

**Flüssigchromatographische Bestimmung von
ortho-Tyrosin
- Nachweis der γ -Bestrahlung proteinreicher Lebensmittel**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

aus dem
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
-Abteilung Lebensmittelchemie-
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Wolfgang Hein
aus Hamburg

Hamburg 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1995 bis Juni 2000 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. Hans Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie - Abt. Lebensmittelchemie - angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Bredehorst

Tag der mündlichen Prüfung: 8. September 2000

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart danke ich für die Überlassung des Themas und seine unendliche Geduld.

Herrn Dr. Thomas Simat danke ich für seine stetige Diskussionsbereitschaft und die großartige Unterstützung, die er mir zu Teil werden ließ.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart und Frau K.aty Zunker, Frau Ilka Vogel, Herrn Guido Janeke und Herrn Hanko G. Mierendorff.

Der Firma Beiersdorf AG in Hamburg Moorburg danke ich für die Bestrahlung der Proben.

Meinen lieben Eltern

Abkürzungsverzeichnis

λ_{Ex}	Anregungswellenlänge
λ_{Em}	Emissionswellenlänge
BSTFA	Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
C	Konzentration
C_{gem}	gemessene Konzentration
C_{Ziel}	Zielkonzentration
Citronensr.	Citronensäure
EC	Elektrochemische Detektion
Em	Emission
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
Essigsr.	Essigsäure
EtOH	Ethanol
Ex	Anregung
FAA	Free Amino Acids
FAO	
FG	Frischgewicht
Fl	Fluoreszenz
GC	Gaschromatographie
HPLC	High-Performance Liquid-Chromatography
IAEA	International Atomic Energy Agency
ID-Nr.	Identifikationsnummer
IPC	Ionenpaar-Chromatographie
IPR	Ionenpaar-Reagenz
kD	Kilo Dalton
kGy	Kilo Gray
KOH	Kaliumhydroxid
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie

MW	Mittelwert
n.n.	nicht nachweisbar
NMP	N-Methylpiperidin
NWG	Nachweisgrenze
ODS	Octadecylsilan
PE	Polyethylen
Phe	Phenylalanin
RP	Reversed Phase
SPE	Solid Phase Extraction
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TL	Thermolumineszenz
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
VF	Verdünnungsfaktor
p.A.	zur Analyse

1 Einleitung	10
2 Ausgangssituation der o-Tyr-Analytik	15
3 Zielsetzung	21
4 Theoretische Grundlagen	22
4.1 Lebensmittelbestrahlung	22
4.1.1 Primär-Effekt der Bestrahlung	24
4.1.2 Sekundär-Effekt der Bestrahlung	25
4.2 Freie Aminosäuren in Organismen	27
5 Material und Methoden	28
5.1 Phenylalanin	28
5.2 Nordseegarnelen	28
5.2.1 Bestrahlung und Dosimetrie	30
5.3 HPLC	31
5.4 Detektion	32
6 Verfahrensentwicklung und Validierung	34
6.1 HPLC	34
6.1.1 Trennsysteme	34
6.1.2 Detektionsmethode	37
6.2 Verfahren zur Cytosolgewinnung	39
6.2.1 Homogenisierung - Aufschluß der Zellen	39
6.2.2 Ultrafiltration	40
6.2.3 Lösungsmittelfällung	40
6.2.4 Lagerung des Cytosols	41
6.3 Validierung des Verfahrens	41
7 Untersuchung g bestrahlter Proben	43
8 Untersuchung eines kleinen Warenkorbes	46
9 Diskussion	48
9.1 Verfahren	48

9.1.1 Isolierung der FAA	48
9.1.2 Chromatographie	49
9.1.3 Detektion	52
9.1.4 Validierung	53
9.2 Dosis-Wirkungs-Beziehung	55
9.3 Hintergrundgehalt von o-Tyr in unbestrahlten Proben	57
9.4 Anwendbarkeit des entwickelten Verfahrens	58
9.4.1 Diskriminierung	59
9.4.2 Spezifität	60
9.4.3 Reichweite	60
9.4.4 Stabilität	61
9.4.5 Zuverlässigkeit	61
9.4.6 Geringe Störanfälligkeit	61
9.4.7 Fälschungssicherheit	62
9.4.8 Unabhängigkeit	62
9.4.9 Praktische Anwendbarkeit	62
9.4.10 Dosisabhängigkeit	62
9.5 Ausblick	63
<u>10 Zusammenfassung</u>	66
<u>11 Summary</u>	68
<u>12 Literatur</u>	70
<u>13 Anhang</u>	80
13.1 Chemikalien	80
13.2 Geräte	81
13.2.1 HPLC	81
13.2.2 Weitere Geräte	81
13.3 HPLC-Bedingungen	82
13.3.1 Trennsystem I	82
13.3.2 Trennsystem II	82
13.4 Reinigung des N-Methylpiperidins	83
13.5 Herstellung der Eluenten	83
13.5.1 Trennsystem I	83

13.5.2 Trennsystem II	83
13.6 Vorbereitung der Nordseegarnelen	84
13.7 Proben für die Verfahrensvalidierung	84
13.8 Gewinnung des Cytosols	85
13.9 UV-Scans	86
13.10 Verfahrensentwicklung und Validierung	88
13.10.1 Grundkalibrierung mit Trennsystem I	88
13.10.2 Matrixkalibrierung mit Trennsystem I	88
13.10.3 Wiederfindung mit Trennsystem I	89
13.10.4 Nachweisgrenze von Trennsystem I	89
13.10.5 Grundkalibrierung mit Trennsystem II	90
13.10.6 Matrixkalibrierung mit Trennsystem II	90
13.10.7 Wiederfindung mit Trennsystem II	91
13.10.8 Nachweisgrenze von Trennsystem II	91
13.11 Untersuchung γ -bestrahlter Proben	92
13.11.1 Messwerte nach Trennung mit Trennsystem I	92
13.12 Untersuchung eines kleinen Warenkorbes	93
13.13 Chromatogramme	94
13.13.1 Chromatogramme einer Standard-Lösung	94
13.13.2 Chromatogramme einer unbestrahlten Garnelen-Probe	95
13.13.3 Chromatogramme einer bestrahlten Garnelen-Probe	96
13.13.4 Chromatogramme einer mit o-TYR dotierten, unbestrahlten Garnelen-Probe	97
13.13.5 Chromatogramme einer "Krabbensuppe"	98
13.13.6 Chromatogramme von "Krabbensalat"	99
13.13.7 Chromatogramme von "Krabbenfleisch"	100

1 Einleitung

Garnelen gelten als eine Delikatesse und sind ein vergleichsweise kostspieliges Lebensmittel - unabhängig davon, ob sie frisch und ungeschält oder als Garnelenfleisch, in „Krabbensuppen“ oder in „Krabbensalaten“ in den Handel kommen. Da die meisten EU-Staaten nicht ausreichend viele Garnelen für ihren Markt produzieren, decken sie ihren Bedarf häufig mit Garnelen aus Südasien, wobei die dort erzeugten Produkte nicht immer den hier geforderten Hygienestandards entsprechen (SSNCEPCS, 1985). Die in der Deutschen Bucht gefangenen Nordseegarnelen (*Crangon crangon*) werden zwar direkt nach dem Fang abgekocht aber dann häufig zum Schalen zunächst nach Polen oder Tunesien verschifft, um erst anschließend auf dem deutschen Markt in den Handel zu kommen (DEUTSCHE SEE, 1997). Um die Gesundheit des Verbrauchers zu schützen und Krankheitsausbrüche durch z.B. Salmonellen zu verhindern, ist die Behandlung mit einem Konservierungsverfahren, das die organoleptischen Eigenschaften der Garnelen nicht verändert, angebracht (EU-KOMMISSION, 1998).

Ein für die Abtötung von pathogenen Keimen und Verderbniserregern anwendbares Konservierungsverfahren ist die Behandlung mit ionisierender Strahlung aus den Radioisotopen ^{60}Co und ^{137}Cs oder Elektronenbeschleunigern (CODEX ALIMENTARIUS, 1983; RADOMSK et al., 1994; THAKUR und SINGH 1994). Die sogenannte Lebensmittelbestrahlung ist ein gründlich untersuchtes Verfahren, bei dem keine schädlichen Effekte auftreten (WHO, 1992). Dabei ist jede Energiedosis, die den gewünschten technologischen Zweck erfüllt, sicher für den Verbraucher (DIEHL et al., 1991). Die Höchstdosis wird allein durch die organoleptischen Eigenschaften des jeweiligen Lebensmittels begrenzt (WHO, 1997).

Trotzdem sind starke Vorbehalte der Verbraucher gegenüber bestrahlten Lebensmitteln anzutreffen (THAKUR und SINGH, 1994; BÖGL, 1998), und ihre Besorgnis Gesundheitsgefahren betreffend, stellt ein Hindernis für die stärkere

Verbreitung des verhältnismäßig neuen Konservierungsverfahrens dar (DEDERER, 1998).

In 41 Staaten ist die Bestrahlung von Lebensmitteln derzeit gestattet (International Atomic Energy Agency (IAEA), 1998) und in 11 Staaten ist die Bestrahlung von Garnelen zugelassen. Dabei sind die erlaubten Höchstdosen und der jeweilige technologische Zweck durch die nationale Gesetzgebung vorgegeben (IAEA 1998) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zulassung der γ -Bestrahlung von Garnelen

Land	Höchstdosis (kGy)	Anwendungszweck	Zulassung
Bangladesch	5	Haltbarkeit, Mikroben-Kontrolle	12.1983
Belgien	5	Mikroben-Kontrolle	11.1988
Frankreich	5	Mikroben-Kontrolle	10.1990
Ghana	2/3/5	Parasiten / Haltbarkeit / Mikroben-Kontrolle	01.1998
Indien	6	Mikroben-Kontrolle	03.1994
Indonesien	7	Mikroben-Kontrolle	02.1995
Kroatien	5	Mikroben-Kontrolle	06.1994
Kuba	3	Haltbarkeit	01.1991
Niederlande	4.5	Mikroben-Kontrolle	08.1992
Pakistan	5	Mikroben-Kontrolle	03.1996
Thailand	5	Mikroben-Kontrolle	12.1986

In Deutschland kommt die restriktive Haltung gegenüber der Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierender Strahlung durch ein generelles Verbot mit Erlaubnisvorbehalt nach §13 LMBG zum Ausdruck. Einzig für Trockengewürze ist die Bestrahlung nach einer Allgemeinverfügung nach § 47a LMBG zugelassen.

Die Lebensmittelbestrahlung nach §1 Lebensmittelbestrahlungsverordnung dient nur zu Kontroll- und Messzwecken.

Im Widerspruch zu deutschem Recht steht der in der Europäischen Union geltende Grundsatz der Warenverkehrsfreiheit, der den freien Verkehr mit Lebensmitteln in der gesamten EU gewährleistet (DEDERER, 1998). Das Prinzip der gegenseitigen Anerkennung, nach dem ein Lebensmittel, das in einem Mitgliedsstaat rechtmäßig hergestellt oder dort in den Verkehr gebracht worden ist, grundsätzlich in jedem anderen Mitgliedsstaat vermarktet werden darf (EUGH, 1979), ist aktuelles Gemeinschaftsrecht. Die angestrebte Angleichung der Rechtsvorschriften in der EU soll durch die Umsetzung zweier sich ergänzender EG-Richtlinien (EG, 1997/1; EG, 1997/2) erfolgen (BUMBERGER und JAHR, 1998).

Um die Einhaltung der unterschiedlichen gesetzlichen Regelungen im Warenverkehr kontrollieren zu können, sind entsprechende Identifizierungsverfahren für bestrahlte Lebensmittel nötig. Ein weiterer Grund für die Notwendigkeit entsprechender Verfahren ist die Qualitätskontrolle beim Bestrahlungsprozeß.

Zahlreiche Arbeiten zum Bestrahlungsnachweis mit physikalischen, chemischen und biologischen Methoden wurden veröffentlicht und in Übersichtsartikeln abgehandelt (HAIRE et al., 1997; STEVENSON, 1994; STEVENSON und STEWART, 1995; GROOTVELD und JAIN, 1989; IBE et al., 1991; GLIDEWELL et al., 1993; DELINCÉE, 1993; SCHREIBER et al., 1993).

Die Messung des ESR-Spektrums, die Messung der Thermolumineszenz (TL) und die Detektion strahleninduzierter Kohlenwasserstoffe wurden für die deutsche amtliche Lebensmittelüberwachung und auf europäischer Ebene normiert (BÖGL, 1998). Für den Nachweis der Bestrahlung von Garnelen wird im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung die TL von mineralischen Verunreinigungen aus den Därmen der Garnelen und das ESR-Spektrum von Schalenteilen untersucht (BGVV, 1998). Für einen Nachweis der γ -Bestrahlung von Garnelenfleisch oder den Produkten daraus wurde bisher kein Verfahren

validiert. Allerdings wird die Untersuchung strahleninduzierter Veränderungen an den aromatischen Aminosäuren als mögliches Nachweisverfahren diskutiert.

Bei der Bestrahlung von Wasser werden OH-Radikale gebildet, die gegenüber aromatischen Aminosäuren höchst reaktiv sind (VON SONNTAG, 1987). So entstehen beispielsweise nach einem Angriff von radiolytisch gebildeten OH-Radikalen auf Phenylalanin (Phe) die drei möglichen Hydroxy-Phe-Isomere p-Tyrosin (Tyr), m-Tyr und o-Tyr (WANG und VON SONNTAG, 1991). In Abbildung 1 wird exemplarisch die Bildung von o-Tyr durch einen Angriff von OH-Radikalen bzw. Elektronen gezeigt.

Aufgrund der Annahme, daß m- und o-Tyr ausschließlich durch Bestrahlung entstehen während p-Tyr physiologisch ist, und da sich o-Tyr wesentlich einfacher chromatographisch von p-Tyr trennen läßt als m-Tyr, haben KARAM und SIMIC (1988) ein Verfahren zur Identifizierung von bestrahltem Hühnerfleisch über den gaschromatographischen Nachweis von o-Tyr vorgeschlagen. Trotz der zunächst vielversprechenden Ergebnisse konnte sich das Verfahren nicht durchsetzen.

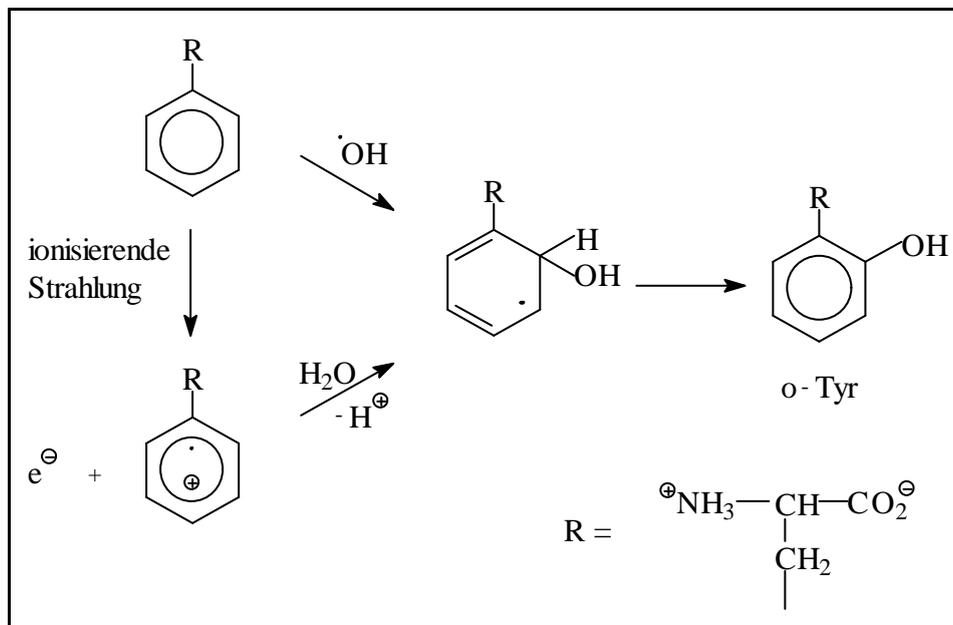


Abbildung 1: Schema der radiolytischen Bildung von o-Tyr

Obgleich *o*-Tyr inzwischen auch in unbestrahlten Lebensmitteln nachgewiesen werden konnte (HART et al., 1988; HOUEE-LEVIN, 1994; MEIER et al., 1989), blieb es als Marker für eine stattgefundene γ -Bestrahlung in der Diskussion. Das häufig beschriebene Vorgehen welches die flüssigchromatographische Bestimmung von *o*-Tyr nach Freisetzung der Aminosäuren durch Säure-Hydrolyse der Proteine beinhaltet, führte bisher nicht zu routinetauglichen Verfahren. Die wesentlichen Ursachen dafür sind der hohe Überschuß an hydrolytisch freigesetztem *p*-Tyr und die durch die Hydrolyse entstehende komplexe Matrix (MEIER, 1998).

Ein neuer Ansatz für den Nachweis der Bestrahlung von Garnelen ist die Untersuchung des *o*-Tyr aus der Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren. Vor allem bei Crustaceen könnte ein derartiges Vorgehen zum Erfolg führen, da der Gehalt freier Aminosäuren hier meist mehrfach höher ist als in Warmblütern (CLAYBROOK, 1983). Die chromatographische Trennung der Tyr-Isomere sollte ohne den kritischen Schritt, der Säure-Hydrolyse der Proteine, besser gelingen als in den bisher publizierten Verfahren.

2 Ausgangssituation der o-Tyr-Analytik

Der Nachweis von strahleninduziertem o-Tyr wurde von KARAM und SIMIC (1988) als Methode für den Nachweis einer Bestrahlung von Hühnerfleisch vorgeschlagen. Während der Analyse wurde das proteingebundene o-Tyr durch eine Säurehydrolyse (6N HCl-Lösung, 110°C, 12h) aus der Proteinmatrix gelöst und nach Derivatisierung mit Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) quantifiziert. Der Gebrauch von Lösungsmitteln während der Probenvorbereitung induzierte jedoch weitere Bildung von o-Tyr, was auch von IBE et al. (1991) berichtet wurde. HART et al. (1988) nahmen an, daß o-Tyr als natürliche Aminosäure in Serumproteinen vorkommt und entfernten diese durch Extraktion mit Wasser. In unbestrahlten Garnelen konnten sie mittels Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) 105 µg/kg o-Tyr als N,O-bis(pentafluorpropionyl)isopropylester nachweisen.

MEIER et al. (1988) nutzten die Methode von KARAM und SIMIC (1988) aber konnten bis 40 kGy kein o-Tyr in Hühnerfleisch nachweisen. Allerdings war es ihnen möglich, durch die Modifikation einer High-Performance Liquid-Chromatography (HPLC)-Methode, die ursprünglich von ISHIMITSU et al. (1986) für die Messung von o-Tyr in Serum entwickelt wurde, eine Alternativmethode zur Bestimmung von o-Tyr in saurem Hydrolysat aus Hühnerfleisch bereitzustellen. Sie nutzten dabei eine Hypersil-5-ODS-Säule und einen neutralen Eluenten mit jeweils 1 % NaCl und MeCN. Die Detektion erfolgte wie bei ISHIMITSU et al. (1988) mittels Fluoreszenz (Fl) ($\lambda_{\text{Ex}} = 275 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 305 \text{ nm}$). Alle folgenden Veröffentlichungen bezogen sich auf die flüssigchromatographische Trennung und folgten in etwa dem von MEIER et al. (1988) vorgegebenen Ablauf, wobei Probenvorbereitung, Hydrolyse, Clean-Up, Trennbedingungen oder Detektion jeweils abgewandelt wurden.

ZOLLER et al. (1993) und ZOLLER (1993) nutzten einen Acetat-Citrat-Puffer mit pH 4.5 und 1 % Ethanol als Eluent. Auch MEIER (1991) verwendete später bei pH 4.5 gepufferte Eluenten und experimentierte mit einer Backflush-Reinigungsprozedur für das stark beanspruchte Trennmaterial. Außerdem ersetzte er die FI-Detektion durch eine elektrochemische Detektion (MEIER, 1993). Durch den Zusatz von Methansulfonsäure während der Hydrolyse traten in den Chromatogrammen weniger Störpeaks auf - die Ergebnisse waren aber zu unpräzise (IBE et al., 1991). CHUAQUI-OFFERMANN und MCDUGALL (1991A; B;) reinigten das Hydrolysat durch RP-18-SPE und probierten alternative Trennmaterialien aus. Auch MISCHKE et al. (1993) testeten verschiedene stationäre Phasen und bedienten sich der Solid Phase Extraction (SPE) bei der erstmaligen Untersuchung von bestrahlten Garnelen. Eine sehr gute Trennung des o-Tyr von Störsubstanzen erreichten CHUAQUI-OFFERMANN und MCDUGALL (1993) durch die erneute HPLC-Analyse der nach einer ersten Trennung gesammelten o-Tyr-haltigen Fraktionen von Hühnerfleisch-Hydrolysat. HÄGER (1994) und FRIEDERICI (1995) setzten zur Trennung eine Cyclodextrinsäule ein, wodurch eine Umkehr der Elutionsreihenfolge erreicht werden konnte. Das Trennmaterial stellte sich aber unter den gegebenen Bedingungen wegen der kurzen Lebensdauer als nicht routinetauglich heraus. HELLE et al. (1996) chromatographierten das Hydrolysat von Garnelen unter Zusatz von Octylsulfonat als Ionenpaarreagenz (IPR) zum Eluenten und ANDERLE et al. (1996a) variierten die Säulentemperatur, um bessere Trennergebnisse zu erhalten. Schließlich nutzten KRACH et al. (1997) einen Elektroden-Array-Detektor zur spezifischen Detektion von o-Tyr.

