männlichen Hormonhaushaltes gezeigt werden (21).

Die Wirkung von drei Typen von synthetischen Kopulinen (präovulative, ovulative und postovulative) wurde an 66 männlichen Nichtraucher getestet. Die präsentierten Kopuline setzten sich aus Essig-, Propion-, Butter-, Isobutter- und Isovaleriansäure zusammen. Die Wirkung aller Kopuline zeigte im Vergleich zu Kontrollen (Wasser) eine deutliche Tendenz in Richtung positiverer Einschätzung. Je unattraktiver die Frau ohne Geruch eingeschätzt wird, desto mehr gewinnt sie durch die Kopulinwirkung. Die Testosteronkonzentration im Speichel der Männer wurde durch den geruchlichen Reiz beeinflusst. Ovulatorische Kopuline bewirkten einen deutlichen Anstieg gegenüber präovulativen und postovulativen (21).

Geruchlose Substanzen aus der Achselhöhle von Frauen in der späten folliculären Phase ihrer Menstruationszyklen beeinflussten die Menstruationszyklen von geruchsempfindenden Frauen im Sinne einer Synchronisierung ihrer Zyklen (26).

Toxikologie

Daten zur Toxikologie der Steroide aus dem männlichen Achselschweiss und der flüchtigen Fettsäuren im Vaginalsekret fehlen in der wissenschaftlichen Literatur. Bei der externen Applikation der oben beschriebenen menschlichen Duftstoffe, die Abbauprodukte von Hormonen darstellen, ist bei einer Anwendung in geringen, natürlicherweise auftretenden Konzentrationen nicht mit hormonellen oder toxischen Effekten zu rechnen. Die natürlicherweise im menschlichen Vaginalsekret vorkommenden Fettsäuren sind physiologische Stoffwechselprodukte und in geringen Anwendungskonzentrationen toxikologisch unproblematisch.

Exposition des Verbrauchers

Aufgrund der beschränkten Angaben zu den in Parfüms und Eau de Toilette eingesetzten Konzentrationen an olfaktorischen Stimulantien ist eine genaue Abschätzung der Exposition des Verbrauchers nicht möglich. Wird für die Verwendung von Eau de Toilette mit einer ein- bis fünfmal täglichen Auftragung von ca. 0,75 g Produkt pro Applikation gerechnet und als Beispiel eine Wirkstoffkonzentration von 0,15 % für Androstenol und 0,05 % für Androstenon (also 1 % aktives Hormon in verwendeter konzentrierter Lösung) angenommen, ergibt sich eine Exposition von 5600 µg Androstenol und 375 µg Androstenon pro Person und Tag.

Im Vergleich dazu liegen die natürlicherweise produzierten Mengen beim Menschen in einer ähnlichen Größenordnung. Androstenol wird von Männern in Mengen bis zu 1100 µg/Tag mit dem Achselsschweiss und bis zu 1500 µg/Tag im Urin ausgeschieden. Androstenon wird von Männern in Mengen bis zu 0,3 µg/Tag mit dem Achselsschweiss und bis zu 1000 µg/Tag im Urin ausgeschieden. Die Produktion von Kopulinen im Vaginalsekret von Frauen beträgt rund 100 µg in 6–8 Stunden.

Schlussfolgerung

Die Verwendung von Steroiden aus dem männlichen Achselsschweiss (Androstenol und Androstenon) und von flüchtigen Fettsäuren aus dem Vaginalsekret (Kopuline) in Parfüm und Eau de Cologne ist aus toxikologischer Sicht als unbedenklich zu beurteilen. Obwohl in der wissenschaftlichen Literatur keine Angaben zu systemischen physiologischen Wirkungen der Testosteronabkömmlinge Androstenol und Androstenon gefunden werden konnten, ist beim Gebrauch solcher Produkte kaum mit einer direkten hormonellen Wirkung beim Menschen zu rechnen.

Die Übertragung von Pheromonen und somit ihre physiologische Wirkung ist grundsätzlich an einen engen Kontakt zwischen zwei Individuen gebunden. Die Pheromonwirkung ist zudem konzentrationsabhängig und oft sind Interaktionen mit anderen Substanzen notwendig, bevor eine pheromonale Wirkung einsetzt. Es erscheint daher eher zweifelhaft, dass die angepriesene und vom Anwender erhoffte Wirkung auf das andere Geschlecht über die Verbreitung des Duftes tatsächlich erfolgt.