In Tabelle 1 [siehe Seite 17] wird die Literatur zur flüssigchromatographischen Bestimmung von o-Tyr unter besonderer Berücksichtigung der Trennbedingungen zusammengefasst, wobei der Bestahlungsnachweis im Vordergrund steht. Hier sind auch Veröffentlichungen genannt, die im Text nicht erwähnt werden.

Neben den Bestimmungsverfahren für o-Tyr, die zum Bestrahlungsnachweis von Lebensmitteln dienen sollen, wurden vor allem Verfahren entwickelt, die die Bestimmung von o-Tyr als Marker für freie Radikale bei der Erforschung des oxidativen Stresses in der Medizin zum Ziel hatten (KARAM et al., 1991; HALLIWELL et al., 1992; GIULIVI und DAVIES, 1993; GOTZ et al., 1994). Auch diese sind in der Übersichtstabelle mit aufgeführt.

Das meistzitierte Verfahren beinhaltet eine Homogenisierung des Probenmaterials mit anschließender Salzsäure-Hydrolyse im Vakuum, bei einigen Autoren einen Clean-Up-Schritt über SPE, die Trennung der Hydrolysate über RP-HPLC und die nachfolgende FI-Detektion.

Weder wurde eines der auf diesem Schema beruhenden Verfahren bisher zur Routinetauglichkeit gebracht, noch wurde die Validierung eines solchen Verfahrens publiziert. Auf Grundlage der Literaturangaben und eigener nicht veröffentlichter Ergebnisse, können dafür folgende Hauptgründe angegeben werden:

- kurzes „Säulenleben“ wegen starker saurer Injektionslösungen
- Schwierigkeiten bei der Chromatographie durch komplexe Matrix
- Schwierigkeiten bei der Chromatographie durch hohen p-Tyr-Überschuß
- teilweise hoher o-Tyr-Gehalt unbestrahlter Proben
- schlecht reproduzierbare Ergebnisse zum Hintergrundgehalt an o-Tyr in unbestrahlten Proben
- zu geringe Spezifität

Als gemeinsame Ursache der angegebenen Probleme kann die Hydrolyse mit Salzsäure angesehen werden. Bei den dabei angewandten drastischen Bedingungen (Temperatur zwischen 110 °C und 150 °C, pH < 0, über mehrere Stunden) entsteht zum einen eine schwer zu trennende Matrix. Zum anderen

wird aus den Proteinen eine große Menge an p-Tyr frei, wodurch die Trennung des in wesentlich geringerer Konzentration vorkommenden o-Tyr zusätzlich erschwert wird.

Tabelle 1: Flüssigchromatographische Bestimmung von o-Tyr

Autor / Jahr	Probenmaterial	Vorbereitung	Trennphase	Eluent	Detektion
KRACH et al. 1997	Gamelen	Trichloressigsäure (TCA)-Fällung	Inertsil ODS-2, 5 µm	TCA (0.05 M) / MeOH, 95:5, pH 3.4	EC +0.54 V und 0.62 V
ANDERLE et al. 1996	Schwein, Geflügel, Fisch	HCl-Hydrolyse	Grom-Sil ODS, 5 µm	Citrat-Puffer (0.1 M) / MeCN, 99:1, pH 5.6	FI 275/305
HELLE et al. 1996	Gamelen	HCl-Hydrolyse	k. A.	Na-Acetat-Puffer (0.1 M) + Na-Octylsulfonat (0.01 M), pH 3.7	FI 275/305
KRAJNIK et al. 1995	Phe-Lösungen		Sphenisorb ODS-2	Wasser / MeCN, 93:7	UV 210, EC +0.90 V
FRIEDERICI 1995	Fisch, Hühnerfleisch, Gamelen	HCl-Hydrolyse	Nucleodex β-OH	Na-Phosphat-Puffer (0.5 M) / MeCN, 98:2, pH 6.5	FI 275/305
HÄGER 1994	Gamelen	HCl-Hydrolyse	Nucleodex β-OH	Na-Phosphat-Puffer / MeCN, 98:2, pH 6.5	FI 275/305
KAUR und HALLIWELL 1994	Blut, Phe-Lösungen		Nucleosil C18, 5 µm	K-Phosphat-Puffer / MeOH, 90:10, pH 3.0	UV 274
VAN DER VLIET et al. 1994	Phe- und Tyr-Lösungen		Sphenisorb ODS-2	K-Phosphat-Puffer / MeOH, 90:10, pH 4.0	UV 274
CHUAQUI-OFFERMANN et al. 1993	Hühnerfleisch	HCl-Hydrolyse	Hypersil ODS, 5 µm	Phosphat-Puffer (1.5%) / MeCN, 99:1, pH 4.0	FI 275/305
GIESEG et al. 1993	Rinder-Insulin	HCl-Hydrolyse	RP-18	TFA (0.1%) / MeOH, 95:5, pH 2.5	FI 280/320
HELLE et al. 1993	Eier	HCl-Hydrolyse	Hypersil ODS, 5 µm	Li-Citrat-Puffer / EtOH, 99:1, pH 4.3	FI 275/305
MEIER 1993	Hühnerfleisch	HCl-Hydrolyse	Nucleosil ODS, 5 µm Hypersil ODS, 5 µm	K-Phosphat-Puffer (0.2%) / EtOH, 99:1, pH 3.2, NaCl (1%) / EtOH, 99:1, pH 3.5	FI 275/305, EC +0.60 V / +0.35 V
MEIER et al. 1993		HCl-Hydrolyse	Hypersil ODS, 5 µm	Li-Citrat-Puffer / EtOH, 99:1, pH 4.3	FI 275/305
MISCHKE et al. 1993	Gamelen, Eiklar	HCl-Hydrolyse	Hypersil ODS, 5 µm LiChrospher C18, 5 µm	Li-Citrat-Puffer (0.1 M) / EtOH, 99:1	FI 275/305
SUN et al. 1993	Blut		Nucleosil C18, 5 µm	Phosphat-Puffer (0.05 M) / MeOH, 90:10, pH 3.0	UV 274
ZOLLER 1993	Hühnerfleisch	HCl-Hydrolyse	Hypersil ODS, 5 µm	Citrat-Acetat-Puffer 0.06 M / EtOH, 99:1, pH 4.5	FI 275/305
MASKOS und RUSH 1992	Phe- und Tyr-Lösungen		Microsphere 300, C18	Citronensr. (0.03 M) / Essigsr. (0.27 M), 1:1, 1-3% EtOH	FI 275/305

CHUAQUI-OPERMANN und MCDUGALL 1991/1	Hühnerfleisch	HCl-Hydrolyse	Novapak C18, 3 µm Selectosil C18, 5 µm	NaCl (1%) / MeCN, 99:1; Phosphat-Puffer (1%) / MeCN, 99:1, pH 4.0	Fl 275/305
CHUAQUI-OPERMANN und MCDUGALL 1991/1	Hühnerfleisch	HCl-Hydrolyse	Hypersil ODS, 5 µm	Phosphat-Puffer (1.5%) / MeCN, 99:1, pH 4.0	Fl 275/305
IBE et al. 1991	Hühnerfleisch	HCl-Hydrolyse	Hypersil ODS, 5 µm Selectosil C18, 5 µm	NaCl (1.0%) / MeCN, 99:1.9	Fl 270/303
MEIER 1991	Hühnerfleisch	HCl-Hydrolyse	Hypersil ODS, 5 µm	K-Phosphat-Puffer (1%) / EtOH, 985:15, pH 4.5	Fl 275/305
ZOLLER et al. 1993	Hühnerfleisch	HCl-Hydrolyse	Hypersil ODS, 5 µm	Citrat-Acetat-Puffer 0.06 M / EtOH, 99:1, pH 4.5	Fl 275/305
FUKAMI et al. 1990	Rinder-Chromaffin		Partisphere SCX	Na-Acetat-Puffer (0.01 M), pH 3.5	Fl 274/304
ISHIMITSU et al. 1990	Phe- und Tyr-Lösungen		Cosmosil ODS, 5 µm	Essigsäure (0.17 M) / NaCl (0.17 M), 1:1	Fl 275/305
BROWN et al. 1989	Blut	Fällung	µBondapak C18	NaCl (0.1%) / MeCN, 99:1, pH 3.0 mit Essigsäure.	Fl 275/305
ISHIMITSU et al. 1989	Rattennrin		Cosmosil ODS, 5 µm	NaCl (0.1%) / MeCN, 99:1, pH 3 mit Essigsäure.	Fl 275/305
MEIER et al. 1989	Hühnerfleisch	HCl-Hydrolyse	Hypersil ODS, 5 µm	NaCl (1%) / MeCN, 99:1	Fl 275/305
FARAHANI und SIMIC 1988	Phe-Lösungen		Supelcosil SPLC-8- DB	A: TFA (0.1%), B: TFA (0.1%) in MeCN, A / 0.4 % B / min	Fl 275/305
HOSKINS und DAVIS 1988	Phe-Lösungen		µBondapak C18	NaCl (0.1%) / MeCN, 99:1, pH 3.0 mit Essigsäure.	Fl 275/305
ISHIMITSU et al. 1988			Cosmosil ODS, 5 µm	Phosphat-Puffer (0.1 M), pH 2.0	Fl 275/305
KAUR et al. 1988	Leghämoglobin		Anachern S5 ODS-2	Na-Citrat (0.03 M) / Na-Acetat (0.277 M) / MeOH, 49:49:2, pH 4.5	EC +0.82 V
FUJIMOTO et al. 1987	Phe-Lösungen	TCA-Fällung	Cosmosil ODS, 5 µm	Essigsäure (1%) / NaCl (1%), 1:1	Fl 275/305
ISHIMITSU et al. 1986	Serum		Cosmosil ODS, 5 µm	Essigsäure (1%) / NaCl (1%), 1:1	Fl 275/305

EC = Elektrochemische Detektion

Fl = Fluoreszenz-Detektion

UV = Ultraviolet-Detektion

3 Zielsetzung

Primäres Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Validierung einer schnell durchführbaren und zuverlässigen Methode zur quantitativen Bestimmung von o-Tyr aus der Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren aus Nordseegarnelen. Diese Methode soll dazu dienen, eindeutig unterscheiden zu können, ob Garnelen mit γ -Strahlen behandelt wurden oder nicht.

Im Rahmen der Methodenentwicklung sollten auf folgende Fragestellungen näher eingegangen werden:

Welche Möglichkeiten gibt es für die schonende Isolierung der Fraktion nicht proteingebundener Aminosäuren aus Garnelen?

Wie gelingt die flüssigchromatographische Trennung von o-Tyr in Gegenwart eines hohen Überschusses an p-Tyr? Welches Detektionsverfahren ist für einen Nachweis von nicht proteingebundenem radiolytisch entstandenem o-Tyr empfindlich und spezifisch genug?

Die Untersuchung von mit γ -Strahlen behandelten Garnelen sollte Aufschluß über die Dosis-Wirkungs-Beziehung bei der radiolytischen Hydroxylierung von Phe geben. In diesem Zusammenhang sollte die Frage nach der Möglichkeit einer Dosimetrie beantwortet werden.

Ein weiterer Gegenstand der Untersuchungen war die Klärung der Frage nach dem Vorkommen von o-Tyr in unbestrahltem Material. Es sollte überprüft werden, ob es sich dabei um Aufarbeitungsartefakte oder einen natürlichen Hintergrundgehalt handelt.

Durch die Quantifizierung von o-Tyr in ausgewählten Handelsprodukten (kleiner Warenkorb) sollte die Anwendbarkeit der entwickelten Bestimmungsmethode geprüft und die Höhe des möglichen Hintergrundgehaltes ermittelt werden.

Die ermittelten Werte sollten mit einem ebenfalls validierten Referenzsystem, das noch zu entwickeln war, überprüft werden.

4 Theoretische Grundlagen

4.1 Lebensmittelbestrahlung

Bereits seit 1957 wird die Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierender Strahlung kommerziell betrieben (THAKUR und SINGH 1994).

Tabelle 2 zeigt, für welche Zwecke und mit welchen erlaubten Maximaldosen die Bestrahlung gegenwärtig eingesetzt wird (IAEA 1998, BFE 1995).

Tabelle 2: Anwendung der Lebensmittelbestrahlung

Anwendungszweck	Dosisbereich (kGy)
Keimhemmung	bis 0.05 - 0.15
Reifungsverzögerung	0.25 - 1.0
Insekten- und Parasitenbekämpfung	0.15 - 1.0
Pasteurisierung / Verlängerung der Haltbarkeit	1.0 - 5.0
Verbesserung der technischen Eigenschaften	2.0 - 7.0
Quarantäne-Behandlung / Desinfektion	1.0 - 10
Sterilisierung	10 - 100

Der Zweck der Bestrahlung und die angewandte Dosis variieren zum Teil erheblich und die Effekte überschneiden sich; so wird z.B. bei der Bekämpfung von Insekten in Kartoffeln auch deren Keimung gehemmt.

Eine Übersicht der für kommerzielle Zwecke in den Ländern der Welt bestrahlte Produkte zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3: Bestrahlte Produkte für kommerzielle Zwecke (aus ICGFI 1999)

Land	Produkte
Argentinien	Gewürze, Kakaopulver, Spinat
Bangladesch	getrockneter Fisch, Hülsenfrüchte, Kartoffeln, Zwiebeln
Belgien	gefrorene Lebensmittel, getrocknetes Gemüse, Gewürze
Brasilien	Früchte, Gemüse, Getreide, Gewürze
Chile	Getrocknetes Gemüse, Gewürze, Kartoffeln, Zwiebeln
China	Äpfel, Birnen, Bohnensoße, Chilies, gesalzenes Szechuan-Gemüse, geschnittenes Fleisch, getrocknete Litchi, getrocknetes Rindfleisch, Gewürze, Gewürzsoße, Ingwer, Kartoffeln, Knoblauch, Reis, Schnaps aus Süßkartoffeln, Szechuan-Wurst, Tomaten, Würstchen, Zangchan-Ente, Zwiebeln
Dänemark	Gewürze
Deutschland	Gewürze
Finnland	Gewürze
Frankreich	Froschschenkel, gefrorene entbeinte Hühner, gefrorene Garnelen, Gemüsewürzen, getrocknete Früchte, Gewürze
Großbritannien	Gewürze
Indonesien	Gewürze, Reis
Iran	getrocknete Früchte, Gewürze, Nüsse
Israel	Gewürze, trockene Zutaten, Würzen
Italien	Gewürze
Japan	Kartoffeln
Jugoslawien	Gewürze
Kanada	Gewürze
Korea (Republik)	Aloe-Produkte, Enzym-Produkte, getrocknete Pilze, getrockneter Fisch, getrocknetes Fleisch, getrocknetes Gemüse, Ginseng-Produkte, Hefe, Muschelpulver, Sojabohnenpastenpulver, Sojasoßenpulver, Stärke, Trockenwürze
Kroatien	getrocknetes Rindfleisch, Gewürze, Lebensmittelzutaten, Nudeln
Kuba	Bohnen, Kartoffeln, Zwiebeln
Mexiko	Gewürze, trockene Lebensmittelzutaten
Niederlande	Eipulver, Garnelen, Geflügel, gefrorene Produkte, getrocknete Gemüse, Gewürze, Verpackungsmaterial
Norwegen	Gewürze
Südafrika	Eiprodukte, Erdbeeren, Erdnussbutter, Fisch, frische Gemüse, Früchte, Gelee, getrocknete Würstchen, getrocknetes Casein, haltbare Fleischprodukte, haltbare Lebensmittel, Hefe, Honigprodukte, Kartoffeln, Knabberartikel, Knoblauch, Mangos, Marinaden, Nüsse, Papayas, Rindfleisch, Säuglingsnahrung, Soja-Mischungen, Suppen, Tee, Trockengemüse, verarbeitete Lebensmittel
Thailand	Enzyme, fermentierte Schweinewürste, Gewürze, Zwiebeln
Tschechien	Gewürze, trockene Lebensmittelzutaten
Ungarn	Enzyme, Gewürze, Zwiebeln
USA	Früchte, Geflügel, Gemüse, Gewürze, tropische Früchte

Gemäß CODEX ALIMENTARIUS (1984) sind für die Bestrahlung von Lebensmitteln drei unterschiedliche Strahlungsarten zugelassen:

Strahlung aus γ -Anlagen:

- ^{60}Co , künstlich hergestellt aus ^{57}Co - es werden zwei γ -Quanten mit einer Energie von 1.17 MeV und 1.33 MeV emittiert
- ^{137}Cs , aus Kernspaltung - es wird ein γ -Quant mit einer relativ niedrigen Energie von 0.66 MeV emittiert

Maschinenstrahlung (Strahlung aus Linearbeschleunigern):

- Elektronen (α -Strahlung) - mit einer auf 10 MeV begrenzten Energie (um Aktivierung des Bestrahlungsgutes auszuschließen)
- Röntgenstrahlen (Sekundärstrahlung aus Elektronenbeschleuniger) mit einer auf 5 MeV begrenzten Energie.

Die Wirkung der Bestrahlung beruht überwiegend auf der Deaktivierung von Enzymen und auf der Veränderung von Nucleinsäuren (BFE 1995).

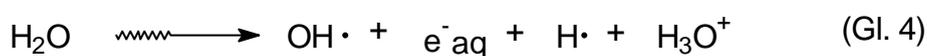
4.1.1 Primär-Effekt der Bestrahlung

Wenn Lebensmittel mit ionisierender Strahlung behandelt werden, führt die absorbierte Energie (\equiv Energie-Dosis [Gy]) zu bestimmten Effekten bei Atomen oder Molekülen. So werden durch den Compton-Effekt Elektronen freigesetzt, die, abhängig von ihrer kinetischen Energie, zur Ionisierung (Gl. 1), zur Spaltung (Gl. 2) oder nur zur Anregung (Gl. 3) eines Moleküls führen (THAKUR und SINGH 1994).



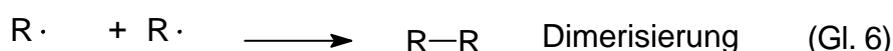
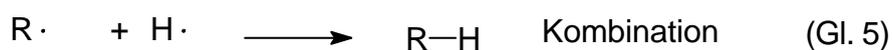
Die Primär-Effekte können unspezifisch jedes Molekül betreffen - es gibt dabei keine Präferenzen. So kann auch ein mit ionisierender Strahlung behandeltes Phe-Molekül durch die Abstraktion eines Elektrons ionisiert werden (Abbildung 2). Das Cyclohexadienyl-Radikal, ein Produkt des Primär-Effektes, bildet bei Reaktion mit Wasser, das in vielen Lebensmitteln als Hauptbestandteil vorkommt, dann die vier möglichen Hydroxy-Phe-Radikale (Abbildung 1).

Auch das Wasser absorbiert Strahlungsenergie und wird radiolytisch gespalten, wobei im wesentlichen die folgenden Radiolyseprodukte auftreten (DRAGNIC und DRAGNIC 1963; VON SONNTAG 1987; DODD 1995):



4.1.2 Sekundär-Effekt der Bestrahlung

Die durch den Primär-Effekt der ionisierenden Bestrahlung gebildeten freien Radikale sind sehr reaktiv und können untereinander oder mit den Lebensmittelinhaltsstoffen reagieren, was zu den Sekundär-Produkten der Bestrahlung führt. Die dabei entstandenen Spezies können wie folgt weiterreagieren:



Hydroxyl-Radikale als primäre Radiolyseprodukte des Wassers wirken stark oxidativ. Besonders reaktiv sind sie gegenüber ungesättigten Verbindungen und solchen mit aromatischen Ringen (KARAM und SIMIC 1989; WANG et al. 1993).

Beim Angriff eines OH-Radikals auf Phe kommt es zur Addition an den aromatischen Ring, was zu den oben erwähnten vier möglichen Zwischenprodukten (Abbildung 2) führt. Drei von ihnen (1, 2, 3) führen zur Bildung von

Hydroxy-Phe. Die Ipso-Form (4) führt zu unbekanntem Produkten (WANG et al. 1993).

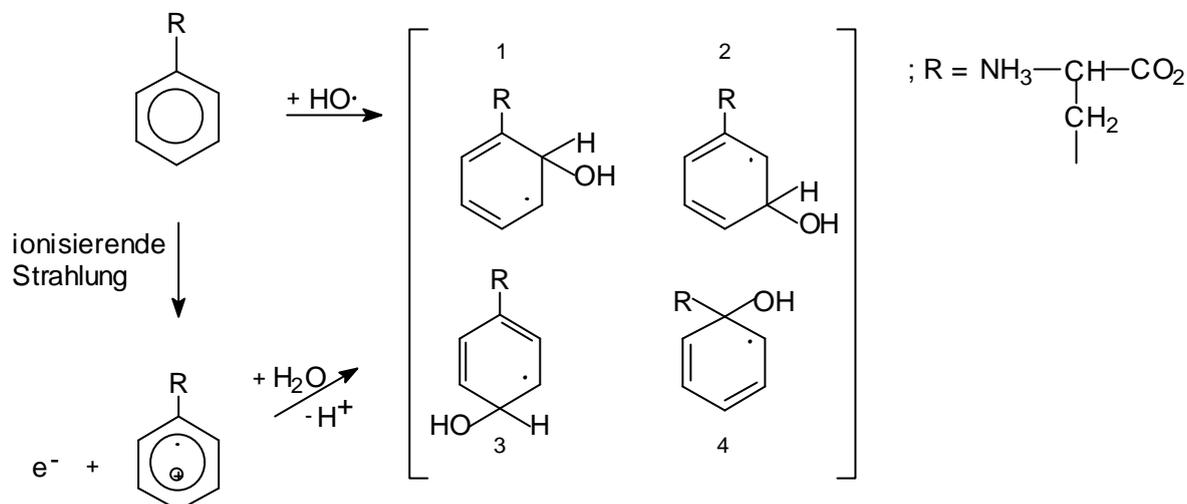


Abbildung 2: Bildung der Hydroxy-Phe-Radikale durch Primär- und Sekundär-Effekt

Die Neutralisierung der Hydroxy-Phe-Radikale aus Primär - und Sekundär-Effekt erfolgt durch Oxidation beliebiger Art (Abbildung 3) und es entstehen o-Tyr, m-Tyr und p-Tyr (WANG und VON SONNTAG 1991).

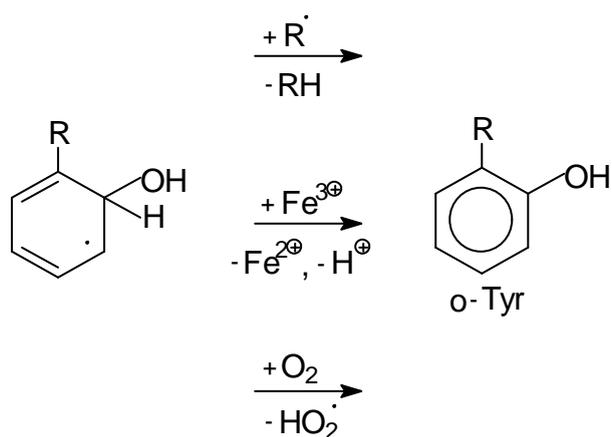


Abbildung 3: Oxidation des o-Hydroxy-Phe-Radikals zu o-Tyr

Die Menge der bei der Bestrahlung entstehenden Tyr-Stellungsisomere und ihr Verhältnis hängen von zahlreichen Parametern ab, wobei pH-Wert der

Umgebung und das Vorhandensein von Oxidantien - besonders von Sauerstoff - die größte Rolle spielen (VON SONNTAG 1987, WANG und VON SONNTAG 1991, WANG et al. 1993).

Bei niedrigen pH-Werten kommt es bei nicht proteingebundenen Aminosäuren auch zur Decarboxylierung - die Abgabe von CO₂ kann zum Bestrahlungsnachweis genutzt werden (FURUTA et al. 1997).

4.2 Freie Aminosäuren in Organismen

Da Proteine in lebenden Organismen einer ständigen Umsetzung unterliegen, befinden sich proteingebundene und nicht proteingebundene Aminosäuren (Free Amino Acids = FAA) in einem dynamischen Gleichgewicht. Da alle 20 proteinogenen Aminosäuren bei der Proteinbiosynthese benötigt werden, müssen all diese im FAA-Pool vorhanden sein. Die Konzentration an FAA ist, abhängig von Spezies und Gewebe, intrazellulär wesentlich höher als extrazellulär (ULRICH 1990). Einer Quantifizierung der FAA oder einzelner nicht proteingebundener Aminosäuren muß also ein effektiver Zellaufschluß vorangehen. Jede quantitative Bestimmung von FAA in Organismen kann allerdings nur einen Zeitquerschnitt der Fließgleichgewichte erfassen.

In Vergleich zu den Geweben von Wirbeltieren ist der FAA-Gehalt in den meisten Crustaceen um ein Vielfaches höher. Der große Pool an organischen Anionen - einschließlich FAA - wird wegen des auffallenden Defizits an anorganischen Anionen in marinen Crustaceen zur Aufrechterhaltung der osmotischen Balance benötigt (CLAYBROOK 1983). Tabelle 4 zeigt den Gehalt an nicht proteingebundenem Phe und p-Tyr in einigen Crustaceen.

Tabelle 4: FAA-Gehalt einiger Crustaceen (CLAYBROOK 1983), (µg/g FG)

	Calanus finmarchicus	Neomysis integer	Meganyctip h. norvegica	Carcinus maenas	Cancer magister	durchsch n. Gehalt
Phe	280.8	99.1	66.1	115.6	198.2	150
Tyr	434.9	145.0	181.2	271.8	181.2	240

5 Material und Methoden

5.1 Phenylalanin

Phe kommt in zahlreichen Proteinen zu 4–8 % vor und gehört zu den für den Menschen essentiellen Aminosäuren. Pro Tag ist die Zufuhr von etwa 2.2 g Phe zur Bedarfsdeckung nötig, wobei ein Mangel größtenteils durch Tyr ausgeglichen werden kann. Phe wird im menschlichen Körper mittels Phe-4-hydroxylase zu Tyr abgebaut. Ein genetisch bedingtes Fehlen des Enzyms führt zur Stoffwechselstörung Phenylketonurie - der Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure im Harn.

In Geweben und Körperflüssigkeiten von Crustaceen ist Phe zu etwa 1 mol% vorhanden (ULRICH 1990).

5.2 Nordseegarnelen

Die Nordseegarnele (*Crangon crangon* L.1758) (systematische Klassifizierung: Tabelle 5) ist eine besonders häufige Art der Fauna des Wattenmeers und wird wegen ihres Geschmacks und ihres ernährungsphysiologischen Wertes kommerziell genutzt.

Tabelle 5: systematische Klassifizierung der Nordseegarnele

systematische Stufe	lateinische Bezeichnung	deutsche Bezeichnung
Stamm	Arthropoda	Gliederfüßer
Klasse	Crustacea	Krebstiere
Unterklasse	Malacostraca	Höhere Krebse
Überordnung	Eucarida	
Ordnung	Decapoda	Zehnfußkrebse
Unterordnung	Natantia	garnelenartige Langschwanzkrebse
Überfamilie	Crangonoida	

Familie	Crangonidae	
Gattung	Crangon crangon	Nordseegarnele, Granat

Da Garnelen besonders leicht verderblich sind, werden sie sofort nach dem Fang abgekocht.

Die Zusammensetzung des essbaren Anteils von Nordseegarnelen ist in Tabelle 6 zusammengefasst dargestellt (SOUCI et al. 1994).

Im Muskelfleisch enthält *Crangon crangon* etwa 10.7 $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht an nicht proteingebundenen „seltenen Aminosäuren“ inklusive Phe und Tyr - und 315.0 $\mu\text{mol/g}$ Gesamt-FAA (WEBER und VAN MARREWIJK 1972).

Tabelle 6: Ausgewählte Inhaltsstoffe von Nordseegarnelen in g/100 g eßbarem Anteil

	Wasser	Protein	Fett	Phe	Tyr
Nordseegarnele	78.4	18.6	1.4	0.88	0.65

Zur Untersuchung eines „kleinen Warenkorbs“ wurden die Proben aus den vier am häufigsten im Handel anzutreffenden Garnelen-Produkten ausgewählt. Die Proben-Identifikationsnummer, Produktart und Hersteller, sowie die Art der Verpackung der zur Untersuchung ausgewählten Proben sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Proben des "kleinen Warenkorbs"

Proben ID-Nr.	Produktart und Hersteller	Verpackung
01	Büsumer Krabbensuppe, Feinkostfabrik Jürgen Langbein GmbH	Vollkonserve
02	Old Commercial Room Original Hamburger Krabbensuppe	Vollkonserve

04	Frische, gekochte, entschälte Nordseekrabben, Großhandel - Nordsee	Bedientheke
05	Nordseekrabbensalat, Beeck Feinkost GmbH & CoKG	Bedientheke
06	Nordseekrabbensalat, Mayo Feinkost GmbH	Fertigpackung
07	Nordseekrabben, gekocht, geschält, Merl GmbH & CoKG	Fertigpackung
08	Nordsee-Krabben-Salat, Nadler-Feinkost GmbH	Fertigpackung
09	frische, gekochte, entschälte Nordseekrabben	Fertigpackung
11	Krabbensalat Nordsee, Voss Feinkost und Lebensmittel GmbH	Fertigpackung
12	Krabbensalat Nordsee, Popp-Feinkost GmbH	Fertigpackung
13	frische ungeschälte	Bedientheke

5.2.1 Bestrahlung und Dosimetrie

Zur Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung bei der radiolytischen Bildung von o-Tyr wurden frische Nordseegarnelen mit Zieldosen von 1, 3 und 5 kGy bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte in einer Blutbestrahlungsanlage IBL-437C (CIS-Isotopendiagnostik), die von der Firma Beiersdorf AG zu Forschungszwecken eingesetzt wird. Die Anlage arbeitet mit einer ^{137}Cs -Strahlenquelle, mit der eine Dosisrate von 11.7 Gy/min erreicht wird.

Die tiefgekühlten Garnelen befanden sich während der Bestrahlung in Polyethylen (PE)-Beuteln, die mit Kühlelementen bei niedrigen Temperaturen gehalten wurden. Ein Auftauen der Proben während des Bestrahlungsprozesses konnte allerdings damit nicht verhindert werden.

Die von den Proben absorbierte Dosis wurde mit „Amber-Perspex“-Dosimetern, Plättchen aus Polyacrylmetacrylat (Acrylglas), gemessen. Die Dosimeter wurden für eine gleichmäßige Messung der Dosis während der Bestrahlung zwischen den Proben verteilt plaziert. Nach der Bestrahlung wurde die farbliche Veränderung der Dosimeter photometrisch gemessen. Aus den

erhaltenen Werten wurde mittels einer Kalibrierkurve, die gegen genormte Alanin-Dosimeter aufgenommen wurde, die genaue Strahlendosis berechnet.

5.3 HPLC

Die Trennung stark ionogener Substanzen, zu denen auch die Tyr-Isomere zählen, ist ein Sonderfall in der RP-HPLC. Freie Silanolgruppen innerhalb der stationären Phase wirken sich dabei störend auf das Trennergebnis aus. Sie treten überall dort auf, wo das Trägermaterial - Kieselgel - nicht vollständig mit dem Derivatisierungsreagenz, das später die eigentliche RP-Phase bildet, reagiert hat. Da dies grundsätzlich bei allen Silicagel basierten RP-Materialien der Fall ist, werden die freien Silanolgruppen durch ein „Endcapping“ zu belegen versucht. Aber auch Endcapped-Säulen lassen noch polare Wechselwirkungen zwischen ionischem Analyten und freien Silanolgruppen zu. Um gute Trennergebnisse zu erzielen, gilt es, diese störenden Wechselwirkungen zu verhindern.

Dies kann durch Absenken des pH-Wertes durch Zugabe einer Puffersäure zum Eluenten erreicht werden: Negativ geladene Gruppen des Analyten können so neutralisiert werden. Bei Tyr wird das Gleichgewicht zwischen dissoziiert und undissoziiert in Richtung der undissoziierten neutralen Form verschoben [Abbildung 4].

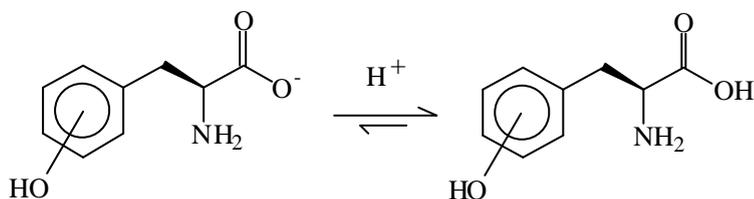


Abbildung 4: Gleichgewicht dissoziiertes Tyr und undissoziiertes Tyr

Dabei sollte der pH-Wert aber nicht kleiner als 2 sein, da es sonst unter anderem zur Hydrolyse der stationären Phase, also dem Ablösen der RP-Phase vom Träger kommt.

Wenn der Analyt unter den gewählten Bedingungen eine positive Ladung aufweist, wie es bei einem niedrigen pH-Wert des Eluenten wegen der Ammonium-Gruppe für die Tyr-Isomere zutrifft, ist die Nutzung eines negativ geladenen IPR möglich. Trifluoressigsäure (TFA), die häufig bei der Trennung von Aminosäuren eingesetzt wird (FARAHANI und SIMIC, 1988; GIESEG et al., 1993, SIMAT 1996) könnte gleichzeitig als Ionenpaarbildner und als Säure fungieren.

Ein anderer Weg zur Vermeidung der genannten Wechselwirkungen ist die Verwendung basisch wirkender Stoffe zum Eluenten. Die polaren Silanolgruppen des Trennmaterials werden so teilweise unpolar und würden keine störenden Wechselwirkungen hervorrufen. Der pH-Wert des Eluenten sollte nicht größer als pH 8 sein, da darüber das Kieselgel des Trennmaterials zu hydrolysieren beginnt.

Auch unter basischen Bedingungen wäre die Bildung eines neutralen Ionenpaares möglich, da das Gleichgewicht zwischen Tyr und dem Tyr-Anion in Richtung der dissoziierten Form mit der negativ geladenen Carboxyl-Gruppe verschoben wird. Als ein bei den gewählten Bedingungen positiv geladenes IPR, das gleichzeitig als Pufferbase nutzbar ist, wurde N-Methylpiperidin (NMP) eingesetzt.

5.4 Detektion

Nach einer flüssigchromatographischen Trennung der Phe-Radiolyseprodukte sind zahlreiche unterschiedliche Methoden der Detektion ohne vorherige Derivatisierung denkbar. Eine mögliche Variante ist die einfache und robuste UV-Detektion der Tyr-Isomere.

Aufgrund der Oxidierbarkeit der Tyr-Isomere bietet sich auch die elektrochemische Detektion (RIZZO und D'ERIL, 1991) als zusätzliche

Detektionsmethode an. HARRIMAN (1987) berichtet von einem Redoxpotential von 1220 mV für Tyr in saurer (pH 2) wässriger Lösung.

Eine weitere von zahlreichen Autoren (ISHIMITSU et al., 1986; GLIDEWELL et al., 1993) beschriebene Detektionsmethode für Tyr-Isomere ist die F1-Detektion bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 275$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{Em}} = 305$ nm.

6 Verfahrensentwicklung und Validierung

6.1 HPLC

6.1.1 Trennsysteme

Da bei der Chromatographie komplexer Matrices die Gefahr gegeben ist, durch Koelution von Störsubstanzen mit dem Analyten zu hohe Meßergebnisse zu erhalten, ist die Verifikation mit einem unabhängigen Referenzsystem angebracht.

Die Trennbedingungen wurden in der Weise variiert, daß neben dem primären Trennsystem ein Referenzsystem mit stark abweichenden chromatographischen Bedingungen zustande kam.

Bei der Auswahl der Trennbedingungen wurden die Parameter Säulenmaterial, Eluenten-Zusammensetzung (Puffer, pH-Wert, IPR, organischer Modifier) und Säulentemperatur variiert. Für die Entwicklung beider Trennsysteme wurden Lösungen von p-Tyr, m-Tyr und o-Tyr unterschiedlicher Konzentration in Salzsäure (0.1 mol/L) und mit den Analyten dotierte Blindproben - Cytosol aus unbestrahlten Garnelen - eingesetzt.

Die Trennung der Tyr-Isomere im sauren Milieu gelang mit einem Eluenten mit 0.1 % TFA in bidestilliertem Wasser ohne organischen Modifier am besten. Versuche mit dotierten Blindproben zeigten, daß bereits eine Zugabe von 5 % MeCN eine deutliche Verschlechterung der Trennung verursachte. Die Dauer einer Trennung erhöhte sich ohne organischen Anteil wegen der geringeren Elutionskraft des Eluenten um etwa 15 Minuten gegenüber der Trennung mit einem Eluenten, der 5 % MeCN enthielt. Der o-Tyr-Peak wurde allerdings nur so - ohne zugesetzten Modifier - von allen Störpeaks getrennt [siehe Abbildung 5].

Durch den Einsatz eines 3- μm -Trennmaterials konnte eine deutlich verbesserte Trennung gegenüber Trennmaterialien mit einer Partikelgröße von 5 μm erreicht werden. Allerdings führte dies in Verbindung mit der hohen Viskosität des

Eluenten ohne Modifier zu einem zu hohen Säulenrückdruck von ca. 350 bar. Die Säulentemperatur wurde von anfänglich 25 °C auf 35 °C erhöht, um den Druck während der Trennung zu senken. Diese Temperaturerhöhung bewirkte eine deutliche Minderung des Säulenrückdrucks auf ca. 240 bar (bei 1 mL/min) und damit auch eine längere Lebensdauer des Trennmaterials.

Das resultierende Trennsystem wird im Folgenden mit "Trennsystem I" bezeichnet.

[Anhang - 13.3.1] [Anhang - 13.5.1]

Für eine Trennung im basischen Milieu wurde NMP als Pufferbase und IPR eingesetzt. Da NMP nur in der Qualität "zur Synthese" kommerziell erhältlich war, mußte es vor dem Einsatz im Eluenten durch Destillation über KOH gereinigt werden [Anhang - 13.4].

Die Trennung der Tyr-Isomere mit Eluenten mit einem pH-Wert zwischen 8 und 11 wurde untersucht. Bei einem pH-Wert von 9.0 wurden die besten Trennergebnisse auf einem basenstabilen Trennmaterial erzielt. Auch hier führte jede Zugabe von organischem Modifier zu einer Verschlechterung der Trennung. Die Säulentemperatur wurde, wie bei der Verwendung von Eluent I, bei 35 °C gehalten.

Das resultierende Trennsystem wird im Folgenden mit "Trennsystem II" bezeichnet.

[Anhang - 13.3.2] [Anhang - 13.5.2]

Für beide Trennsysteme wurde ein Spülschritt mit 40 % Acetonitril nach jedem Probenlauf etabliert.

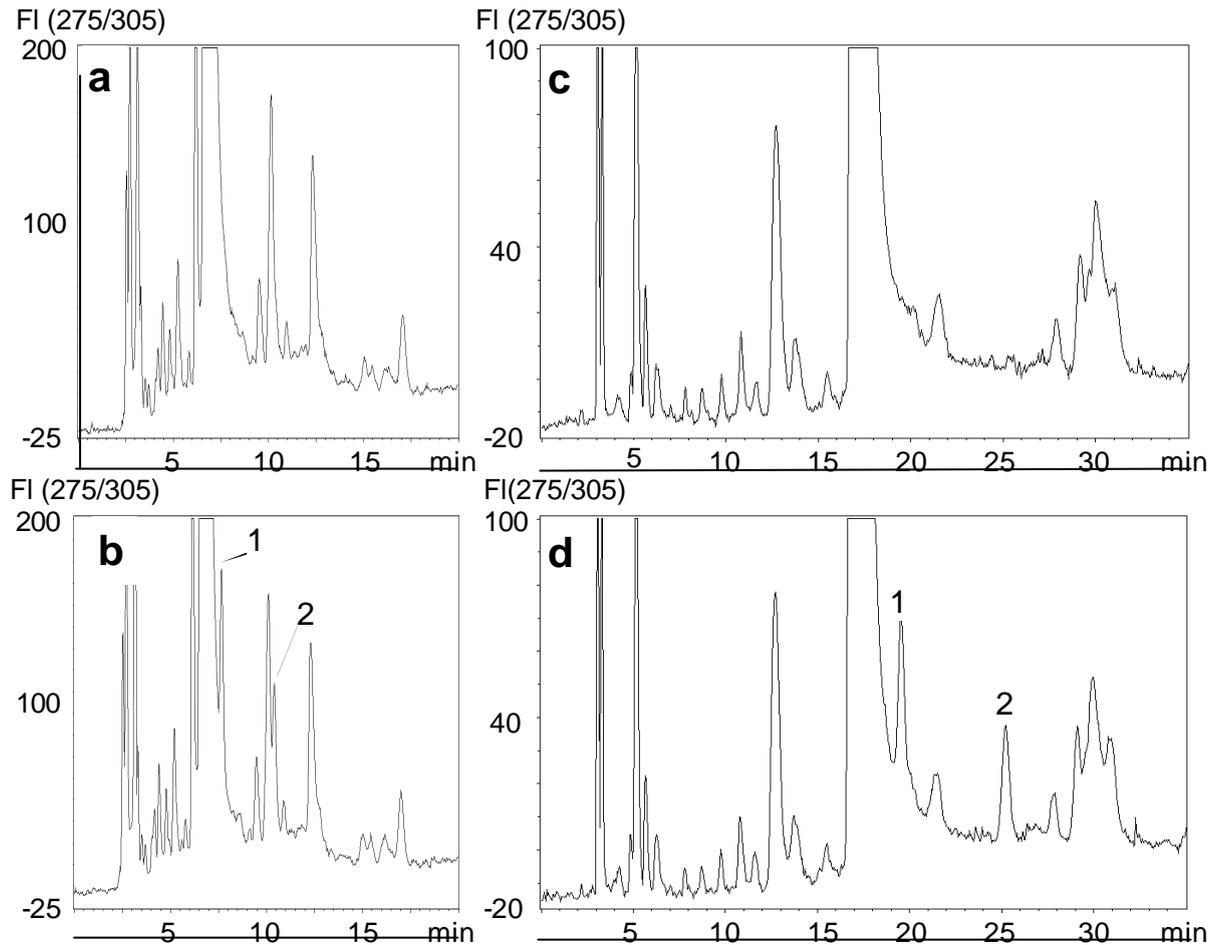


Abbildung 5: HPLC-Chromatogramme von Garnelen-Cytosol; Eluent I, a: mit 5 % MeCN im Eluenten, b: wie a aber dotiert mit m-Tyr (1) und o-Tyr (2), c: ohne organischen Modifier, d: wie c aber dotiert mit m-Tyr (1) und o-Tyr (ca. 150 ng/mL)

6.1.2 Detektionsmethode

Nach einer flüssigchromatographischen Trennung der Phe-Radiolyseprodukte sind zahlreiche unterschiedliche Methoden der Detektion ohne vorherige Derivatisierung denkbar.