Zusammenfassung

Pheromone sind flüchtige chemische Signale, die durch ein Individuum in die Umwelt abgegeben werden und die die Physiologie oder das Verhalten anderer Mitglieder derselben Spezies beeinflussen. Als wichtig für die humane Geruchskommunikation gelten v.a. die Steroide im männlichen und in geringerem Masse im weiblichen Achselsschweiss. Flüchtige Fettsäuren aus dem Vaginalsekret von Frauen, die sog. Kopuline, werden ebenfalls zu den Pheromonen gezählt. Diese Düfte werden als urinös oder moschusartig bis süß oder sandelholzartig riechend charakterisiert, wobei eine substanzspezifische und auch individuell unterschiedliche Geruchs-

schwelle besteht, die zu verschiedenen olfaktorischen Empfindungen führt. Am besten untersucht und dokumentiert sind die beiden Androstenderivate Androsténol und Androsténon, welche eine wichtige Rolle im Sexualverhalten von Schweinen haben. Ob diese körpereigene Geruchsstoffe auch das menschliche Verhalten bei der Partnerwahl massgeblich beeinflussen, ist bis heute nicht eindeutig nachgewiesen. Verschiedene Untersuchungen ergaben aber Hinweise darauf, dass beim Menschen eine pheromonale Kommunikation grundsätzlich auslösbar ist. Physiologische hormonelle Wirkungen sind für die meisten der beim Menschen als Pheromone geltenden Substanzen nicht bekannt. Aus toxikologischer Sicht wird die Verwendung dieser Substanzen in kosmetischen Produkten als unbedenklich beurteilt.

Résumé

Les phéromones sont des signaux chimiques volatils émis dans l'environnement par un individu et qui influencent la physiologie ou le comportement d'autres membres de la même espèce. Dans la communication humaine par les odeurs, ce sont surtout les stéroïdes androgènes qui jouent un rôle chez l'homme et, dans une moindre mesure, chez la femme dans la transpiration axillaire. Les acides gras volatils présents dans la sécrétion vaginale, la copuline, entrent également dans la catégorie des phéromones. Ces odeurs font penser à une odeur d'urine ou de musc, voire à une odeur douceâtre ou de bois de santal. Il existe cependant un seuil d'odeur, spécifique à la substance et qui varie selon les individus, qui fait que les perceptions olfactives peuvent être différentes. Les deux dérivés de l'androstène, l'androsténol et l'androsténone, qui jouent un rôle important dans le comportement sexuel des porcs, sont les phéromones les mieux étudiées et les mieux documentées. A ce jour, on n'a pas encore établi de manière certaine si ces substances corporelles odorantes influençaient de manière déterminante le choix du partenaire chez les humains. Différentes études fournissent cependant certains indices selon lesquels une communication phéromonale est en principe possible chez l'humain. On ne connaît pas les effets hormonaux physiologiques de la plupart des substances considérées comme phéromones chez l'humain. Du point de vue toxicologique l'utilisation de ces substances dans les cosmétiques est jugée comme étant sans danger pour la santé.

Summary "Pheromones in Cosmetic Products – Influence of Odorous Human Secretions on the Opposite Sex"

Pheromones are airborne chemical signals that are released by an individual into the environment and which affect the physiology or the behaviour of other members of the same species. Of major importance for human odour communication are the androgen steroids in male and to a lesser extent in female axillary sweat. Volatile fatty acids from vaginal secretions, the copulins, are also regarded as pheromones. These odours are characterized as urinous or musk-like to sweet or sandalwood-like, as there is a substance-specific and individual olfactory sensitivity, leading to different sensations. Best analysed and documented are the androsten derivatives androstenol

and androstenon which have a major role in the sexual behaviour of the pig. It has not been fully established whether these physiological odours have a major influence on human sexual attraction. However, results from various studies indicate that pheromonal communication can be evoked in humans. Physiological hormonal effects are not known for most putative human pheromones. From the toxicological point of view the use of these substances in cosmetic products is considered as safe.

Key words

Pheromones, Cosmetics, Human, Sexual attraction, Review

Literatur

- 1 *Karlson, P. and Lüscher, M.*: «Pheromones»: a new term for a class of biologically active substances. *Nature* **183**, 55–56 (1959).
- 2 *Beauchamp, G.K., Doty, R.L., Mouthon, D.G. and Mugford, R.A.*: In: Doty, R.L. (ed.), *Mammalian olfaction, reproductive processes and behavior*, p. 144–157 Academic Press, New York 1976.
- 3 *Wilson, E.O. and Bossert, W.H.*: Chemical communication among animals. *Rec. Prog. Horm. Res.* **19**, 673–716 (1963).
- 4 *Zeng, X.N., Leyden, J.J., Spielman, A.I. and Preti, G.*: Analysis of characteristics of human female odors: Qualitative comparison to males. *J. Chem. Ecol.* **22**, 237–257 (1996).
- 5 *Toth, I. and Faredin, I.*: Steroids excreted by human skin. II. C19-steroid sulphates in human axillary sweat. *Acta Med. Hung.* **42**, 21–28 (1985).
- 6 *Bird, S. and Gower, D.B.*: Axillary 5 α -androst-16-en-3-one, cholesterol and squalene in men: preliminary evidence for 5 α -androst-16-en-3-one being a product of bacterial action. *J. Steroid Biochem.* **17**, 517–522 (1982).
- 7 *Claus, R. and Alsing, W.*: Occurrence of 5-androst-16-en-3-one, a boar pheromone, in man and its relationship to testosterone. *J. Endocrinol.* **68**, 483–484 (1976).
- 8 *Brooksbank, B.W., Brown, R. and Gustafsson J.A.*: The detection of 5 α -androst-16-en-3 α -ol in human male axillary sweat. *Experientia* **30**, 864–865 (1974).
- 9 *Nixon, A., Mallet, A.I. and Gower, D.B.*: Simultaneous quantification of five odorous steroids (16-androstenes) in the axillary hair of men. *J. Steroid Biochem.* **29**, 505–510 (1988).
- 10 *Bird, S. and Gower, D.B.*: The validation and use of a radioimmunoassay for 5 α -androst-16-en-3-one in human axillary collections. *J. Steroid Biochem.* **14**, 213–219 (1981).
- 11 *Maiworm, R.E.*: Menschliche Geruchskommunikation – Einflüsse körpereigener Duftstoffe auf die gegengeschlechtliche Attraktivitätswahrnehmung. Waxmann, Münster 1993.
- 12 *Burstein, S. and Dorfman, R.I.*: 1st Int. Congr. Endocrin., Copenhagen, Short Commun. No. 346 (1960).
- 13 *Brooksbank, B.W. and Haslewood, G.A.D.*: Investigations on urinary “pregnanediol-like glucuronide” (PLG). The isolation of Δ^{16} -androst-3(α)-ol from normal human male urine. *Biochem. J.* **44**, iii (1949).
- 14 *Brooksbank, B.W. and Haslewood, G.A.D.*: The estimation of androst-16-en-3 α -ol in human urine. *Biochem. J.* **80**, 488–495 (1961).
- 15 *Gustavson, A.R., Dawson, M.E. and Bonett, D.G.*: Androstenol, a putative human pheromone, affects human (*Homo sapiens*) male choice performance. *J. Compar. Psychol.* **101**, 210–212 (1987).
- 16 *Curtis, R.F., Ballantine, J.A., Keverne, E.B., Bonsall, R.W. and Michael, R.P.*: Identification of primate sexual pheromones and the properties of synthetic attractants. *Nature* **232**, 396–398 (1971).