UV-Detektion und FI-Detektion aus der Reihe der spektrometrischen Methoden und amperometrischer Detektion aus der Reihe der elektrochemischen Methoden wurden untersucht.

UV-Scans von wässrigen Tyr-Lösungen zeigten, daß die Absorptionsmaxima der drei stellungsisomeren Tyrosine jeweils zwischen 273.0 und 274.6 nm liegen [Anhang - 13.9]. Für die Detektion im Konzentrationsbereich um 0.1 mg/L, der für die Untersuchung bestrahlter Garnelen-Proben relevant ist, reichte die Empfindlichkeit der UV-Detektion allerdings nicht aus.

Bei amperometrischer Detektion aus einer wässrigen TFA-Lösung (0.1 %) wurden die höchsten Responsefaktoren für o-Tyr in bei einem Potential von 1150 mV erzielt. Bei diesem Potential war die amperometrische Detektion empfindlicher als die FI-Detektion. Da aber zahlreiche andere Substanzen ebenfalls oxidiert wurden, war die elektrochemische Detektion mit nur einer Elektrode nicht spezifisch genug. Ein Elektrodenarray-Detektor, mit dem ein spezifischerer Nachweis möglich gewesen wäre, stand nicht zur Verfügung.

FI-Spektren der Tyr-Isomere in saurer, wässriger Lösung (0.1 % TFA) zeigten die in Tabelle 8 dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 8: Fluoreszenz der Tyr-Isomere

	o-Tyr	m-Tyr	p-Tyr
λ_{\max} Anregung [nm]	269.5	269.5	271.5
λ_{\max} Emission [nm]	305.5	317.5	311.5

Die Anregungs- und die Emissionswellenlänge wurden so gewählt, daß o-Tyr mit höchster Empfindlichkeit neben m-Tyr und p-Tyr detektiert werden konnte ($\lambda_{\text{Ex}} = 275 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 305 \text{ nm}$).

Wegen der hohen Empfindlichkeit und der, verglichen mit den anderen geprüften Detektionsmethoden, überlegenen Selektivität wurde für die weiteren Untersuchungen die FI-Detektion gewählt [Anhang - 13.3].

Die pH-Abhängigkeit der FI-Intensität wurde durch Messung der FI von o-Tyr in wässrigen Lösungen mit pH-Werten zwischen pH 1.0 und pH 10.8 ermittelt. Der pH-Wert wurde jeweils mit einer kalibrierten pH-Einstab-Meßkette kontrolliert. Die Lösungen mit pH-Werten zwischen 7.5 und 10.6 wurden mit Phosphatpuffer, die Lösungen mit pH-Werten zwischen 1 und 2 mit TFA bzw. HCl hergestellt.

Abbildung 6 zeigt das Ergebnis der Untersuchung. Die Fluoreszenzintensität näherte sich bei pH 7.5 dem Maximum - daher wurde diese Intensität im Diagramm als Maximum (100%) angegeben. Messungen im Bereich zwischen pH 2 und pH 7.5 wurden nicht durchgeführt, da dieser pH-Bereich für die gewünschten chromatographischen Eigenschaften nicht infrage kamen. Die Ergebnisse wurden bei der Wahl der Eluenten berücksichtigt.

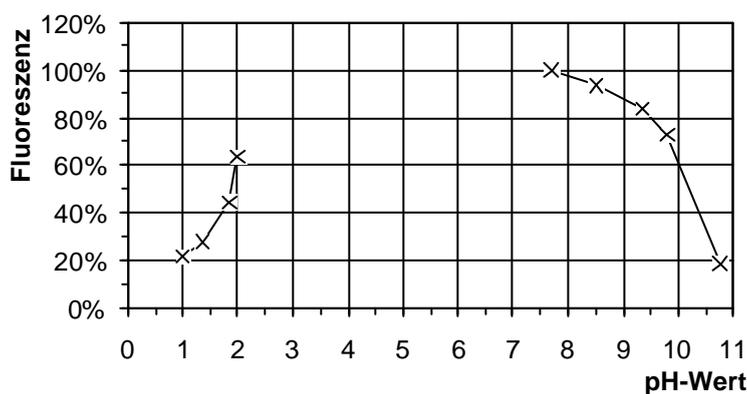


Abbildung 6: FI-Intensität von o-Tyr in Abhängigkeit vom pH-Wert des Lösungsmittels; ($\lambda_{\text{Ex}} = 275 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 305 \text{ nm}$)

6.2 Verfahren zur Cytosolgewinnung

Zur Gewinnung des Cytosols aus Garnelen wurde ein Verfahren entwickelt, das im wesentlichen die folgenden Schritte umfaßt: Vorzerkleinerung des Probenmaterials (Garnelenfleisch), Homogenisierung und Zerkleinerung der Zellen, Abtrennung von Zellfragmenten, und Isolierung der freien Aminosäuren. Dabei wurde besonderer Wert darauf gelegt, daß im aufgearbeiteten Cytosol möglichst keine Reste der zur Aufarbeitung genutzten Chemikalien zurückbleiben sollten. Die üblichen Fällungsmethoden für Proteine durch Zusatz von Schwermetallsalzen, anorganischen Säuren, wie Perchlorsäure oder organischen Säuren, wie Sulfosalicylsäure wurden daher nicht angewandt.

6.2.1 Homogenisierung - Aufschluß der Zellen

Die Vorzerkleinerung der noch tiefgekühlten, geschälten Garnelen wurde mit einer Moulinette durchgeführt. Für die Homogenisierung wurde zum einen ein Glas-Homogenisator und ein Dispergier-Gerät (Ultra-Turrax) eingesetzt. Es wurde jeweils vorzerkleinertes Garnelenfleisch in Salzsäure (0.1 mol/L) verarbeitet.

Die vollständige Homogenität wurde im Glas-Homogenisator nach 2 bis 3 Minuten erreicht. Danach mußte die Probe aus dem Homogenisator verlustfrei in ein weiteres Gefäß überführt und der Glaskolben und der Glasbehälter vollständig gereinigt werden.

Bei Nutzung des Ultra-Turrax konnte die Homogenisierung direkt in den Zentrifugenröhrchen durchgeführt werden. Die Bearbeitungszeit mit dem Ultra-Turrax betrug bei den gewählten Bedingungen jeweils 30 Sekunden. Mit beiden Geräten wurde eine ausreichende Homogenität und ein vollständiger Zellaufschluß erreicht. Ein Vergleich der Chromatogramme von nach beiden Methoden aufgearbeiteten Proben zeigten keine Unterschiede.

Für die folgenden Arbeiten wurde der Ultra-Turrax als Homogenisator gewählt.

Nach der Homogenisierung erfolgte jeweils eine Sedimentation durch Zentrifugation bei $5500 \times g$. Dabei wurden noch intakte Zellen, Zellkerne und andere größere Partikel entfernt. Es resultierte ein klarer, leicht rosa gefärbter Überstand und ein vom Überstand klar abgetrenntes Pellet.

6.2.2 Ultrafiltration

Zur Abtrennung kleinerer Zellfragmente und Organellen sowie größerer Moleküle, die die Chromatographie stören könnten, wurde der nach der Homogenisierung und Zentrifugation erhaltene Überstand zunächst durch einen Membranfilter (0.2- μm -Poren) und dann durch einen Ultrafilter mit der Ausschlußgrenze 10 kD filtriert. Aus 400 μL Lösung wurden nach 6-stündiger Zentrifugation etwa 200 μL Filtrat erhalten. Das Filtrat wurde direkt zur chromatographischen Trennung eingesetzt.

Nach anfänglichen guten Ergebnissen kam es zu Problemen bei der Chromatographie. Die Filtrate enthielten noch zu große Mengen an Störsubstanzen, die das Trennmateriale nach nur wenigen Injektionen verstopften. Die Gewinnung des Cytosols durch die Anwendung von Ultrafiltern allein wurde daher als ungeeignet angesehen.

6.2.3 Lösungsmittelfällung

Zur weiteren Reinigung des Zellextraktes nach der Homogenisierung wurde eine Fällung mit Aceton und MeCN eingesetzt. Weiterhin wurde geprüft, ob der Zusatz von Aceton bereits bei der Homogenisierung Vorteile bringt.

Dem klar zentrifugierten Zellextrakt wurden 80 % Aceton zugefügt, was zu einer sofort sichtbaren Fällung führte. Nach zweistündiger Kühlung bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde erneut zentrifugiert und vom Rückstand dekantiert. Das Aceton wurde anschließend mit einem Stickstoffstrom abgeblasen. Zur restlosen Entfernung des Acetons wurde das Cytosol gefriergetrocknet und letztlich in Salzsäure-Lösung (0.1 mol/L) gelöst [Anhang - 13.8]. Das fertig aufgearbeitete Cytosol konnte direkt zur Chromatographie eingesetzt werden. Gelagert wurde es in

Braunglas-Probenfläschchen bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dieses Vorgehen wurde für alle weiterführenden Versuche genutzt.

Die Kenndaten für das Verfahren werden im Abschnitt "Validierung" dargestellt.

Bei der Homogenisierung des Garnelen-Gewebes in einer Mischung aus HCl-Lösung (0.1 mol/L) und Aceton ($20:80\text{ ,v/v}$) kam es zu einer Mitfällung von o-Tyr. Nur etwa 40% des vor der Aufarbeitung addierten o-Tyr wurden wiedergefunden. Daher wurde diese Variante der Aufarbeitung nicht etabliert.

Bei der Nutzung von MeCN an Stelle von Aceton gab es vor allem bei der Entfernung des MeCN nach der Fällung Probleme. Es konnte durch Abblasen mit Stickstoff nicht genügend entfernt werden. Probelösungen mit einem zu hohen Restgehalt an Acetonitril führten bei der Chromatographie zu schlecht reproduzierbaren Trennergebnissen und verzerrten Peakformen.

6.2.4 Lagerung des Cytosols

Frisch aufgearbeitetes Cytosol einer mit o-Tyr dotierten unbestrahlten Garnelen-Probe wurde am Tag der Aufarbeitung und nach Lagerung bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ für zwei Monate untersucht. Es resultierten nahezu identische Chromatogramme. Die Peakflächen von o-Tyr wichen nicht voneinander ab.

Die aufgearbeiteten Cytosole sind somit mindestens 2 Monate lang bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagerfähig.

6.3 Validierung des Verfahrens

Im Rahmen der Validierung wurden die Verfahrenskenndaten des entwickelten Verfahrens, die für die Charakterisierung von Präzision und Richtigkeit nötig sind, ermittelt. Die Validierung wurde sowohl mit dem primären Trennsystem - Trennsystem I - als auch mit dem Referenzsystem - Trennsystem II - durchgeführt. Das Vorgehen war jeweils identisch.

Für die Grundkalibrierung wurden Standardlösungen von o-Tyr mit 4 äquidistanten Konzentrationsstufen je dreimal vermessen. Die resultierenden Kalibrierfunktionen wurden mittels Residualanalyse auf Linearität geprüft.

Aus mit o-Tyr-Standardlösung dotierten Garnelen-Proben wurden die Cytosole für die "Matrixkalibrierung" gewonnen [Anhang - 13.7]. Es wurden ebenfalls je drei Proben mit äquidistanten Konzentrationsstufen vermessen.

Aus den erhaltenen Daten konnten jeweils Verfahrensstandardabweichung und Verfahrensvariationskoeffizient als Kenndaten für die Präzision des Verfahrens ermittelt werden [Tabelle 2].

Zur Berechnung der Wiederfindungsfunktion wurde die Geradengleichung der Grundkalibrierung auf die Peakflächen aus der "Matrixkalibrierung" angewandt. Es zeigten sich für beide Trennsysteme proportional-systematische Abweichungen. Die Wiederfindungsraten lagen bei 65.1 bzw. 66.8% [siehe Tabelle 9].

Die Nachweisgrenze - berechnet über das Signal-Rausch-Verhältnis (2:1)- betrug für Trennsystem I 10.92 µg/L und für Trennsystem II 2.93 µg/L.

Tabelle 9: Verfahrenskennndaten für die Bestimmung von o-Tyr; Trennsystem I und Trennsystem II

Parameter	Trennsystem I	Trennsystem II
Verfahrensstandardabweichung	12.03 µg/kg	13.71 µg/kg
Verfahrensvariationskoeffizient	6.4 %	7.3 %
Wiederfindungsrate	65.1 %	66.8 %
Nachweisgrenze (NWG) (2 × Grundrauschen)	10.92 µg/L	2.93 µg/L

[Anhang - 13.10]

7 Untersuchung β -bestrahlter Proben

Nordseegarnelenfleisch - vorbereitet nach Anhang 13.6 - wurde mit ionisierenden Strahlen behandelt, wobei die absorbierten Strahlendosen bei 1, 3 und 5 kGy lagen. Visuell ließen die bestrahlten Proben sich nicht von unbestrahlten Proben unterscheiden.

Nach dem oben genannten Verfahren [Anhang - 13.8] wurde die Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren aus den bestrahlten Proben und aus einer unbestrahlten Vergleichsprobe extrahiert. Auch die extrahierten Cytosole wiesen keine äußerlich wahrnehmbaren Unterschiede voneinander auf.

Die Extrakte wurden über HPLC mit Trennsystem I und Trennsystem II getrennt und mit FID-Detektion detektiert [siehe Anhang - 13.3]. Der Substanzpeak von o-Tyr wurde durch Vergleich der Retentionszeiten mit Referenzproben und durch Dotierung von Blindproben mit o-Tyr identifiziert.

Die Quantifizierung erfolgte über die während der Validierung erhaltenen Kalibrierfunktionen. Pro Bestrahlungsstufe wurden fünf Proben (Aliquote eines Homogenisates aus 10g Garnelenfleisch) unabhängig voneinander aufgearbeitet und vermessen.

Nach Trennung mit dem Primär-Trennsystem wurden o-Tyr-Gehalte zwischen 12.8 und 690.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht gemessen. Der Mittelwert des o-Tyr-Gehaltes jeder einzelnen Bestrahlungsstufe war jeweils signifikant höher als der Mittelwert des Gehaltes der niedrigeren Bestrahlungsstufe (Varianzanalyse auf 99.9% Signifikanzniveau). Der Anstieg des o-Tyr-Gehaltes verlief in Abhängigkeit von der aufgenommenen Energiedosis annähernd linear - es wurden 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o-Tyr pro kGy aufgenommener Energie gebildet [siehe Abbildung 7].

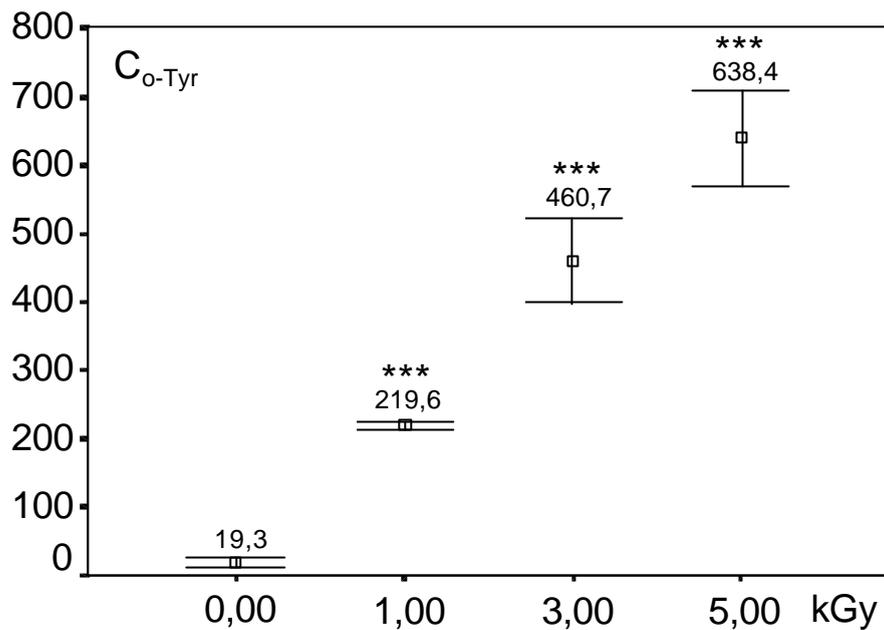


Abbildung 7: Gehalt an nicht proteingebundenem o-Tyr in Abhängigkeit von der Strahlendosis; Trennsystem I; Mittelwert ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bezogen auf Frischgewicht; $n = 5$) und Konfidenzintervall des Mittelwertes ($p = 0.95$); * = signifikanter Unterschied**

Die unter Verwendung von Trennsystem I erhaltenen Ergebnisse wurden durch die Analyse mit Trennsystem II überprüft. Da die Messungen mit der gleichen HPLC-Anlage durchgeführt wurden, mußten die Extrakte bis dahin tiefgekühlt gelagert werden. Eine Veränderung durch die Lagerung konnte ausgeschlossen werden [siehe Kapitel 13.10].

Es wurden o-Tyr Gehalte zwischen 52.6 und 661.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ erhalten. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Bestrahlungsstufen und der annähernd linearer Anstieg der Menge des Radiolyseproduktes konnten bestätigt werden [siehe Abbildung 8].

Die Mittelwerte der o-Tyr-Gehalte der einzelnen Bestrahlungsgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den Meßergebnissen, die mit Trennsystem I erhalten wurden.

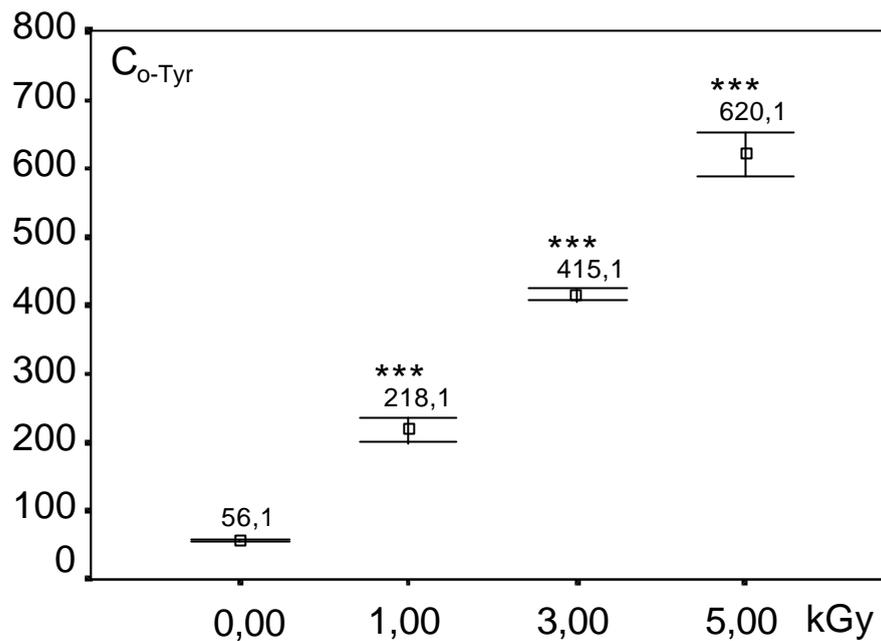


Abbildung 8: Gehalt an nicht proteingebundenem o-Tyr in Abhängigkeit von der Strahlendosis; Trennsystem II; Mittelwert ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bezogen auf Frischgewicht; $n = 5$) und Konfidenzintervall des Mittelwertes ($p = 0.95$); * = signifikanter Unterschied**

Der Mittelwert der o-Tyr-Konzentrationen in den Blindproben lag mit $56 \mu\text{g}/\text{kg}$ signifikant über dem mit Trennsystem I ermittelten. Die Ursache dafür kann eine mit o-Tyr bei den gewählten Bedingungen koeluiierende Störsubstanz sein. Diese Interferenz erschwert die Peakintegration des o-Tyr-Peaks [siehe Anhang - 13.13], sie ist aber bei höheren o-Tyr-Gehalten zu vernachlässigen..

8 Untersuchung eines kleinen Warenkorbes

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des entwickelten Verfahrens auf Proben aus dem Handel und zur Analyse des Hintergrundgehaltes an o-Tyr wurde ein "kleiner Warenkorb" bestehend aus 5 "Krabbensalaten", 2 "Krabbensuppen", 3 Fertigpackungen mit "Krabbenfleisch" und einer Probe ungeschälter frischer Garnelen untersucht.

Aus den Proben wurde nach der Vorbereitung [Anhang 13.6] nach dem oben genannten Verfahren [Anhang - 13.8] die Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren extrahiert. Die Proben wurden jeweils zweimal aufgearbeitet und die Extrakte mit Trennsystem I und Trennsystem II analysiert.

Die Extrakte der Garnelen aus Suppe und Salat zeigten äußerlich deutliche Unterschiede zu den Extrakten aus frischem Garnelenfleisch. Die Extrakte aus den Suppen waren grau gefärbt, konnten aber ohne weitere Arbeitsschritte zur Analyse eingesetzt werden. Extrakte der Garnelen aus Salaten waren etwas blasser gefärbt als die Extrakte frischer Garnelen und zeigten eine sichtbare Fettschicht, die vor der Gefriertrocknung mit einer Pasteurpipette entfernt werden mußte .

Bei Trennung mit Trennsystem I war in 7 Proben kein o-Tyr nachweisbar. In 4 Proben wurden Mittelwerte von 13.1 bis 18.2 µg/kg o-Tyr gemessen.

Durch Dotierung mit o-Tyr konnte ausgeschlossen werden, daß es sich bei einem zunächst irrtümlich als o-Tyr identifizierten, typischerweise in den Garnelen aus "Krabbensalaten" auftretenden großen Substanzpeak um o-Tyr handelte (siehe Abbildung 9).

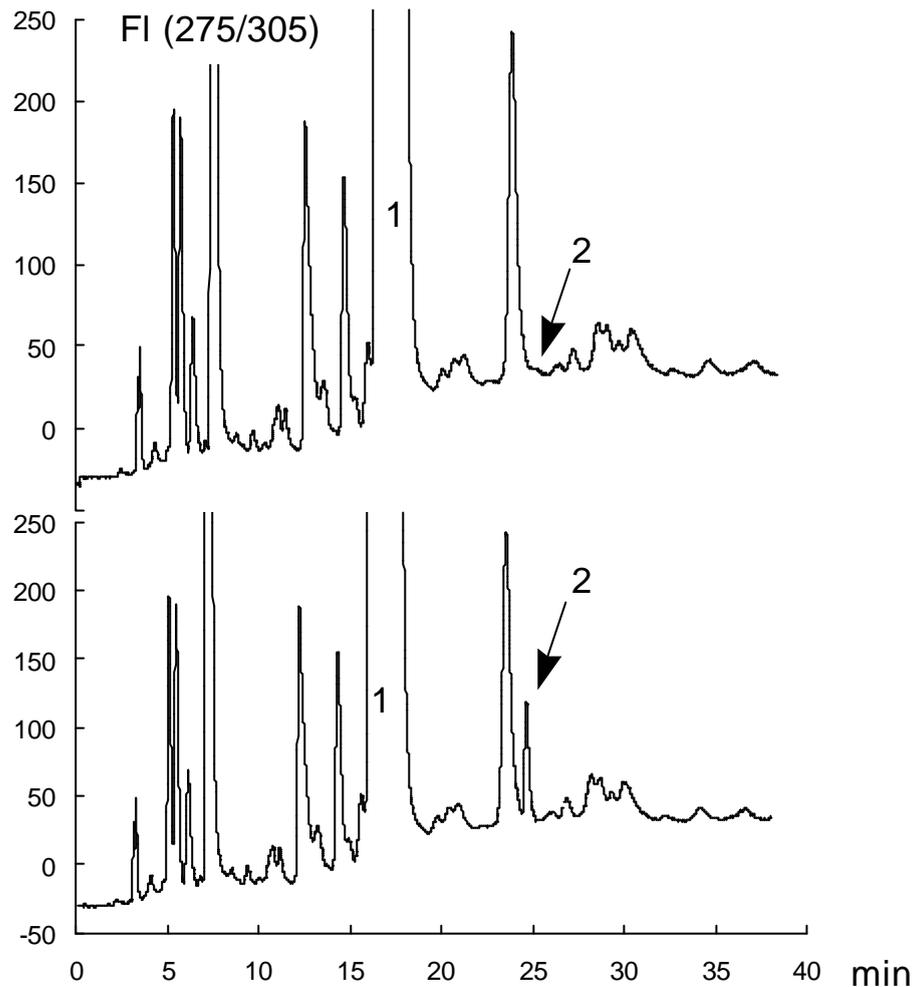


Abbildung 9: Chromatogramme der Fraktion nicht proteingebundener Aminosäuren aus einem "Krabbensalat", Trennsystem I; 1: p-Tyr, 2: o-Tyr; oben: ohne Dotierung; unten: nach der Aufarbeitung dotiert mit o-Tyr

Unter Verwendung von Trennsystem II war in zwei Proben kein o-Tyr nachweisbar. In den anderen Proben lag der Gehalt zwischen 22.20 und 69.39 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Diese erhöhten Messwerte lassen sich durch Koelution einer Störsubstanz mit o-Tyr erklären.

Keine der untersuchten Proben zeigte einen erhöhten Gehalt an o-Tyr, der auf eine stattgefundene Bestrahlung hätte schließen lassen können.

Die Messwerte im Einzelnen sind aufgeführt in Anhang 13.12.

Chromatogramme siehe Anhang 13.3.

9 Diskussion

9.1 Verfahren

Der neue Ansatz zum Nachweis einer stattgefundenen Behandlung mit ionisierenden Strahlen wurde untersucht, weil bisher veröffentlichte Verfahren, mit denen proteingebundenes und nicht proteingebundenes o-Tyr nach einer Säurehydrolyse bestimmt wurden, nicht zum Erfolg geführt haben - siehe Kapitel 2 "Ausgangssituation der o-Tyr-Analytik". Die Anwendung unterschiedlicher Hydrolyse- und Reinigungstechniken führten nie zu einer für eine gute Trennung ausreichend sauberen Probenlösung (HEIN et al. 1997).

Auch der Vorschlag von Karam (KARAM und SIMIC 1990), nur das o-Tyr in der wasserunlöslichen Proteinfraction zu untersuchen, ergab keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

Das entwickelte Verfahren betrachtet das nicht proteingebundene o-Tyr und beinhaltet die Verfahrensschritte Cytosolgewinnung inklusive Homogenisierung des Probenmaterials, Freisetzung des Cytosols aus den Zellen und Isolierung der freien Aminosäuren aus dem Homogenisat und die Chromatographie der Aminosäuren mittels RP-HPLC und FI-Detektion.

9.1.1 Isolierung der FAA

Homogenisierung und Zellaufschluß verlaufen gleichzeitig, wobei ein Ultra-Turrax Dispergiergerät genutzt wird. Ein Zellaufschluß ist nötig, da der größere Anteil der freien Aminosäuren in Crustaceen im Zellinneren vorkommt (ULRICH 1990) - nicht in den Zellzwischenräumen.

Nach der Sedimentation durch Zentrifugation, bei der neben Zellfragmenten und anderen größeren Partikeln auch durch den Einfluß der Salzsäure gefällte Proteine entfernt werden, ist die resultierende Lösung noch nicht zur Chromatographie geeignet. Erst nach der Lösungsmittelfällung mit Aceton resultiert eine proteinfreie und klare Injektionslösung.

Nach der Entfernung des Acetons wird in Salzsäure (0.1 mol/L) aufgenommen. Gegenüber ungepufferten Hydrolysaten, die bei der Aufgabe auf RP-Material zu Problemen führen können (CHUAQUI-OFFERMANN et al. 1993), haben die so erhaltenen Cytosole einen moderaten pH-Wert von ca. 1. Die Stabilität von o-Tyr unter diesen Bedingungen wurde bereits von zahlreichen Autoren gezeigt (DE DUVE und BEAUFEY 1981; HUGGINS et al. 1993). Bei höheren pH-Werten ist o-Tyr in Lösung instabil, (DE DUVE und BEAUFEY 1981; CHUAQUI-OFFERMANN und MCDUGALL 1991) was allerdings nur für eine längere Exposition gilt. Innerhalb der 40 Minuten, die die Probenlösungen mit dem basischen Eluenten während der Trennung in Berührung kommen, konnte kein Abbau von o-Tyr beobachtet werden.

9.1.2 Chromatographie

An ein Verfahren für die Trennung und Bestimmung der Tyr-Isomere aus einer komplexen Matrix werden besondere Anforderungen gestellt, was durch die im Kapitel 2 geschilderten Probleme der publizierten Verfahren, die überwiegend auf RP-HPLC beruhen, deutlich gezeigt wird.

Wie Arbeiten von Ishimitsu (ISHIMITSU et al. 1989) zeigen, liegt das Hauptproblem bei der Chromatographie von o-Tyr neben p-Tyr und m-Tyr nicht in der Isomerentrennung sondern in der Beeinflussung der Trennung durch störende Begleitsubstanzen der Probenmatrix. Auch eine zu kurze Lebenszeit der Trennsäulen, ein hoher Säulenrückdruck und eine unzureichende Peak-Auflösung (CHUAQUI-OFFERMANN und MCDUGALL 1991) sowie eine zu geringe Spezifität (ZOLLER 1993) können zu den wichtigsten zu lösenden Aufgaben gezählt werden.

Mit einem wässrigen Eluenten, der außer 0.1% TFA keine weiteren Modifier enthielt, einem 3- μ m-C-18-Trennmateriale und einer Säulentemperatur von 35°C wurden überzeugende Trennergebnisse erhalten. Nach der Chromatographie eines Garnelen-Cytosols liegt der o-Tyr-Peak symmetrisch und grundliniengetrennt vor. Der Säulenrückdruck von etwa 240 bar und die Peak-Auflösung blieben über mindestens 250 Injektionen konstant. Da TFA

gleichermaßen als IPR und Säure fungiert, ist die Herstellung des Eluenten äußerst unkompliziert.

Die Temperaturerhöhung von 25°C auf 35 °C bewirkte ein Sinken der dynamischen Viskosität η von 0.89 mPas auf 0.72 mPas was zur Begrenzung des Säulendrucks ausreichte.

Da die Anwendung eines zweiten Detektionsverfahrens oder einer massenselektiven Detektion nicht möglich war, wurde zur Überprüfung der mit Trennsystem I ermittelten Ergebnisse ein zweites Trennsystem (Trennsystem II) mit stark unterschiedlichen Trennbedingungen gewählt. Bei Übereinstimmen der mit beiden Systemen ermittelten Werte ist eine hohe Sicherheit für die Peakidentität und für den Ausschluß einer Koelution von Störsubstanzen gegeben.

Die Nutzung eines wässrigen Eluenten mit NMP als IPR und Pufferbase bei pH 9 auf einem 5- μ m-C-18-Material ergab gute Trennergebnisse. Obwohl RP-Material mit Kieselgel als Träger als empfindlich gegenüber basischen Eluenten gilt, wurde pH 9 gewählt. Die Empfindlichkeit des Materials gilt vor allem für Phosphat- und Carbonat-Puffer (KIRKLAND und DESTEFANO 1996) und besonders bei höheren Temperaturen und Konzentrationen. NMP wurde bereits erfolgreich bei höheren pH-Werten zur Trennung von β -Blockern genutzt (KIRKLAND und DESTEFANO 1996). Das für Trennsystem II eingesetzte Material (Prodigy ODS (3)) ist laut Herstellerangabe wegen der besonders hohen Reinheit des eingesetzten Kieselgels (99.999 %) alkalistabil (PHENOMENEX 1999).

Zur anschaulichen Verdeutlichung der Vorgänge bei der Anwendung der entwickelten Trennsysteme kann das "Ion-pair-model" (BARTHA und STAHLBERG 1994), ein stöchiometrisches Ionenpaar-Chromatographie (IPC)-Modell, herangezogen werden: Danach wird innerhalb der polaren mobilen Phase aus dem geladenen Analyten und dem entgegengesetzt geladenen IPR ein stöchiometrischer Komplex gebildet. Dieser nun ungeladene Komplex wird vom hydrophoben RP-Material adsorbiert.

Bei dem niedrigen pH-Wert des Eluenten von Trennsystem I ist o-Tyr zu über 90% positiv geladen (Abbildung 11) und kann mit dem negativ geladenen Trifluoracetat-Anion einen ungeladenen Komplex bilden, der von der C-18-Phase adsorbiert werden kann.

Im Eluenten von Trennsystem II liegt o-Tyr in der einfach negativ geladenen Form vor. NMP hat einen pKs-Wert von 10.08, liegt bei pH 9 also zu über 90% als Kation vor, das mit dem o-Tyrosyl-Anion einen ungeladenen Komplex bilden kann, der wiederum von der RP-Phase adsorbiert wird (siehe Abbildung 10). Kirkland (KIRKLAND und DESTEFANO 1996) beschreiben, daß der pH-Wert des Eluenten bei IPC um 1 - 1.5 über dem pK-Wert des Analyten liegen soll, um ein Maximum an freier Base zu erhalten. In der Tat zeigt die Pufferkurve (Abbildung 11) von o-Tyr, daß bei pH 9, wie er im Eluenten von Trennsystem II vorliegt, erst etwa 45 % des Analyten in der gewünschten einfach negativ geladenen Form vorhanden ist. Die praktische Anwendung hat aber gezeigt, daß bei pH 9 mit diesem Trennsystem die besten Trennergebnisse erzielt werden können. Dieser Effekt kann damit erklärt werden, daß mit einer Senkung des pH-Wertes immer weniger o-Tyr zu Gunsten der zwitterionischen in der anionischen Form vorliegt und es andererseits bei Erhöhung des pH zu einer Entladung des IPR kommt.

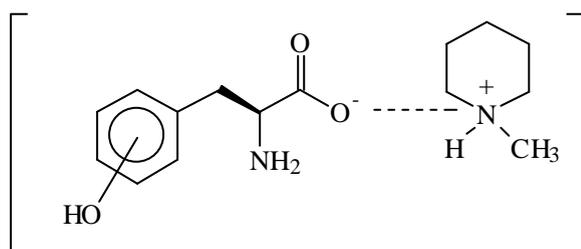


Abbildung 10: Wechselwirkung zwischen Tyr und NMP

Eine Derivatisierung mit den für die flüssigchromatographische Trennung von Aminosäuren üblichen Reagenzien wie z.B. Dansylchlorid wurde nicht eingesetzt, da der Analyt eine ausreichende Eigenfluoreszenz aufweist und das Fluoreszieren anderer Substanzen aus der Probenmatrix weitere Probleme gebracht hätte.

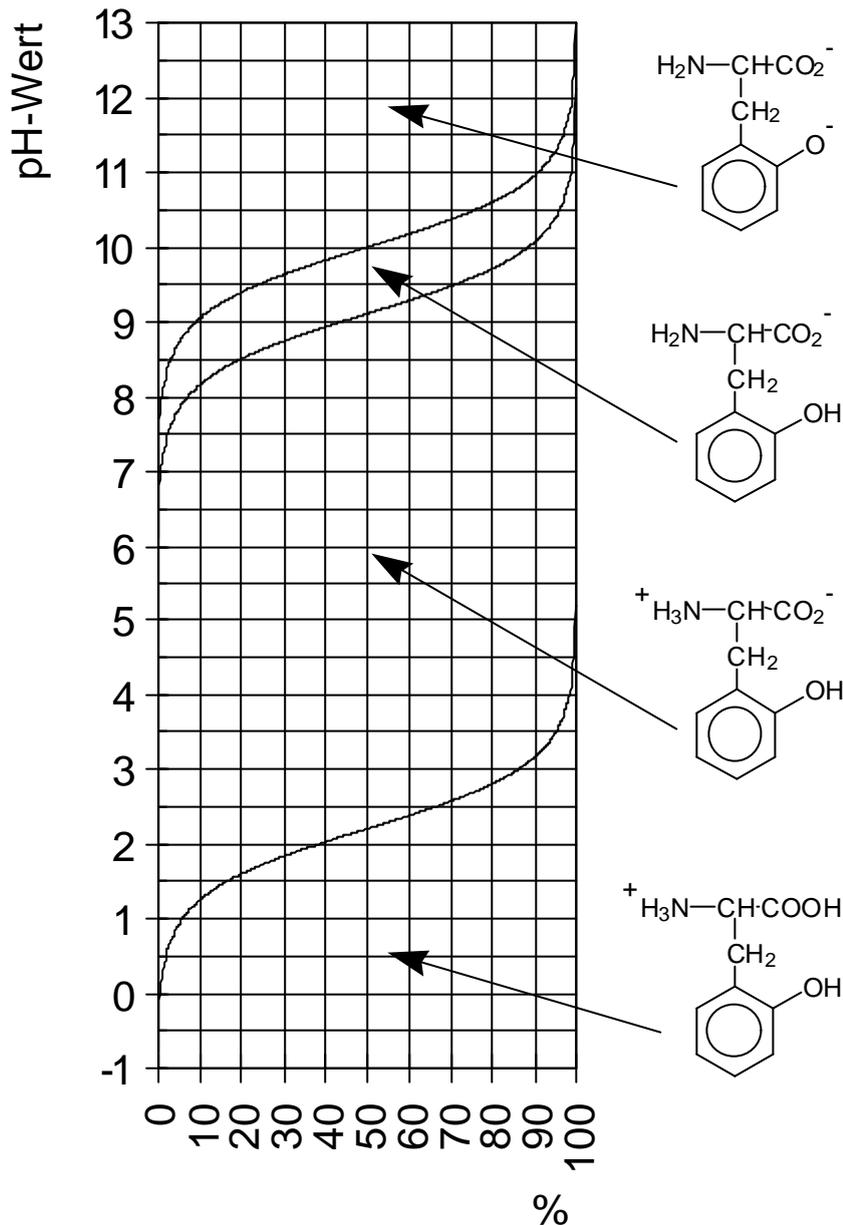


Abbildung 11: Pufferkurve für o-Tyr

9.1.3 Detektion

Drei unterschiedliche Detektionsmethoden wurden geprüft: UV-Detektion, elektrochemische Detektion und FI-Detektion.

Die elektrochemische Detektion zeigte gegenüber der FI-Detektion eine größere Empfindlichkeit und führte in anderen Arbeiten, bei denen es um die o-Tyr-Quantifizierung ging auch zum Erfolg (KAUR et al. 1988; KRACH et al. 1997),

konnte aber nach eigenen Untersuchungen nicht überzeugen. Bei Einsatz des sauren Eluenten lag das Redoxpotential von o-Tyr bei 1150 mV, so daß keine selektive Detektion mehr möglich war. HARRIMAN (1987) berichtete von einem pH-abhängigen Redoxpotential von o-Tyr von 1.22 mV bei pH 2.

Auch bei Einsatz des basischen Eluenten konnte mit einer einzigen Meßzelle keine ausreichende Selektivität erreicht werden, obwohl das Redoxpotential laut Harriman unter diesen Bedingungen auf einen Wert zwischen 0.72 und 0.93 mV gefallen sein mußte.

Die UV-Detektion zeigte sich als weder empfindlich noch selektiv genug um die Anforderungen zu erfüllen.

Die Fl-Detektion bei $\lambda_{\text{Ex}}=275$ nm und $\lambda_{\text{Em}}=305$ nm erwies sich für beide genutzten pH-Bereiche als empfindlich und selektiv genug. Die Wellenlängeneinstellung deckt sich mit den größtenteils publizierten Verfahren, einzig PAL et al. (1988) geben eine Anregungswellenlänge von 270 nm an.

Die pH-Abhängigkeit der Fl von o-Tyr begrenzte den Spielraum nur teilweise: Zwar zeigte sich, daß die Abweichung vom Isoelektrischen Punkt von o-Tyr zu höheren und zu niedrigeren pH-Werten zu einer geringeren Fl führte, diese aber immer noch für einen Nachweis der Bestrahlung ausreichte.

WHITE (1959) berichtete von einer Abnahme der Fl bei pH 2.5 und pH 9.7 um 50% vom Maximalwert.

Ein weiterer Punkt, der die Detektion beeinflusste war die Wahl des Eluentenpuffers. So konnte nicht auf Phosphat als Puffer zurückgegriffen werden, da dieses im basischen pH-Bereich einen von PAL et al. (1990) dokumentierten Quencheffekt auf o-Tyr ausübt.

9.1.4 Validierung

Wie im Kapitel 2 gezeigt, wurden zahlreiche Verfahren zum Bestrahlungsnachweis über o-Tyr publiziert. Zwar wird in einigen Publikationen die Kalibriermethode erwähnt, es fällt aber auf, daß eine vollständige Validierung des Verfahrens nie beschrieben wird.

Mit der Validierung des neu entwickelten Verfahrens wird geprüft, ob es für den gewünschten Zweck geeignet ist. Dies wird im einzelnen durch Untersuchungen zur Spezifität, Linearität, Präzision, Richtigkeit, Arbeitsbereich, NWG und Robustheit gezeigt.

Für beide Trennsysteme konnte durch Dotierversuche mit den Analyten in wässriger Lösung und in der Probenmatrix die Identität der o-Tyr-Peaks gezeigt werden. Es kam allerdings bei der Trennung von Cytosolen mit dem basischen Eluenten zur Koelution eines Störpeaks mit dem o-Tyr-Peak, was zu Problemen bei der Peakintegration im unteren Konzentrationsbereich führte.

Die Linearität wurde mittels Residualanalyse der Kalibrierfunktionen aus Grund- und Matrixkalibrierung innerhalb der Konzentrationsgrenzen 75 µg/L bis 300 µg/L nachgewiesen. Für die in unbestrahlten Proben zu erwartenden o-Tyr-Konzentrationen (> 75 µg/L) wurde Linearität vorausgesetzt.

ISHIMITSU et al. (1986) zeigten bei der Untersuchung von o-Tyr in Humanserum bei gleichen Fluorezenzbedingungen Linearität zwischen 10 und 250 µg/L.

Die Präzision, ausgedrückt über den Verfahrensvariationskoeffizienten, wurde als angemessen angesehen: Bei Anwendung des Trennsystems I lag er bei 6.4 %, bei Anwendung des Trennsystems II bei 7.3 %.