- 17 Michael, R.P., Keverne, E.B. and Bonsall, R.W.: Pheromones: Isolation of male sex attractants from a female primate. *Science* **172**, 964–966 (1971).
- 18 Michael, R.P., Bonsall, R.W. and Kutner, M.: Volatile fatty acids, "copulins", in human vaginal secretions. *Psychoneuroendocrinology* **1**, 153–163 (1975).
- 19 Monti-Bloch, L. and Grosser, B.I.: Effect of putative pheromones on the electrical activity of the human vomeronasal organ and olfactory epithelium. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **39**, 573–582 (1991).
- 20 Meredith, M.: Sensory processing in the main and accessory olfactory systems: comparisons and contrasts. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **39**, 601–614 (1991).
- 21 Grammer, K. and Jütte, A.: Der Krieg der Düfte: Bedeutung der Pheromone für die menschliche Reproduktion. *Gynäkol. Geburtshilfliche Rundsch.* **37**, 150–153 (1997).
- 22 Cutler, W.B., Preti, G., Krieger, A., Huggins, G.R., Garcia, C.R. and Lawley, H.J.: Human axillary secretions influence women's menstrual cycles: the role of donor extract from men. *Horm. Behav.* **20**, 463–473 (1986).
- 23 Singer, A.G.: A chemistry of mammalian pheromones. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **39**, 627–632 (1991).
- 24 Monti-Bloch, L., Jennings-White, C., Dolberg, D.S. and Berliner, D.L.: The human vomeronasal system. *Psychoneuroendocrinology* **19**, 673–686 (1994).
- 25 Jütte, A.: Weibliche Pheromone – Wirkung und Rolle von synthetischen «Kopulinen» bei der versteckten Ovulation des Menschen. Diplomarbeit an der Universität Wien, 1995.
- 26 Stern, K. and McClintock, M.K.: Regulation of ovulation by human pheromones. *Nature* **392**, 177–179 (1998).
- 27 Filsinger, E.E. and Monte, W.C.: Sex history, menstrual cycle, and psychophysical ratings of alpha androstenone, a possible human sex pheromone. *J. Sex Res.* **22**, 243–248 (1986).
- 28 Cowley, J.J., Johnson, A.L. and Brooksbank, B.W.: The effect of two odorous compounds on performance in an assessment-of people test. *Psychoneuroendocrinology* **2**, 159–172 (1977).
- 29 Grammer, K.: 5- α -androst-16en-3 α -on: A male pheromone? A brief report. *Ethol. Sociobiol.* **14**, 201–208 (1993).
- 30 Benton, D.: The influence of androstenol – a putative human pheromone – on mood throughout the menstrual cycle. *Biol. Psychol.* **15**, 249–256 (1982).
- 31 Black, S.L. and Biron, C.: Androstenol as a human pheromone: no effect on perceived physical attractiveness. *Behav. Neural Biol.* **34**, 326–330 (1982).
- 32 Benton, D. and Westall, V.: Effects of androstenol on human sexual arousal. *Biol. Psychol.* **22**, 141–147 (1986).
- 33 Dodd, G. and Van Toller, S.: The Biochemistry and psychology of perfumery. *Perfumer Flavorist* **8**, 1–14 (1983).
- 34 Clark, T.: Whose pheromone are you? *World Medicine* **26**, 21–23 (1978).
- 35 Kirk-Smith, M.D. and Booth, D.A.: Effects of androstenone on choice of location in other's presence, In: Van der Stave, H. (ed.), *Olfaction and taste 7*. IRL Press, London 1980.
- 36 Maiworm, R.E.: Zur Wirkung von Androstenol und Androstenon auf die Einschätzung der Attraktivität von Männerphotos durch Frauen. Unveröffentlichte Diplomarbeit an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Fachbereich Psychologie, Münster 1990.

Korrespondenzadresse: Dr. Judith Amberg-Müller, Bundesamt für Gesundheit, Fachstelle Toxikologie, c/o Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie, Winterthurerstrasse 260, CH-8057 Zürich

Feasibility Study: Detection of “Rind Taste” Off-Flavour in Swiss Emmental Cheese Using an “Electronic Nose” and a GC-MS

Emmanuelle Schaller and Jacques Olivier Bosset, Swiss Federal Dairy Research Station at Liebefeld, Berne

Felix Escher, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Institute of Food Science, Zürich

Received 2 May 2000, accepted 14 July 2000

Introduction

Processed cheese is a popular product on the Swiss cheese market. The cheese used for processed cheese production can come from three different sources: i) some cheese varieties are manufactured specially for this purpose; ii) cheese blocks with certain defects, e.g. the presence of too many eyes or splits making the blocks unsuitable for automatic packaging, or slight taste defects (but strong off-flavour would be noticeable in the final product); iii) the so-called cheese parings referring to the hoop side of the block coming from the packaging process. During the packaging process rectangular pieces are cut and packaged. The round pieces from the outer side of the blocks are set aside for the production of processed cheese. A significant proportion of the cheese used originates from Swiss Emmental cheese.