Richtigkeit, also die Übereinstimmung des mit einem Verfahren gemessenen Wertes mit dem "wahren" Wert, kann mit unterschiedlichen Vorgehensweisen erfolgen:

1. Die Untersuchung einer Referenzprobe und der Vergleich des erhaltenen Wertes mit dem bekannten Wert setzt die Existenz einer Referenzprobe voraus - dieses war nicht der Fall.
2. Der Vergleich der Ergebnisse mit denen eines anerkannten Bestimmungsverfahrens konnte mangels eines solchen Verfahrens nicht erfolgen.
3. Eine Wiederfindungs-Analyse mit dotierten Proben wurde durchgeführt. Diese letzte Methode wurde angewandt, und es wurden proportional-systematische Abweichungen um 66 % ermittelt. Diese vergleichsweise niedrigen Wiederfindungsraten können zum einen damit erklärt werden, daß durch Matrixbestandteile, wie beispielsweise Phosphat, ein Quencheffekt hervorgerufen wird, zum anderen ist ein gewisser Verlust bei der Probenaufarbeitung nicht auszuschließen.

Die NWG von 10.9 µg/L bei Nutzung des sauren und 2.9 µg/L bei Nutzung des basischen Eluenten sind, verglichen mit den Nachweisgrenzen anderer publizierter Verfahren, relativ hoch. So kommen MEIER et al. (1989) bei pH 7 zu einer NWG von 0.1 µg/L und ISHIMITSU et al. (1986) bei pH 2.75 zu 0.75 µg/L.

Zu erklären ist dies zum Teil mit der abgeschwächten FI bei den gewählten Bedingungen (siehe oben). Einen Einfluß auf die Qualität der Analytik hat er aber nicht, da der Konzentrationsbereich von o-Tyr in bestrahlten Proben deutlich über der NWG liegt.

9.2 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Die absorbierte Strahlendosis ist bei der Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierender Strahlung der Schlüsselfaktor der Qualitätskontrolle. Denn ist die Dosis zu niedrig, wird der gewünschte Effekt nicht erreicht; ist sie zu hoch, können die technischen Eigenschaften und die Qualität des Produktes beeinträchtigt werden (EHLERMANN 1998). Zur amtlichen Überwachung gehört neben der Identifikation bestrahlter Produkte auch die Dosimetrie (EHLERMANN 1995).

Die Untersuchung von bestrahlten Garnelen sollte Aufschluß über die Dosis-Wirkungs-Beziehung bei der radiolytischen Hydroxylierung von Phe geben. In diesem Zusammenhang sollte die Frage nach der Möglichkeit einer Dosimetrie beantwortet werden.

Eine Analyse der mit Strahlendosen von 1 kGy, 3 kGy und 5 kGy behandelten Garnelen ergab einen linearen Anstieg des Gehaltes an nicht proteingebundenem o-Tyr von 120 µg/kg/kGy bezogen auf das Frischgewicht. Dabei lag der o-Tyr-Gehalt einer jeden Bestrahlungsstufe signifikant über dem der niedrigeren Stufe. Diese Daten konnten auch nach der Bestimmung mit einem zweiten Trennsystem (Trennsystem II) bestätigt werden.

Der lineare Anstieg der o-Tyr-Konzentration über den betrachteten Dosisbereich wird von den Untersuchungen von KRACH et al. (1997) bestätigt. Auch bei der Untersuchung von proteingebundenem o-Tyr in bestrahltem Geflügelfleisch (MEIER et al. 1993, CHUAQUI-OFFERMANN et al. 1993) wurde dieser Zusammenhang ermittelt.

Abweichend davon zeigen sich die Ergebnisse bei der Untersuchung von mit ionisierenden Strahlen behandelten Phe-Lösungen. So zeigen KRAJNIK et al. (1995), daß nur bei mit Argon oder Lachgas (N₂O) gesättigten Phe-Lösungen die o-Tyr-Zunahme linear ist. Bei Luft- oder Sauerstoffsättigung der Lösung kam es schon ab einer Dosis von 1 kGy zu einem deutlichen Abflachen der Kurve. WANG et al. (1993) berichteten, daß bei einem Angriff von Hydroxylradikalen auf Phe zunächst eine weitgehend zufällige und von der Atmosphäre unabhängige Addition und Bildung eines Hydroxycyclohexadienyl-Radikals erfolgt. Erst die Weiterreaktion ist von den äußeren Bedingungen abhängig.

Andererseits wurde der Einfluß der während der Bestrahlung von Hühnerfleisch anliegenden Atmosphäre von CHUAQUI-OFFERMANN et al. (1993) auf die radiolytische o-Tyr-Bildung bestritten. Daraus läßt sich schließen, daß in Lebensmitteln neben der Atmosphäre weitere Faktoren, die bei der Untersuchung von Modellösungen nicht berücksichtigt wurden, für die o-Tyr-Entstehung verantwortlich sind. So zeigten Pulsradiolyse-Studien von HOEY und

BUTLER (1994, 1995), daß Antioxidantien einen stark hemmenden Effekt auf die o-Tyr-Bildung haben.

Die Steigung der von KRACH et al. (1997) ermittelten dosisabhängigen o-Tyr-Zunahme von 26 µg/kg/kGy ist deutlich niedriger als die hier gemessene.

Die in Arbeiten zur Untersuchung des proteingebundenen o-Tyr-Gehaltes in bestrahlten Lebensmitteln sind nicht mit den Werten des freien o-Tyr vergleichbar.

Einen wichtigen Effekt auf die o-Tyr-Entstehung hat die Temperatur während der Bestrahlung. CHUAQUI-OFFERMANN et al. (1993) zeigten mit der Untersuchung von bei unterschiedlichen Temperaturen bestrahltem Hühnerfleisch, daß zwischen 0,4 °C und 20 °C kein Effekt auftritt, sobald die Temperatur aber < 0 °C ist, eine deutliche Hemmung der o-Tyr-Bildung eintritt. Von KRAJNIK et al. (1995) wird von einer deutlichen Hemmung der o-Tyr-Bildung in bestrahlten Phe-Lösungen ab 0°C berichtet.

Vor diesem Hintergrund wird klar, daß eine sichere Dosimetrie mit o-Tyr als Marker nur bedingt anwendbar sein wird.

9.3 Hintergrundgehalt von o-Tyr in unbestrahlten Proben

Auch die nicht bestrahlten Garnelen-Proben, die mit dem neu entwickelten schonenden Verfahren untersucht wurden, zeigten einen geringen Gehalt an o-Tyr. Bezogen auf das Frischgewicht wurden im Mittel 19,3 µg/kg an nicht radiolytisch gebildetem, nicht proteingebundenem o-Tyr nachgewiesen. In den Proben, die im Rahmen der Prüfung auf Anwendbarkeit des entwickelten Verfahrens als „kleiner Warenkorb“ untersucht wurden, wurden Hintergrundgehalte bis zu 18,2 µg/kg gemessen.

Da die Proben - außer die Warenkorb-Proben - direkt vom Erzeuger bezogen wurden, kann es sich bei dem nachgewiesenen o-Tyr aber nicht um ein Radiolyseprodukt handeln.

Die Artefaktbildung durch Aufarbeitungsschritte wie eine saure Hydrolyse, bei der es zu einer Fenton-Reaktion kommen kann (ZOLLER 1993) oder die Lösungsmittelextraktion vor der Hydrolyse, die Mitochondrien zur o-Tyr-Produktion anregt (Karam und Simic 1990, 1989) kann ebenfalls ausgeschlossen werden.

In einer größeren Zahl der Publikationen zum Bestrahlungsnachweis über o-Tyr als Bestrahlungsmarker wird von einem geringen Hintergrundgehalt berichtet - unabhängig von untersuchtem Lebensmittel und angewandter Methode (KRACH et al. 1997, HART et al. 1988, MEIER et al. 1993).

Bereits 1991 wurde von CHUAQUI-OFFERMANN und MCDUGALL zugestanden, daß o-Tyr nicht exklusiv durch ionisierende Strahlung gebildet wird. Vielmehr wird o-Tyr überall dort gebildet, wo reaktive Sauerstoffspezies wie das Hydroxyl-Radikal mit Phe in Berührung kommen.

Von KARAM und SIMIC (1990) wird von einer durch Mitochondrien vermittelten Haber-Weiss-Reaktion berichtet, aus der o-Tyr hervorgeht. Auch oxidativer Stress (NIESS et al. 1997, KARAM et al. 1991) und die Bestrahlung mit UV-Licht (ISHIMITSU et al. 1990) können zur Bildung von o-Tyr führen. Und weiterhin wird von der Hydroxylierung von Phe durch Flavin berichtet (MAGER und TU 1994).

Der bestrahlungsunabhängige Hintergrundgehalt an o-Tyr muß nicht zwingend dessen Ablehnung als Bestrahlungsmarker zur Folge haben - siehe folgender Abschnitt.

9.4 Anwendbarkeit des entwickelten Verfahrens

Die Anforderungen, die FAO und IAEA an ein Nachweisverfahren für bestrahlte Lebensmittel stellen, sind in Tabelle 10 beschrieben (DELINCÉE 1993). Im folgenden soll geprüft werden, inwieweit diese äußerst strengen Forderungen vom entwickelten Verfahren erfüllt werden.

Tabelle 10: Liste der Anforderungen für ein Verfahren zum analytischen Nachweis für bestrahlte Lebensmittel

Diskriminierung	Bestrahltes Lebensmittel: meßbare Veränderung vorhanden; bestrahltes Lebensmittel: meßbare Veränderung nicht vorhanden, bzw. eindeutig charakterisiert und ausreichend verschieden von strahleninduzierten Veränderungen
Spezifität	Ähnliche Veränderungen nicht durch andere Lebensmittelverarbeitungsverfahren, Lagerung, Zucht- oder Sortenauswahl, geänderte Wachstumsbedingungen u.ä.
Reichweite	Parameter meßbar über den ganzen relevanten Dosisbereich des bestrahlten Lebensmittels
Stabilität	Meßgröße stabil während der gesamten Haltbarkeitsdauer des Lebensmittels
Zuverlässigkeit	Reproduzierbarkeit, Präzision, Validierung mit Hilfe statistischer Methoden
Geringe Störanfälligkeit	Meßgröße unempfindlich oder genau vorhersehbar bei unterschiedlichen Bedingungen, z.B. Veränderung der Bestrahlungsparameter (Dosisleistung, Temperatur, Gasatmosphäre, Feuchtigkeit, usw.), Störung durch andere Lebensmittelbestandteile, Störung durch zusätzliche Verfahrensschritte
Fälschungssicherheit	Verfälschungen schwer möglich. Deshalb vorteilhaft, wenn die Meßgröße innere Lebensmitteleigenschaften widerspiegelt, z. B. Veränderungen an Proteinen, Fetten, Nucleinsäuren usw., statt an äußeren Merkmalen, wie Verpackung, Sand- oder Staubkontamination usw.
Unabhängigkeit	Keine identische, unbestrahlte Vergleichsprobe erforderlich
Praktische Anwendbarkeit	Einfach, auch apparativ; geringe Kosten; schnelle Durchführung; geringe Probengröße; leicht standardisierbar; wenn möglich, zerstörungsfrei
Gerichtsfähigkeit	
Dosisabhängigkeit	Messung der aufgetragenen Strahlendosis

9.4.1 Diskriminierung

Diese Forderung besagt in strenger Anwendung, daß die meßbare Veränderung, in diesem Fall der Gehalt an freiem o-Tyr, im unbestrahlten Lebensmittel nicht vorhanden sein soll. Es konnte jedoch in jeder unbestrahlten Probe ein bestimmter Hintergrundgehalt an o-Tyr nachgewiesen werden. Wenn man allerdings den Unterschied der Gehalte in bestrahlten und unbestrahlten Proben

betrachtet (siehe Abbildung 12), erkennt man, daß er „ausreichend verschieden“ ist. Der nach einer Bestrahlung mit 1 kGy niedrigste gemessene o-Tyr-Gehalt lag bei 211 µg/kg und damit fast 10-fach über dem höchsten in dieser Studie gemessenen Wert einer unbestrahlten Probe von 24 µg/kg. [siehe Abbildung 12]

Andere Autoren haben bereits bei einem Unterschied von 4-6-fach (MISCHKE et al. 1993) oder niedriger (CHUAQUI-OFFERMANN et al. 1993) von einer ausreichenden Diskriminierung berichtet. MEIER et al. (1993) ermittelten in unbestrahlten Proben Hintergrundgehalte von 0.03 - 0.08 mg/kg und sahen o-Tyr-Gehalte von 0.1 mg/kg bereits als suspekt an.

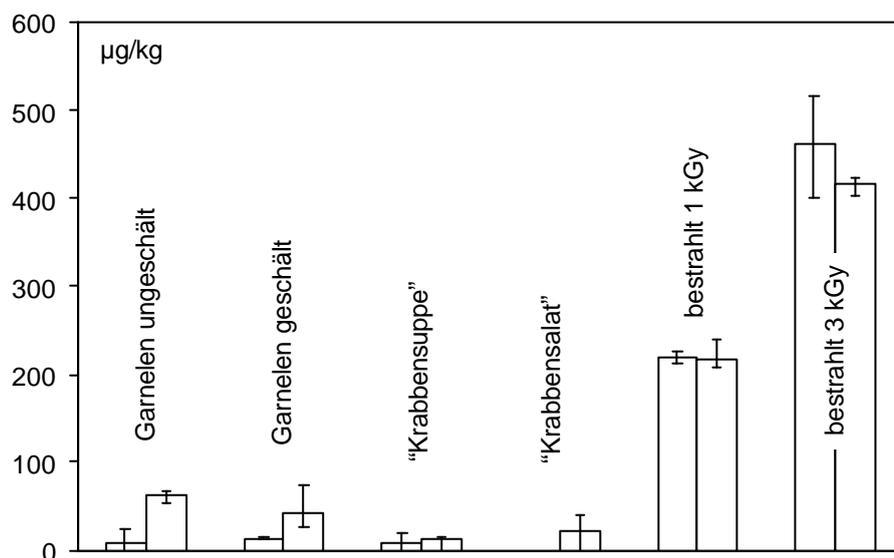


Abbildung 12: Gehalt an o-Tyr in unterschiedlichen Garnelen-Produkten im Vergleich zu bestrahlten Proben; Trennung mit TS I und TS II; Mittelwert, höchster Wert, niedrigster Wert

9.4.2 Spezifität

Die Untersuchungen zeigten, daß in frischem und in abgepacktem Garnelenfleisch ein spezifischer Nachweis von o-Tyr möglich ist. Bei der Untersuchung der Suppen und Salate zeigten sich allerdings störende Effekte: Die Cytosole aus den Garnelen der „Krabbensuppen“ zeigten stark veränderte

Chromatogramme mit einer geringeren Anzahl an Störpeaks aber auch einem stark verkleinerten p-Tyr-Peak, was auf eine Art Auswaschung der FAA aus den Proben hindeuten kann. Die aus den Salaten gewonnenen Cytosole zeigten zum Teil erhebliche Interferenzen, die eine Integration des o-Tyr-Peaks stark erschwerten.

9.4.3 Reichweite

Es wurden Garnelen untersucht, die bis zu einer Dosis von 5 kGy bestrahlt wurden. Nur in Indonesien und Indien werden höhere Strahlendosen für Krustentiere (Maximaldosis 7 kGy) verwendet. Auch bei dieser Dosis ist die Möglichkeit der Diskriminierung denkbar. Problematisch wäre eine Abnahme der o-Tyr-Konzentration ab einer bestimmten Dosis für eine mögliche Dosimetrie: Bei einer Dosis-o-Tyr-Konzentrations-Kurve mit einem Maximum würden für eine Gehaltsangabe zwei Bestrahlungsdosen gelten. Eine solche Kurve ist bei der Bestrahlung von sauerstoffgesättigten Phe-Lösungen bereits beobachtet worden, wobei die maximale o-Tyr-Konzentration schon bei 2.5 kGy erreicht wurde (KRAJNIK et al. 1995).

9.4.4 Stabilität

In Krustentieren werden bei mikrobiellem Verderb durch Decarboxylierung aus den Aminosäuren biogene Amine gebildet. So entsteht aus p-Tyr das biogene Amin Tyramin (HALASZ et al. 1994). Ein Abbau von o-Tyr durch Mikroorganismen ist ebenfalls denkbar, wurde aber nicht nachgewiesen. Es gibt keine Anhaltspunkte, daß o-Tyr in stärkerem Maße abgebaut wird als p-Tyr, und daher ist die Störung des Nachweises innerhalb der Haltbarkeit der Nordseegarnelen und anderer Krebstiere nicht wahrscheinlich. Nach erfolgter Extraktion der freien Aminosäuren sind die Untersuchungslösungen über 2 Monate lang stabil.

9.4.5 Zuverlässigkeit

Das Verfahren wurde ausführlich validiert (siehe oben „Validierung“). Die Eignung für Routineuntersuchungen muß noch durch entsprechende Ringversuche überprüft werden.

9.4.6 Geringe Störanfälligkeit

Über die Abhängigkeit der radiolytischen o-Tyr-Bildung von zahlreichen Parametern wurde weiter oben ausführlich berichtet. Die Sensibilität des Verfahrens gegenüber Störung durch andere Lebensmittelbestandteile wurde bei der Untersuchung des Warenkorbs festgestellt. Bei der Analyse von Garnelen aus „Krabbensuppe“ führt wahrscheinlich die Auswaschung der freien Aminosäuren zu einem geringeren Gehalt der Proben an freien Aminosäuren. Davon bleibt auch das o-Tyr nicht verschont, so daß davon auszugehen ist, daß der Schwellenwert bei dessen Überschreitung ein Produkt als bestrahlt gilt für Garnelen, die in Flüssigkeiten gelagert werden nach unten korrigiert werden muß.

9.4.7 Fälschungssicherheit

Bei dem o-Tyr-Gehalt von Lebensmitteln handelt es sich um eine innere Eigenschaft, deren absichtliche Verfälschung schwer möglich sein dürfte. Zwar könnte man o-Tyr zu einer Probe hinzugeben um so den Gehalt zu erhöhen, aber eine gewollte Verringerung des Gehaltes ist nicht möglich. Eine Abhängigkeit von äußeren Merkmalen, wie bei der TL-Messung mineralischer Verunreinigungen aus den Därmen von Garnelen (AGNEL et al. 1993) besteht nicht.

9.4.8 Unabhängigkeit

Bis zur Einführung des Verfahrens in die Routineanalytik ist unter anderem eine breitere Datenbasis nötig, die die Schwankungsbreite der in der Natur vorkommenden Gehalte an o-Tyr in Garnelen wiedergibt. Auf der Grundlage solcher Daten kann dann ein Bestahlungsnachweis auch ohne identische unbestrahlte Vergleichsprobe geführt werden.

9.4.9 Praktische Anwendbarkeit

Die praktische Anwendbarkeit des vorgestellten Verfahrens kann in Bezug auf apparative Anforderungen und auf den Zeitaufwand noch optimiert werden. So ist die Entfernung des Lösungsmittels nach der Proteinfällung gleichermaßen zeit- und wegen der Notwendigkeit einer Gefriertrocknung auch apparativ aufwendig. Die Substitution der Lösungsmittelfällung wird ein Ziel zukünftiger Entwicklungen sein. Die Anforderungen an das Chromatographiesystem sind vergleichsweise gering - ebenso die Menge des zur Analyse benötigten Probenmaterials.

9.4.10 Dosisabhängigkeit

Die radiolytische Bildung von Hydroxyl-Radikalen und die Hydroxylierung von Phe hängt, wie erwähnt, von zahlreichen Faktoren ab:

Dosisrate und Strahlungsart, das wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen nachgewiesen, sind ohne Einfluß. Aber Temperatur des Bestrahlungsgutes, der pH-Wert und die Atmosphäre im Bestrahlungsgut beeinflussen die o-Tyr-Ausbeute zum Teil stark.

Andererseits sind die Bedingungen innerhalb eines Lebensmittels oder einer Lebensmittelgruppe annähernd standardisierbar. Bei einer Validierung für einzelne Lebensmittel, wobei auch der natürliche Hintergrundgehalt nicht vernachlässigt werden dürfte, und einer Standardisierung der Bestrahlungsbedingungen könnte die Dosimetrie über den o-Tyr-Gehalt als eine Art Konventionsmethode funktionieren.

Eine präzise Dosimetrie, wie sie mittels standardisierten Dosimetern bei der Qualitätskontrolle in den Bestrahlungsanlagen stattfindet, wird aber über den Nachweis von o-Tyr nie möglich sein.

9.5 Ausblick

Auch vor dem Hintergrund der zunehmenden Liberalisierung des Welthandels und der europäischen Marktöffnung ist die Notwendigkeit eines

Nachweisverfahrens für bestrahlte Lebensmittel gegeben. Auch, wenn die Bestrahlung bestimmter Lebensmittel zugelassen wird oder das generelle Bestrahlungsverbot entfällt, so muß dennoch der Nachweis einer stattgefundenen Bestrahlung möglich sein. Zu diesem Schluß kommt auch BÖGL (1998), der die Entwicklung analytischer Nachweisverfahren für bestrahlte Lebensmittel rechtfertigt, um die Einhaltung der national unterschiedlichen Regelungen im Warenverkehr gewährleisten zu können. Da in nahezu allen Staaten, in denen die Bestrahlung zugelassen ist, eine Kennzeichnungspflicht gilt, sind auch im Rahmen der nationalen Lebensmittelüberwachung Nachweisverfahren nötig. THAKUR und SINGH (1994) sehen im Fehlen einer standardisierten Methode zur Dosimetrie sogar einen Grund für die geringe Verbreitung der Lebensmittelbestrahlung.