If the Swiss Emmental cheese used for the processing is not very well looked after during ripening in the cellar and/or stored before processing, it can develop a so-called “rind taste” off-flavour. This defect can easily be identified by tasting the cheese at the hoop side. The component(s) responsible for this off-flavour is(are) not eliminated during the manufacture of processed cheese, and can therefore also be felt in the final product. In order to ensure a high quality of the processed cheese, the cheese loaves used as raw material should be carefully treated during the ripening, and the parings should be used either fresh or stored in a freezing room, which slows down the oxidation process.

The volatile compounds from high quality Swiss Emmental cheese have been studied over the period of maturation in the cold room (1–3). The aim of the current study was to find out if the “rind taste” off-flavour is due to volatile compound(s) and could thus be detected by an “electronic nose” for on-line quality control and/or a GC-MS system.

Materials and methods

Samples

Four parings of Swiss Emmental cheese were examined: two with and two without “rind taste” off-flavour supplied from two factories.

Electronic nose

The “electronic nose” used was a NST 3320 (Nordic Sensor Technologies AB, Linköping, S) equipped with 10 MOSFET and 12 MOS sensors.

The parameter settings were as follows: samples: 2.00 ± 0.002 g of grated cheese; vials: 30 ml; carrier gas: ambient air; gas flow rate: 70 ml/min; measuring time: 30 s; system clean up: 20 min; standby temperature: 14°C; standby time: 20 min; incubation temperature: 50°C; incubation time: 20 min; syringe purge: 10 s.

As the water content of the samples may vary, a second experiment was performed with addition of 5 ml water to each vial.

Samples from factory one were measured three times for each experiment. Samples from factory two were measured six times for the first experiment and three times for the second experiment. The response of the sensor, defined as the last 30% of the *sample* phase minus the *baseline* value, was used for PCA analyses.

Gas chromatography

A cheese suspension was prepared by mixing 20 g finely grated cheese with 80 g cold water (10°C) using a high speed homogeniser (Polytron PT 3000 equipped with a PT-DA 3020s cutting system, Kinematica) running at 10 000 rpm for 1 min.

The measurements using the gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) system were performed with a purge-and-trap preconcentration technique. The instrument used was a Tekmar LSC 3100 (Cincinnati, OH, USA) equipped with a n° 8 trap, containing a mixture of Carbosieve SIII (0.05 g) and Carbopack B60/80 (0.2 g), set with the following parameters: sample: 10 g of cheese suspension; sparger: 25 ml non-fritted; purge gas: nitrogen 99.95%; prepurge: 1 min; purge: 15 min at 45°C; dry purge: 10 min; purge flow rate: 30 ml/min; desorb preheat: 240°C; desorb: 4 min at 240°C; bake: 5 min at 260°C; valve: 150°C; line: 150°C; mount: 60°C; cryo focus temperature: -140°C; cryo inject: 1 min at 225°C.

The gas chromatograph (GC) was a Hewlett-Packard 5890, Series II with the following parameter settings: column: SPB-1 sulfur (Supelco) 30 m×0.32 mm id., film thickness: 4 µm; carrier gas: helium; gas flow: 1.6 ml/min; pressure: 40 kPa;

injection temperature: 45°C; temperature program: 13 min at 45°C, heating rate 5°C/min to 240°C, 5 min at 240°C.

The mass spectrometric (MS) detector was a HP 5972 operating in the scan mode (TIC) from 19 to 250 amu at 2.9 scan/s, ionisation by EI at 70 eV by autotuning; MS-Scan after 4.0 min.

Results and discussion

Electronic nose measurements

A difference could be observed when samples, with and without off-flavour, coming from the same factory were compared. However, when samples from both factories were pooled, a difference between good and tainted samples could no longer be observed (fig. 1).