Neben der Erkennung einer Lebensmittelbestrahlung hat der o-Tyr-Nachweis eine Perspektive als Detektionsverfahren für die Aktivität von Hydroxyl-Radikalen, was für die Erforschung des oxidativen Stresses in Bezug auf menschliche Krankheiten von Interesse ist (VAN DER VLIET et al. 1994).

Das in dieser Arbeit betrachtete Verfahren erfüllt die von FAO und IAEA gestellten Anforderungen in weiten Bereichen. Dennoch ist es, wie die Diskussion seiner Anwendbarkeit gezeigt hat, noch weiter zu optimieren.

Der Schritt der Cytosolgewinnung ist, was Zeit- und apparativen Aufwand betrifft, noch weiterzuentwickeln. Die Störungen, die durch unterschiedliche Verarbeitungsprozesse auftreten können, sind durch Modellversuche mit bestrahlten Proben und Untersuchung eines breiteren Warenkorbes genauer abzuklären. Die Ausweitung des Verfahrens von Nordseegarnelen auf andere Lebensmittel ist denkbar, wobei die Übertragbarkeit wegen des Vorhandenseins der nötigen Konzentration freier Aminosäuren vor allem andere Crustaceen möglich scheint. Die Analyse von in unterschiedlichen Bestrahlungsanlagen bestrahlten Produkten muß letzte Sicherheit über die Zuverlässigkeit des Verfahrens bringen.

Auch nach einer Etablierung des Verfahrens für bestimmte Lebensmittelgruppen, wird die Anwendung auf alle proteinreichen Lebensmittel nicht möglich sein. So kann der Nachweis einer Bestrahlung von reinem Protein erst nach dessen Hydrolyse erfolgen (BÖGL 1998).

Auch andere neue Nachweisverfahren, wie hochempfindliche GC-MS veränderter Lipide aus dem geringen Fettanteil der Garnelen mit anschließender Diskriminanzanalyse (ELSNER et al. 1996), die Bestimmung von radiolytisch gebildetem H_2 oder CO_2 mit Headspace-GC (FURUTA et al. 1997) oder die Radio-Chemilumineszenz (ANDERLE et al. 1996b), werden das Hauptproblem der Dosimetrie nicht lösen können. Wenn eine Untersuchung den Nachweis der Überschreitung einer zugelassenen Strahlendosis zum Ziel hat, muß die maximale durchschnittlich absorbierte Gesamtdosis ermittelt werden (EHLERMANN 1998). Diese wird aber wegen der inhomogenen Dosisverteilung innerhalb bestrahlter Chargen durch kein Verfahren außer der Dosimetrie während der Bestrahlung feststellbar sein. Die Dosisleistung nimmt mit dem Quadrat der Entfernung ab. Somit ist auch bei zweiseitiger Bestrahlung ein Unterschreiten der gewünschten Dosis im Inneren des Bestrahlungsgutes und ein Überschreiten der erlaubten Dosis auf der Außenseite nie völlig ausgeschlossen (SCHULTE 1995).

10 Zusammenfassung

Die Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierenden Strahlen wird zur Abtötung von Verderbniserregern und pathogenen Keimen in über 40 Staaten in zunehmendem Maße eingesetzt. In Deutschland ist das Inverkehrbringen derart konservierter Lebensmittel allerdings nicht gestattet.

Zur Überwachung dieses Verbots wurden eine Vielzahl von Verfahren entwickelt, wobei mit keinem davon zuverlässig die Bestrahlung proteinreicher und gleichzeitig fettarmer Lebensmittel, zu denen auch die Nordseegarnele zählt, nachgewiesen werden kann.

Die Bestimmung des Bestrahlungsmarkers o-Tyr, das radiolytisch aus Phe gebildet wird, bietet eine Möglichkeit, bestrahlte Lebensmittel von unbestrahlten zu unterscheiden - die Anwendbarkeit in der Routine ist aber bisher nicht gewährleistet. Da die in publizierten Verfahren angewandte hydrolytische Freisetzung des o-Tyr aus dem Proteinverbund häufig zu Problemen führt, wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem das nicht proteingebundene o-Tyr als Marker für eine stattgefundene Bestrahlung bestimmt wird. Dieses Verfahren wurde für den Bestrahlungsnachweis von Nordseegarnelen und deren Produkte validiert.

Aus dem homogenisierten Probenmaterial erfolgte die Gewinnung des Cytosols durch Proteinfällung und Lösungsmittelextraktion. RP-HPLC mit TFA als IPR im sauren Milieu konnte erfolgreich zur Trennung des o-Tyr von dem im Cytosol in wesentlich höherer Konzentration vorhandenem p-Tyr eingesetzt werden. Zur Detektion wurde die Eigenfluoreszenz von o-Tyr ($\lambda_{\text{Ex}} = 275\text{nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 305\text{nm}$) genutzt.

Die elektrochemische Detektion mit einer einzelnen Elektrode war wegen des hohen Oxidationspotentials des o-Tyr nicht spezifisch genug. Die Nachweisgrenze bei UV-Detektion war nicht ausreichend niedrig.

In unbestrahlten Garnelen-Proben konnte o-Tyr im Konzentrationsbereich von 20 µg/kg nachgewiesen werden. Es ist davon auszugehen, daß es sich hierbei um den natürlichen Hintergrundgehalt in Garnelen handelt, da wegen der schonenden Aufarbeitung eine Artefaktbildung als ausgeschlossen gelten kann.

Untersuchung von Garnelenfleisch, das mit Dosen von 1 - 5 kGy bestrahlt wurden, zeigten, daß eine Diskriminierung bestrahlter Proben trotz des Hintergrundgehaltes in unbestrahlten Proben möglich ist. Die o-Tyr-Konzentration in mit 1 kGy behandeltem Garnelenfleisch überstieg die Konzentration in unbestrahlten Proben um das zwanzigfache. Eine Dosimetrie konnte zwar für die im Rahmen dieser Arbeit bestrahlten Garnelen vorgenommen werden, in der Praxis der Lebensmittelüberwachung könnte dies aber problematisch sein, da die Temperatur während der Bestrahlung einen Einfluss auf die Menge des radiolytisch gebildeten o-Tyr hat.

Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurde eine zweite HPLC-Methode mit stark unterschiedlichen Trennbedingungen entwickelt. Die Trennung erfolgte hier mit basischem pH und NMP als IPR, wobei hier das o-Tyr in anionischer Form vorlag. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zu den mit dem ersten Trennsystem erhaltenen Ergebnisse festgestellt werden.

Mit der Bestimmung von o-Tyr in Garnelen aus einem Warenkorb, der mit unterschiedlichen Garnelenprodukten bestückt war, konnte die Anwendbarkeit des entwickelten Verfahrens auch für weiterverarbeitetes Garnelenfleisch bestätigt werden.

11 Summary

The treatment of foodstuffs with ionising radiation is used in over 40 countries to prevent them from bacterial spoilage and pathogenic germs. In Germany the trade of radiation preserved foodstuffs is prohibited however.

Although numerous methods for the observation of this prohibition have been developed, none of them can prove the irradiation of foodstuffs with a high protein content and a low fat content, like in shrimps, reliably.

The determination of the radiation marker *o*-Tyr, that is formed radiolytically from Phe, is a possible way to distinguish irradiated food from non-irradiated food. But the applicability in routine analysis is not practicable yet. Because the acid hydrolysis step, which is often used in published studies to liberate the amino acids from the proteins, often leads to problems, a method has been developed, where the non-protein bound *o*-Tyr is analysed as a marker for the irradiation. This method has been validated for the irradiation detection of the common shrimp and its products.

After homogenisation of the sample material, protein precipitation and solvent extraction are accomplished to get the cytosol. RP-HPLC with TFA as IPR in acid solution was successfully used to separate *o*-Tyr from *p*-Tyr, which is present in cytosol on a substantial higher level. For the detection the natural fluorescence of *o*-Tyr ($\text{Ex} = 275 \text{ nm}$, $\text{Em} = 305 \text{ nm}$) was utilised.

The electrochemical detection with one single electrode was not specific enough because of the high oxidation potential of *o*-Tyr. The limit of detection of the UV-detection was not sufficient.

In unirradiated shrimp samples *o*-Tyr was detected at a concentration level of $20 \mu\text{g}/\text{kg}$. It can be assumed that this is the naturally occurring background level in common shrimps, since during the smooth sample preparation the formation of artefacts can be expected.

Analysis of samples which were irradiated with doses from 1 to 5 kGy illustrated, that in spite of the backgroundlevel a clear distinction between irradiated and

unirradiated shrimps is possible. The o-Tyr concentration in shrimp meat which was treated with a dose of 1 kGy exceeded the concentration in unirradiated samples 20-fold. A dosimetric measurement could be made for the shrimps which were irradiated for this study but it could be problematic in the routine of the official food enforcement because the temperature during the irradiation process influences the amount of the radiolytic formed o-Tyr.

To confirm the reliability of the results a second HPLC procedure with different separation conditions was invented. The separation was carried out using NMP as an IPR in a basic solution where o-Tyr occurs in its anionic form. No significant differences were found, when the results obtained with the different eluents were compared.

The applicability of the new developed method for shrimp meat could be verified by analysing shrimps from a market basket which was supplied with several different shrimp products.

12 Literatur

- Agnel, J.-P., M.-S. Dutraive, I. Vaux, I. Rustan u. J. Raffi: Thermoluminescence identification of ionized shellfish. Comm. Eur. Com. [Rep.] EUR 14315 (1993).
- Anderle, H., I. Steffan, E. Wild u. P. Hille: Radio-chemiluminescence of bones and seafood shells - a new, promising method for the detection of food irradiation?. Fresenius´ J. Anal. Chem. 354, 925 (1996 a).
- Anderle, H., I. Steffan, J. F. K. Huber u. E. Wild: Determination of ortho- and meta-tyrosin by HPLC as markers for the detection of irradiated meat. Unpublished Results (1996 b).
- BGVV: L 12.01.02-2 In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Beuth Verlag GmbH, Berlin (1998).
- Bögl, K. W.: Stand der Zukunft der analytischen Identifizierung bestrahlter Lebensmittel in der EU und im freien Welthandel. Proceedings of the 5th German Symposium on Food Irradiation, 11. - 12.11.1998, Karlsruhe, Germany.
- Brown, R. C., C. E. Evans, J. A. Hoskins u. J. Peacock: Production of tyrosine isomers in mice by therapeutic doses of ^{60}Co irradiation. J. Chromatogr. 497, 360 (1989).
- Bumberger, E. u. D. Jahr: Nachweis bestrahlter Lebensmittel im Rahmen der amtlichen Überwachung. Proceedings of the 5th German Symposium on Food Irradiation, 11. - 12.11.1998, Karlsruhe, Germany.
- Bundesforschungsanstalt für Ernährung, (Ed.): Die Strahlenkonservierung von Lebensmitteln. Mitteilungen über Ernährungsfragen. 5 (1995).
- Chuaqui-Offermanns, N. u. T. McDougall: An HPLC method to determine o-tyrosine in chicken meat. J. Agric. Food Chem. 39, 300 (1991).

-
- Chuaqui-Offermanns, N. u. T. McDougall: Background levels and radiation dose yield of o-tyrosine in chicken meat. J. Food Prot. 54, 935 (1991).
- Chuaqui-Offermanns, N., T. McDougall u. A. M. Guerrero: Validation of o-tyrosine as a marker for detection of irradiated chicken meat. J. Food Prot. 56, 47 (1993).
- Claybrook, D. L.: The biology of crustacea, Band 5/3, D. E. Bliss (Ed.), Academic Press, New York, S. 163 ff (1983).
- Codex Alimentarius Commission: Codex general standard for irradiated foods and recommended international code of practice for the operation of radiation facilities used for the treatments of foods. Food and Agriculture Organization of the United Nations (1984).
- de Duve, C. u. H. Beaufay: A short history of tissue fractionation. Cell. Biol. 91, 293 (1981).
- Dederer, H. G.: Rechtliche Konsequenzen für die ionisierende Bestrahlung von Lebensmitteln aus EG-Richtlinien und WTO-Abkommen. Proceedings of the 5th German Symposium on Food Irradiation, 11. - 12.11.1998, Karlsruhe, Germany
- Delincee, H.: International-cooperation in the field on detection of irradiated food. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 197, 217 (1993).
- Deutsche See Großverbraucher-Service: Fachberater 3 - Krebs und Weichtiere, Band 3, Bremerhaven (1994).
- Diehl, J. F., C. Hasselmann u. D. Kilcast: Sind bestrahlte Lebensmittel ohne Nährwert?. Z. Lebensmittelw. 42, 314 (1991).
- Dodd, N. J. F.: Free radicals and food irradiation. Biochem. Soc. Symp., 247 (1995).
- Dragnic, I. G. and Z. O. Dragic: The Radiation chemistry of water, Academic Press, New York (1963).

EG: Gemeinsamer Standpunkt (EG) Nr. 46/97, Abl. C 389 vom 22.12.1997, S. 36.

EG: Gemeinsamer Standpunkt (EG) Nr. 47/97, Abl. C 389 vom 22.12.1997, S. 47.

Ehlermann, D. A. E.: Normung im Bereich der Lebensmittelbestrahlung durch ASTM und ISO. Proceedings of the 5th German Symposium on Food Irradiation, 11. - 12.11.1998, Karlsruhe, Germany.

Europäischer Gerichtshof: EuGH, Rs. 120/78, Slg. 1979, 649.

Farrahani, M. u. M. G. Simic: Hydroxyl radical induced cross-linking between phenylalanine and 2-desoxyribose. *Biochemistry* 27, 4695 (1988).

Friederici, B.: Bestimmung von ortho-Tyrosin mittels HPLC zum Nachweis der Bestrahlung eiweißhaltiger Lebensmittel. Diplomarbeit, Fachhochschule Lippe, Fachbereich Lebensmitteltechnologie (1994).

Fujimoto, S., S. Ishimitsu, H. Kanazawa, T. Mizutani, A. Ohara u. T. Hayakawa: Hydroxylation of phenylalanine by stimulated polymorphonuclear leukocytes - attempts to detect hydroxyl radicals. *Agric. Biol. Chem.* 51, 2851 (1987).

Fukami, M. H., J. Haavik u. T. Flatmark: Phenylalanine as substrate for tyrosine hydroxylase in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem. J.* 268, 525 (1990).

Furuta, M., T. Dohmaru, T. Katayama, H. Toratani u. A. Takeda: Detection of irradiated frozen deboned seafood with the level of radiolytic H₂ and CO gases as a probe. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3928 (1997).

Gieseg, S. P., J. A. Simpson, T. S. Charlton, M. W. Duncan u. R. T. Dean: Protein-bound 3,4-dihydroxyphenylalanine is a major reductant formed during hydroxyl radical damage to proteins. *Biochemistry* 32, 4780 (1993).

- Giulivi, C. u. K.J.A. Davies: Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by the 19 S-proteasome. *J. Biol. Chem.* 268, 8752 (1993).
- Glidewell, S. M., N. Deighton, B. A. Goodman u. J. R. Hillman: Detection of irradiated food: A review. *J. Sci. Food Agric.* 61, 281 (1993).
- Gotz, M. E., G. Kunig, P. Riederer u. M. B. H. Youdim: Oxidative stress - free-radical production in neural degeneration. *Pharmacology and Therapeutics* 63, 37 (1994).
- Grootveld, M. u. R. Jain: Methods for the detection of irradiated foodstuffs: Aromatic hydroxylation and degradation of polyunsaturated fatty acids. *Radiat. Phys. Chem.* 34, 925 (1989).
- Häger, J.: HPLC-Analyse von o-, m- und p-Tyrosin bei Verwendung einer β -Cyclodextrinsäule. *SozEp-Hefte*, Institut für Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes, Berlin. 178 (1994).
- Haire, D. L., G. Chen, E. G. Janzen, L. Frazer u. J. A. Lynch: Identification of irradiated foodstuffs: A review of the recent literature. *Food Res. Int.* 30, 249 (1997).
- Halasz, A., A. Barath, L. Simon-Sarkadi u. W. Holzapfel: Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.* 5, 42 (1994).
- Halliwell, B., J. M. C. Gutteridge u. C. E. Cross: Free radicals, antioxidants and human disease - where are we now. *J. Laborat. Clin. Med.* 119, 598 (1992).
- Harriman, A.: Further comments on the redox potentials of tryptophan and tyrosine. *J. Phys. Chem.* 91, 6102 (1987).
- Hart, R. J., J. A. White u. W. J. Reid: Technical note: occurrence of o-tyrosine in non-irradiated foods. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23, 643 (1988).

- Hein, W., T. Simat u. H. Steinhart: Nachweis der Strahlenkonservierung proteinreicher Lebensmittel - flüssigchromatographische Bestimmung isomerer Tyrosine. *Lebensmittelchemie* 51, 95 (1997).
- Helle, N., C. Knopfe, G. Gebhardt, K. W. Bögl u. G. A. Schreiber: ESR- und HPLC-Untersuchungen zum Nachweis der gamma-Strahlung bei Eiern. *Z. Lebensm. Unters. Forsch* 197, 440 (1993).
- Helle, N., U. Ballin, V. Etzel u. R. Kruse: Etablierung analytischer Methoden zur Identifizierung bestrahlter Fische und Krebstiere. *Arch. Lebensmittelhyg.* 47, 13 (1996).
- Hoey, B. M. u. J. Butler: Repair of oxidised amino acid units in proteins by antioxidants. *Life Chem. Rep.* 3, 80 (1985).
- Hoey, B. M. u. J. Butler: The repair of oxidized amino acids by antioxidants. *Biochim. Biophys. Acta* 791, 212 (1984).
- Hoskins, J. A. u. L. J. Davis: Analysis of the isomeric tyrosines in mammalian and avian systems using HPLC. *J. Chromatogr.* 426, 155 (1988).
- Houee-Levin, C.: Radiolysis of proteins. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique* 91, 1107 (1994).
- Huggins, T. G., M. C. Wells-Knecht, N. A. Detorie, J. W. Baynes u. S. R. Thorpe: Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalysed oxidation. *J. Biol. Chem.* 268, 12341 (1993).
- IAEA, (Ed.): Food and Environmental Protection Newsletter - Supplement 1, 1 (1998).
- Ibe, F. I., R. Grinter, R. Massey u. R. Homer: Detection of o-tyrosine in irradiated chicken by RP-HPLC and fluorescence detection. *Food Addit. Contam.* 8, 787 (1991).

-
- Ishimitsu, S., S. Fujimoto u. A. Ohara: Determination of m-tyrosine and o-tyrosine in human serum by HPLC with fluorimetric detection. *J. Chromatogr.* 378, 222 (1986).
- Ishimitsu, S., S. Fujimoto u. A. Ohara: Studies on the formation of 3,4-dihydroxyphenylalanine, m-tyrosine and o-tyrosine from L-phenylalanine by rat liver and adrenal. *Chem. Pharm. Bull.* 1, 279 (1988).
- Ishimitsu, S., S. Fujimoto u. A. Ohara: Tyrosine formation from phenylalanine by ultraviolet irradiation. *Chem. Pharm. Bull.* 38, 1417 (1990).
- Ishimitsu, S., S. Fujimoto u. A. Ohara: HPLC determination of m-tyrosine and o-tyrosine in rat urine. *J. Chromatogr.* 489, 377 (1989).
- Karam, L. R. u. M. G. Simic: Detecting irradiated foods: use of hydroxyl radical biomarkers. *Anal. Chem.* 60, 1117 (1988).
- Karam, L. R. u. M. G. Simic: Formation of o-tyrosine by radiation and organic solvents in chicken tissue. *J. Biol. Chem.* 265, 11581 (1990).
- Karam, L. R. u. M. G. Simic: Mechanisms of free radical chemistry and biochemistry of benzene. *Environ. Health Perspec.* 82, 37 (1989).
- Karam, L. R., D. S. Berthold u. M. G. Simic: Biomarkers of hydroxyl radical damage in vivo. *Free Radical Res. Commun.* 12-13, 11 (1991).
- Kaur, H. u. B. Halliwell: Aromatic hydroxylation of phenylalanine as an assay for hydroxyl radicals - measurement of hydroxyl radical formation from ozone and in blood from premature babies using improved HPLC methodology. *Anal. Biochem.* 220, 11 (1994).
- Kaur, H. u. B. Halliwell: Detection of hydroxyl radicals by aromatic hydroxylation. *Methods Enzymol.* 233, 67 (1994).