Although the water content of the samples was not measured, the difference observed within a single factory could have been related to this component rather than to the off-flavour compound(s). To avoid this problem, water was added to the samples, so that this parameter was identical for all samples. The result obtained was

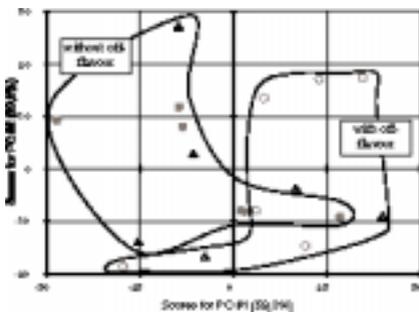


Figure 1 Tentative discrimination between Emmental with (empty symbols) and without (full symbols) off-flavour, coming from two different factories, triangles = factory 1 and circles = factory 2

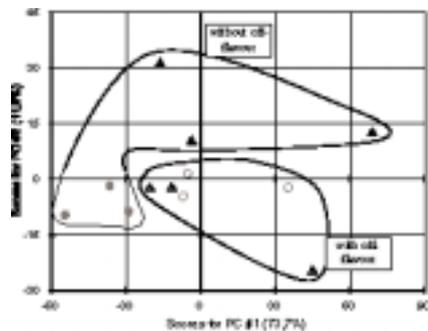


Figure 2 Tentative discrimination between Swiss Emmental cheese with (empty symbols) and without (full symbols) off-flavour, coming from two different factories, triangles = factory 1 and circles = factory 2.

Caption: Water was added to the samples in order to have the same water content in the samples

not better, which means that the NST3320 system was not able to detect this type of off-flavour (fig. 2).

At least three explanations are possible for this result: i) the instrument is not sensitive enough for the compounds responsible for this “rind taste” off-flavour; ii) these compounds were not volatile enough and therefore were not present in the headspace; iii) a too low repeatability leading to a large scattering of the measurements.

GC-MS analyses

In order to gather more information about the components generating this off-flavour, GC-MS analyses were performed on the same samples (fig. 3).

The comparison of chromatograms with and without off-flavour revealed differences for the following compounds: 2-butanone, dimethyldisulfide, propyl propanoate, 1-hexanol, limonene, 2-nonanone and 2-undecanone. None of these compounds can, however, be related to this flavour defect, only to a difference in the stage of ripening between the two cheeses. The volatile off-flavour compounds

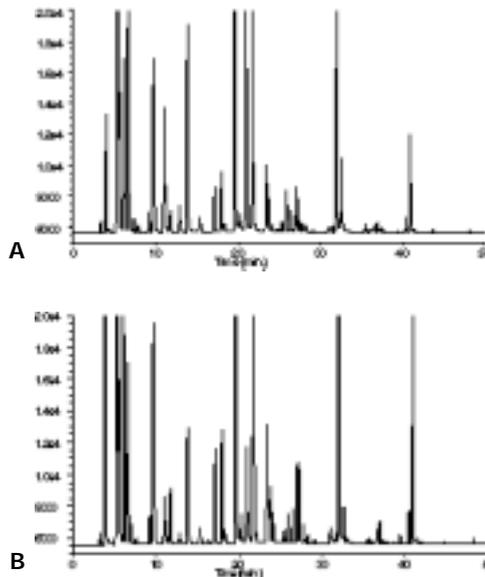


Figure 3 Chromatograms of Swiss Emmentaler cheese without off-flavour, A, and with “rind taste” off-flavour, B. The differences observed were: 2-butanone (1), dimethyldisulfide (2), propyl propanoate (3), 1-hexanol (4), limonene (5), 2-nonanone (6) and 2-undecanone (7)

usually induced by a beta- or a photo-oxidation of unsaturated fatty acids, i.e. alkanals, alkenals, alkanones and some aliphatic hydrocarbons, were not detected in the tainted cheeses. The other volatiles were the same as those found in good quality Swiss Emmental cheese.

A further investigation carried out in another laboratory did not show any 2,4,6- and 2,4,5-trichlorophenol, 2,3,4,6-tetrachlorophenol or pentachlorophenol in the tainted cheese (detection limit: < 0.005 mg/kg). In any case chlorphenols would not result from oxidation.

Conclusion

The NST3320 system was not able to detect the off-flavour called "rind taste" in Swiss Emmental cheese. The analyses with GC-MS did not show any significant differences between tainted and untainted samples other than those due to the stage of maturity. No unusual suspicious compound could be identified in the cheese with off-flavour. The failure with these two techniques leads us to think that this taint could be related to compounds with very low volatility or to non-volatile compound(s). The fact that this defect is not detected by the human nose, but only by the taste, tends to confirm this explanation. The phenol compounds can also be excluded at least at concentrations higher than 0.005 mg/kg. Further analyses are needed to identify the component(s) responsible for the "rind taste" off-flavour.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr *M. Morgenthaler* (Gerber Käse AG, Thun), Dr *W. Schär* (Tiger Käse AG, Langnau i. E.) and Mrs *Gerda Urbach* (Highett, Australia) for their valuable comments and the reviewing of the manuscript.

Summary

During the packaging process, the Swiss Emmental cheeses are cut into rectangular pieces and packed. The round parts of the blocks called "parings" are used in processed cheese production. During the ripening of the cheese loaves used as raw material and/or storage of "parings", an off-flavour called "rind taste" can develop. The compound(s) responsible for this defect was investigated using an "electronic nose" based on sensor technology and a GC-MS instrument. No difference could be detected between tainted and untainted cheese. The "rind taste" off-flavour is therefore unlikely to be related to compounds of high or medium volatility. It is also possible that the compound(s) responsible has (have) a very low flavour threshold.

Zusammenfassung

Emmentalerkäse wird in Verpackungsbetrieben entrindet, in rechteckige Stücke geschnitten und verpackt. Die runden Abschnitte der Laibe, die sogenannten Randstücke, werden für Schmelzkäse verwendet. Bei der Reifung der als Ausgangsmaterialien verwendeten Käselaiibe oder/und der Zwischenlagerung solcher Randstücke

vor dem Schmelzen kann der typische Fehler «Rindengeschmack» auftreten. Mit Hilfe einer «elektronischen Nase» mit Sensortechnologie und einem GC-MS wurde nach den verantwortlichen Geschmackskomponenten gesucht. Zwischen Stücken mit oder ohne Fremdgeschmack konnte kein Unterscheid festgestellt werden. Der «Rindengeschmack» ist sehr wahrscheinlich nicht auf die stark oder mittelflüchtigen Komponenten zurückzuführen. Es ist auch möglich, dass diese Komponente(n) einen sehr niedrigen Aromaschwellenwert aufweist(en).

Résumé

Dans les usines d'emballage, les fromages Emmental sont d'abord écroutés, puis coupés en morceaux rectangulaires avant d'être emballés. Les parties rondes, appelées «talons», des meules sont utilisées pour la fabrication de fromages fondus. Pendant l'affinage des meules utilisées comme matière première pour la fabrication des fromages fondus et/ou pendant le stockage de ces talons, un défaut de goût dit «goût de croûte» peut se développer. Le(s) composé(s) responsable(s) de ce défaut a(ont) été étudié(s) à l'aide d'un «nez électronique» basé sur la technologie des capteurs, ainsi qu'avec un GC-MS. Aucune différence n'a pu être détectée entre des fromages avec et sans défaut. Les composés très ou moyennement volatils ne sont donc pas à l'origine du «goût de croûte». Il est également possible que ce(s) composé(s) présente(nt) un seuil de perception très faible.

Key words

Off-flavour, Swiss Emmental cheese, Electronic nose, GC-MS, Ripening, Parings

References

- 1 Bosset, J.O., Gauch, R., Mariaca, R. and Klein, B.: Comparison of various sample treatments for the analysis of volatile compounds by GC-MS: Application to the Swiss Emmental Cheese. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **86**, 672–698 (1995).
- 2 Bosset, J.O., Bütikofer, U., Gauch, R. and Sieber, R.: Reifungsverlauf von in Folien verpacktem Emmentaler Käse mit und ohne Zusatz von *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. II. Gaschromatographische Untersuchung einiger flüchtiger, neutraler Verbindungen mit Hilfe einer dynamischen Dampfstrahlanalyse. *Lebensm.-Wiss.-Technol.* **30**, 464–470 (1997).
- 3 Rychlik, M., Warmke, R. and Grosch, W.: Ripening of Emmental cheese wrapped in foil with and without Addition of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. III. Analysis of character impact flavour compounds. *Lebensm.-Wiss.-Technol.* **30**, 471–478 (1997).

Corresponding author: Dr. J.O. Bosset, Swiss Federal Dairy Station, Liebefeld, CH-3003 Berne, E-mail: jacques-olivier.bosset@fam.admin.ch

Schweizerische Gesellschaft für Lebensmittelhygiene

Die Schweizerische Gesellschaft für Lebensmittelhygiene (SGLH) hat sich im Interesse der öffentlichen Gesundheit die Förderung einer hygienisch sicheren Ernährung, die Bearbeitung fachspezifischer Anliegen der Lebensmittelhygiene sowie den Erfahrungsaustausch unter den Mitgliedern zur Aufgabe gemacht.

Diese Ziele sucht die SGLH mit der Durchführung von jährlichen Arbeitstagen und Fachkursen, durch Schaffung und Förderung von Arbeitsgruppen zur Behandlung aktueller Probleme der Lebensmittelhygiene und mit der Erarbeitung von Vorschlägen für Normen und Beurteilungskriterien mikrobiologischer Untersuchungen zu erreichen.

Den Jahrestagungen sind jeweils Themen aus dem Bereich der Lebensmittelhygiene gewidmet, vor allem Fragen der hygienischen Behandlung von Lebensmitteln, der modernen mikrobiologischen Diagnostik und der Bekämpfung von Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen.

Die SGLH zählt nahezu 550 Mitglieder. Zu ihnen gehören insbesondere Vertreter der gewerblichen und industriellen Lebensmittelproduktion, Mitglieder schulischer Einrichtungen sowie Mitarbeiter der Überwachungsbehörden.

Der Mitgliederbeitrag beträgt Fr. 50.– für Einzelmitglieder und Fr. 200.– für Kollektivmitglieder.

Die «Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene» sind das offizielle Publikationsorgan der SGLH. Der Preis für das Abonnement ist im Mitgliederbeitrag inbegriffen.

Werden auch Sie Mitglied der SGLH

durch Ausfüllen und Einsenden des untenstehenden Anmeldetalons an das Sekretariat der SGLH, Postfach 9066, CH-8050 Zürich

Anmeldung als Mitglied der SGLH

Der (die) Unterzeichnete ersucht um Aufnahme als Einzelmitglied/Kollektivmitglied in die Schweizerische Gesellschaft für Lebensmittelhygiene.

Name: _____ Vorname: _____

Beruf: _____

Privatadresse:* _____

Firma:* _____

Datum: _____ Unterschrift: _____

* bitte Zustelladresse ankreuzen

Société suisse d'hygiène des denrées alimentaires

La Société suisse d'hygiène des denrées alimentaires (SSHDA) œuvre dans l'intérêt de la santé publique en promulguant la sécurité hygiénique des aliments, en informant sur les questions actuelles de l'hygiène des denrées alimentaires et en favorisant les échanges d'expériences entre ses membres.

La SSHDA assure la poursuite de ces buts par des journées de travail, des cours techniques, ainsi que la création et l'encouragement de groupes de travail destinés à l'analyse des problèmes actuels et à l'élaboration de propositions de normes et de critères d'appréciation pour les analyses microbiologiques alimentaires.

Les journées de travail sont consacrées à des thèmes d'actualité de l'hygiène des denrées alimentaires, avant tout dans les domaines du traitement hygiénique des denrées alimentaires, des méthodes modernes du diagnostic microbiologique et de la lutte contre les intoxications et infections d'origine alimentaire.

La SSHDA compte près de 550 membres. Parmi eux se trouvent en particulier des représentants de l'industrie alimentaire et de la production alimentaire artisanale, des membres d'institutions de formation professionnelle, ainsi que de nombreux collaborateurs des instances officielles de surveillance.

La cotisation annuelle s'élève à frs 50.- pour les membres individuels et à frs 200.- pour les membres collectifs.

Les «Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène» constituent l'organe officiel de la SSHDA. Le prix de l'abonnement est inclus dans le montant de la cotisation.

Vous aussi pouvez devenir membre de la SSHDA

en remplissant le bulletin d'inscription figurant ci-dessous et en le renvoyant au Secrétariat de la SSHDA, Case postale 9066, CH-8050 Zurich

Inscription en qualité de membre de la SSHDA

Le/La soussigné(e) demande son admission à la Société suisse d'hygiène des denrées alimentaires en qualité de membre individuel/collectif

Nom: _____ Prénom: _____

Profession: _____

Adresse postale:* _____

Employeur:* _____

Date: _____ Signature: _____

* Cochez l'adresse à laquelle le courrier doit être envoyé, l'adresse privée ou professionnelle.