-
- Kaur, H., I. Fagerheim, M. Grootveld, A. Puppo u. B. Halliwell: Aromatic hydroxylation of phenylalanine as an array for hydroxyl radicals: Application to activated human neutrophils and to the heme protein leghemoglobin. *Anal. Biochem.* 172, 360 (1988).
- Kirkland, J. J. u. J. J. DeStefano: High-pH HPLC with silica-based column packings. *GIT Special* 62 (1996).
- Kirkland, J. J.: Stability of silica-based, monofunctional C18 bonded phase column packing for HPLC at high pH. *J. Chromatogr. Sci.* 34, 309 (1996).
- Krach, C., G. Sonntg, S. Solar u. N. Getoff: HPLC with coulometric electrode array detection - Determination of o- and m-tyrosine for identification of irradiated shrimps. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 204, 417 (1997).
- Krajnik, P., R. M. Quint, S. Solar, N. Getoff u. G. Sontag: Influence of temperature and oxygen concentration on the radiation induced oxidation of phenylalanine. *Z. Naturforsch.* 50a, 864 (1995).
- Mager, H. I. X. u. S.-C. Tu: A novel hydroxylation of aromatics in a flavin-initiated chain reaction. *Tetrahedron Lett.* 50, 6759 (1994).
- Maskos, Z. u. J. D. Rush: The hydroxylation of phenylalanine and tyrosine: A comparison with salicylate and tryptophan. *Arch. Biochem. Biophys.* 296, 521 (1992).
- Meier, W., H. Hediger, A. Artho u. E. J. M. Meier: Determination of o-tyrosine in shrimps, fish, mussels and egg-white. *SozEp-Hefte, Institut für Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes, Berlin.* 88 (1994).
- Meier, W., R. Bürgin u. D. Fröhlich: Analysis of o-tyrosine as a method for the identification of irradiated chicken meat. *Beta-Gamma* 1, 34 (1988).
- Meier, W., R. Bürgin u. D. Fröhlich: Nachweis von bestrahltem Frischfleisch (Poulet) mittels o-Tyrosin. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 80, 22 (1989).

-
- Meier, W.: Analysis of irradiated food (o-tyrosine and volatiles). Comm. Eur. Com. [Rep.] EUR 14315, 227 (1993).
- Meier, W.: Chemical methods of the detection of irradiated food. Comm. Eur. Com. [Rep.] EUR 13331, 194 (1991).
- Meier, W.: personal Communication (1998).
- Mischke, J., M. Vöhringer, N. Helle, K. W. Bögl u. G. A. Schreiber: Determination of o-tyrosine in irradiated protein containing foods by HPLC. SozEp-Hefte, Institut für Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes, Berlin, 94 (1993).
- Niess, A. M., S. Veihelmann, F. Passek, K. Roecker, H. H. Dickhuth, H. Northoff u. E. Fehrenbach: Belastungsinduzierter oxidativer Stress: DNA-Schäden und Expression von Stressproteinen in Leukozyten - Eine Übersicht. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin 48, 330 (1997).
- Pal, H., D. K. Palit, T. Mukherjee u. J. P. Mittal: Some aspects of the steady state and time resolved fluorescence of o-tyrosine and related compounds. J. Photochem. Photobiol. 52, 391 (1990).
- Pal, H., D. Palit, T. Mukherjee u. J. P. Mittal: The fluorescence lifetimes of isomeric tyrosines. Chem. Phys. Letters 151, 75 (1988).
- Phenomenex: personal Communication (1999).
- Rizzo, V. u. G. M. D'Eri: Determination of neurochemicals in biological fluids by using an automated HLPC system with a coulometric detector. J. Chromatogr. 536, 229 (1991).
- Schreiber, G. A., N. Helle u. K. W. Bögl: Detection of irradiate foods - methods and routine application. Internat. J. Radiat. Biol. 63, 105 (1993).
- Scientific Committee on Food: Opinion of the Scientific Committee on Food on the irradiation of eight foodstuffs. The European Commission - Directorate General, DG XXIV - Outcome of Discussions 15 (1998).

- Simat, T., B. van Wickern, K. Eulitz u. H. Steinhart: Contaminants in biotechnological manufactured L-tryptophan. *J. Chromatogr. B* 685, 41 (1996).
- Souci, S. W., W. Fachmann and H. Kraut: Die Zusammensetzung der Lebensmittel - Nährwert-Tabellen, 5. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1994).
- SSNCPES: Le pasteurisation des crevettes décortiqués ou étêtées, congelées ou surgelées par traitement au rayonnement gamma. Unpublished dossier submitted by the French Permanent Representation to the EU (1985).
- Stevenson, M. H. u. E. M. Stewart: Identification of irradiated food: The current status. *Radiat. Phys. Chem.* 46, 653 (1995).
- Stevenson, M. H.: Identification of irradiated foods. *Food Technol.* 48, 141 (1994).
- Sun, J. Z., H. Kaur, B. Halliwell, X. Y. Li u. R. Bolli: Use of aromatic hydroxylation of phenylalanine to measure production of hydroxyl radicals after myocardial ischemia in vivo. *Circulation Research* 73, 534 (1993).
- Thakur, B. R. u. R. K. Singh: Food irradiation - chemistry and applications. *Food Rev. Internat.* 10, 437 (1994).
- U. Schulte: Der Bestrahlungsprozess in der Anlage, Band 4. Der Fachberater - Sonderdruck - Bestrahlung von Lebensmitteln, R. Eidenberger (Ed.), W. Wächter, Bremen, S. 219 (1995).
- Ulrich, K.: Vergleichende Biochemie der Tiere, Band 12 Niedermolekulare Stickstoffverbindungen, G. Fischer Verlag, Stuttgart, S. 357 (1990).
- van der Vliet, A., C. A. O'Neill, B. Halliwell, C. E. Cross u. H. Kaur: Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxyxynitrite. Evidence for hydroxyl radical production from peroxyxynitrite. *FEBS Letters* 339, 89 (1994).

-
- von Sonntag, C.: The chemical basis of radiation biology, Taylor and Francis Ltd., London (1987).
- Wang, D. u. C. von Sonntag: Radiation induced oxidation of phenylalanine. Comm. Eur. Com. [Rep.] EUR 13331, 207 (1991).
- Wang, D., H.-P. Schuchmann u. C. von Sonntag: Phenylalanine: its OH⁻ and SO₄⁻ -induced oxidation and decarboxylation. A pulse radiolysis and product analysis study. Z. Naturforsch. 48b, 761 (1993).
- Weber, R. E. u. W. J. A. Marrewijk: Free amino acids in the shrimp *Crangon crangon* and their osmoregulatory significance. Neth. J. Sea Res., 391 (1972).
- White, Audrey: Effect of pH on fluorescence of tyrosine, tryptophan and related compounds. Biochem. J. 71, 217 (1959).
- WHO: Conclusions of the Joint FAO/IAEA/WHO Study Group on High Dose Irradiation. Weekly Epidemiological Record 73 (1998).
- WHO: Review of the safety and nutritional adequacy of irradiated food, WHO, Geneva (1992).
- Zoller, O., D. Schöni u. B. Zimmerli: Determination of o-tyrosine in irradiated chicken. Comm. Eur. Com. [Rep.] EUR 14315, 217 (1993).
- Zoller, O.: Determination of o- and m-tyrosine in chicken meat. Comparison of an HPLC and a GC-MS procedure. Comm. Eur. Com. [Rep.] EUR 14315, 241 (1993).

13 Anhang

13.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Gefahrensymbol; R- und S-Sätze
Aceton	Promonta	F; R: 11; S: 9-16-23.2-33
Acetonitril	Merck	F, T; R: 11-23/24/25; S: 16-27-45
Hydroxylamin	Merck	C; R: 34-43; S: 26-37/39
Kaliumhydroxid		C; R: 35; S: 26-37/39-45
LiChroprep RP18	Merck	S: 22
L-m-Tyrosin	Sigma	
L-o-Tyrosin	Sigma	
L-p-Tyrosin	Merck	
Methanol	Merck	F, T; R: 35; S: 7-16-24-45
Natriumhydroxid	Merck	C; R: 35; S: 26-37/39-45
N-Methylpiperidin	Aldrich	F, C; R: 11-34; S: 9-16-26-33
Salzsäure 37%	Merck	C; R: 34-37; S: 26-36/37/39-45
Trifluoressigsäure	Merck	C; R: 20-35; S: 9-26-27-28.1-45
Tryptamin	Merck	

13.2 Geräte

13.2.1 HPLC

Pumpe	Merck-Hitachi L-6200A Intelligent Pump
Probenaufgabe	Merck-Hitachi 655A-40 Auto-Sampler
Detektoren	Merck-Hitachi F-1080 Fluorescence Detektor Merck Amperometrischer Detektor L-3500 Merck-Hitachi L 4000 UV-Detektor
Säulenthermostat	Labor TechnikBarkey Cosytherm
Auswertungssystem	Bruker-Franzen Analytik & SCPA Chromstar-Software, Version 4.03

13.2.2 Weitere Geräte

Photometer	Perkin-Elmer Lamda 2 UV/VIS Spectrophotometer
Gefriertrocknung	Christ LDC-2 Beta 1-16
Ethanol-Kühlbad	Christ FOC-1 K40
Zentrifuge	Sigma 3K12
Küchenmaschine	
Ultraturrax	
pH-Meßkette	Schott H6160
pH-Meter	Schott CG801

13.3 HPLC-Bedingungen

13.3.1 Trennsystem I

Trennsäule	CS, Nucleosil 120-3 C18, 250 × 4.0 mm
Vorsäule	Perisorb RP-C18, 25-40 µm, 20 × 2.0 mm
Säulentemperatur	35 °C
Eluenten	A: TFA 0.1 % B: Acetonitril
Flußrate	1 mL/min
Probenaufgabe:	40 µL

Minuten	Eluent A (%)	Eluent B (%)	
0	100	0	Trennung
28	100	0	
30	60	40	Spülung
36	60	40	
40	100	0	Äquilibrierung
50	100	0	

13.3.2 Trennsystem II

Trennsäule	Phenomenex Prodigy RP-C18 ODS (3), 5 µm, 250 × 4.6 mm
Vorsäule	Perisorb RP-C18, 25-40 µm, 20 × 2.0 mm
Säulentemperatur	35 °C
Eluenten	A: NMP (50 mmol/L); pH 9.0 B: Acetonitril
Flußrate	1 mL/min

Minuten	Eluent A (%)	Eluent B (%)	
	100	0	Trennung
	100	0	
	60	40	Spülung
	60	40	
	100	0	Äquilibrierung
	100	0	

13.4 Reinigung des N-Methylpiperidins

250 g NMP werden auf 50 g Kaliumhydroxid-Plätzchen gegeben und über eine 25-cm-Vigreuxkolonne unter Atmosphärendruck destilliert. Bei 106 °C erhält man klares NMP. Der Vorlauf sowie der Sumpf werden verworfen. Das destillierte NMP wird bei 4 °C gekühlt in Braunglasflaschen aufbewahrt.

13.5 Herstellung der Eluenten

13.5.1 Trennsystem I

1.00 mL TFA werden in eine Vorlage von bidestilliertem Wasser pipettiert . Es wird mit bidestilliertem Wasser auf 1.00 L aufgefüllt.

13.5.2 Trennsystem II

900 mL bidestilliertes Wasser werden in einem Becherglas vorlegt, und unter Rühren (Magnetrührer) werden genau 6.08 mL NMP hinzugefügt. Der pH-Wert wird mit Salzsäure-Lösung (6 mol/L) auf pH=9.0 eingestellt. Dies wird mit einer pH-Einstabmeßkette überwacht. Die Lösung wird vollständig in einen 100-mL-Meßkolben überführt, und es wird mit bidestilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration beträgt dann $C(\text{NMP}) = 0.05 \text{ mol/L}$.

13.6 Vorbereitung der Nordseegarnelen

Frische, gekochte Nordseegarnelen werden entschalt und das Garnelenfleisch in Portionen zu 50 g in PE-Folie vakuumverschweißt tiefgekühlt ($< -15\text{ °C}$) aufbewahrt.

Bereits entschalt gekauftes Garnelenfleisch wird ohne weitere Vorbereitung eingefroren.

Garnelensuppen werden durch ein Küchensieb gegossen und die Garnelen mit der Pinzette herausgelesen.

Garnelencocktails und -salate werden in ein Küchensieb gegeben und die jeweilige Soße mit handwarmem Leitungswasser kurz abgespült. Die Garnelen werden ebenfalls vakuumverschweißt tiefgefroren.

Zur weiteren Aufarbeitung wird das Garnelenfleisch nicht aufgetaut. Die Verarbeitung erfolgt im tiefgefrorenen Zustand.

13.7 Proben für die Verfahrensvalidierung

Gekühlte entschaltete Garnelen werden in einer Moulinette grob zerkleinert. Je 1.00 g der grob zerkleinerten Probe wird in 15-mL-Zentrifugenröhrchen¹ genau eingewogen. Dann wird jeweils 1.00 mL der entsprechenden o-Tyr-Standardlösung zugegeben (Standardlösungen: 75, 150, 225, 300 ng/mL in HCl-Lösung (0.1 mol/L)). Anschließend werden 2.0 mL HCl-Lösung (0.1 mol/L in bidest. H₂O) dazugegeben.

Ab hier entspricht die Aufarbeitung dem in "Anhang - Gewinnung des Cytosols" beschriebenen Verfahren.

Es resultieren Proben mit einer Konzentration an o-Tyr von 75, 150, 225, 300 µg/kg.

¹ SIGMA Centrifuge Tubes, 15 mL graduiert, konisch, Polypropylen, bis 6000 × g

13.8 Gewinnung des Cytosols

- gekühlte entschaltete Garnelen werden in einer Moulinette grob zerkleinert
- je 1 g der grob zerkleinerten Probe wird in 15-mL-Zentrifugenröhrchen² genau eingewogen
- 3.0 mL HCl-Lösung (0.1 mol/L in bidest H₂O) werden dazugegeben
- der Inhalt des Zentrifugenröhrchens wird mit dem Homogenisator bei 20000 U/min 30 Sekunden lang homogenisiert
- mit 1.0 mL HCl-Lösung (0.1 mol/L in bidest H₂O) wird der Homogenisator gewaschen
- es wird für 30 Minuten bei 5500 × g und 10 °C zentrifugiert
- der klare Überstand wird mit einer Pasteurpipette in ein zweites Zentrifugenröhrchen überführt
- 11.0 mL Aceton werden zugegeben
- das Zentrifugenröhrchen wird für mindestens 2 Stunden bei -15 °C gekühlt
- es wird für 30 Minuten bei 5500×g und 0 °C zentrifugiert
- der klare Überstand wird in ein 20-mL-Polypropylen-Probenflaschen abgegossen
- es wird einmal mit 1.0 mL Aceton nachgespült
- der Aceton wird mit Stickstoff abgeblasen (ca. 1 Stunde)
- die Proben werden eingefroren und werden über Nacht gefriergetrocknet
- das Lyophilisat wird mit 1.00 mL HCl-Lösung (0.1 mol/L) aufgenommen
- die Probe wird mit einer Sterican-Kanüle auf eine 2-mL-Injektionsspritze gezogen und durch einen Membranfilter³ in ein Probenvial (1.5 mL, Braunglas) filtriert
- die Lösungen werden bei - 15 °C tiefgekühlt aufbewahrt

² SIGMA Centrifuge Tubes, 15 mL graduiert, konisch, Polypropylen, bis 6000 × g

³ Schleicher&Schüll, Spartan 13/20, 0.45 µm

13.9 UV-Scans

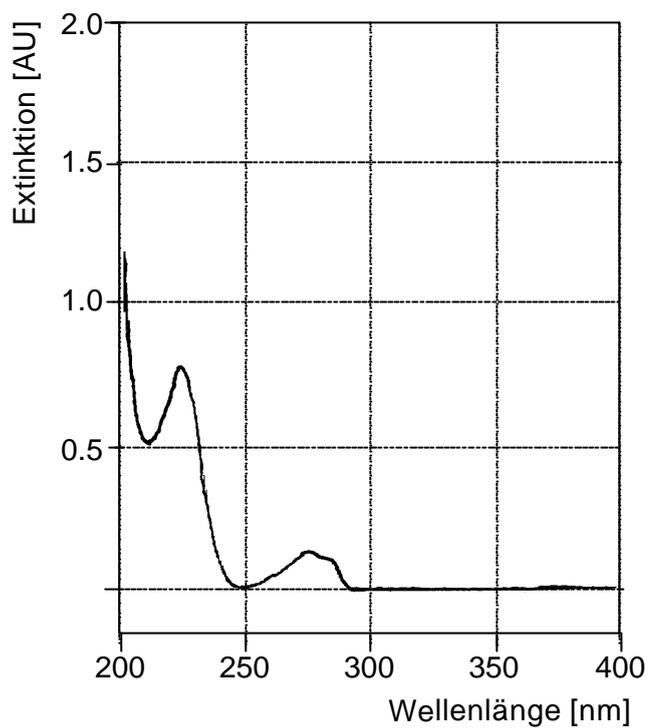


Abbildung 13: UV-Scan einer wässrigen p-Tyr-Lösung; $l = 200 - 400\text{nm}$; $C = 18\text{ mg/L}$

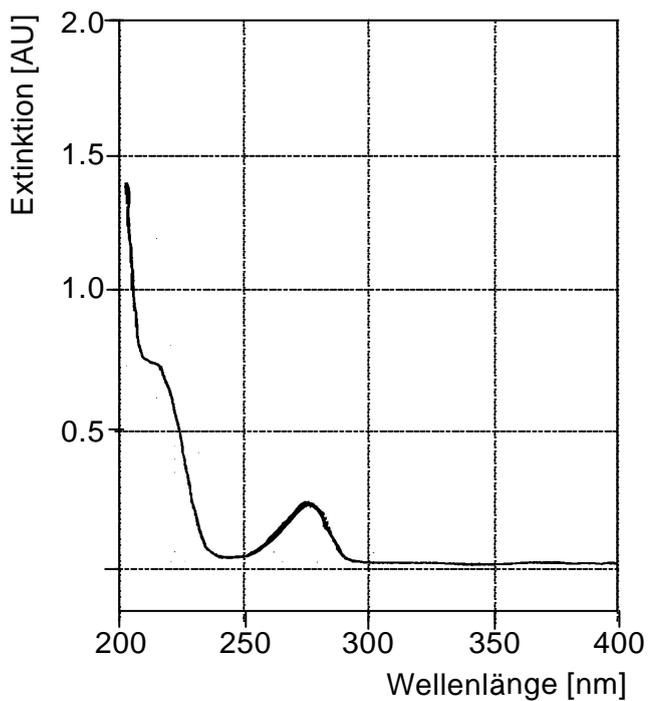
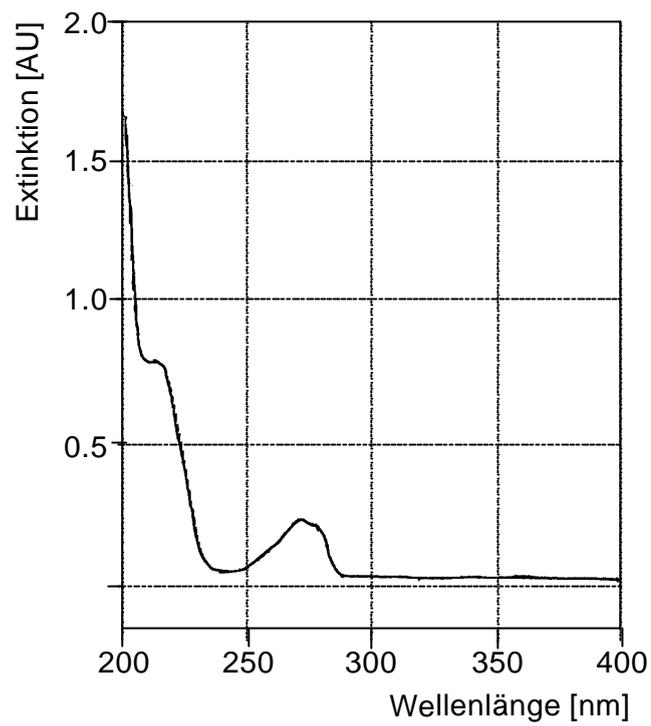


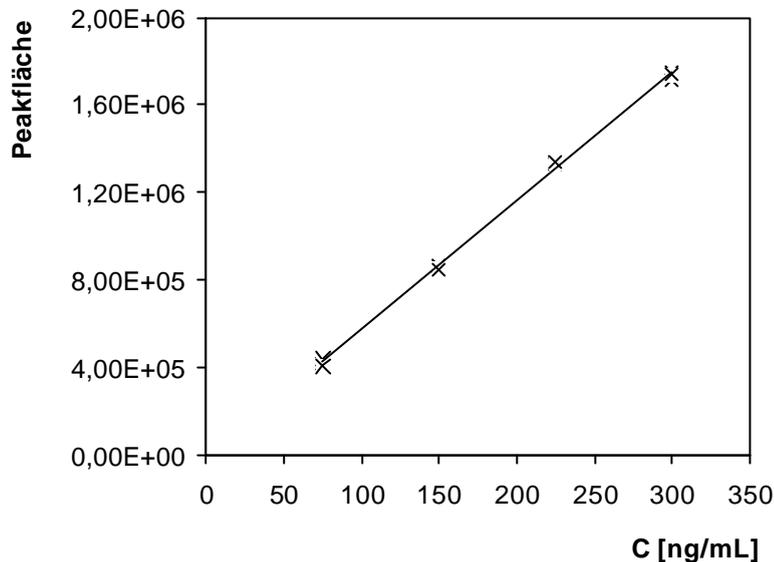
Abbildung 14: UV-Scan einer wässrigen m-Tyr-Lösung; $l = 200 - 400\text{nm}$; $C 16\text{ mg/L}$



**Abbildung 15: UV-Scan einer wässrigen o-Tyr-Lösung; $l = 200 - 400\text{nm}$;
 $C = 19\text{ mg/L}$**

13.10 Verfahrensentwicklung und Validierung

13.10.1 Grundkalibrierung mit Trennsystem I



C [ng/mL]	Peakfläche
75	417505
75	437764
75	402524
150	866249
150	862920
150	847657
225	1329040
225	1332959
225	1338966
300	1750896
300	1713098
300	1739429

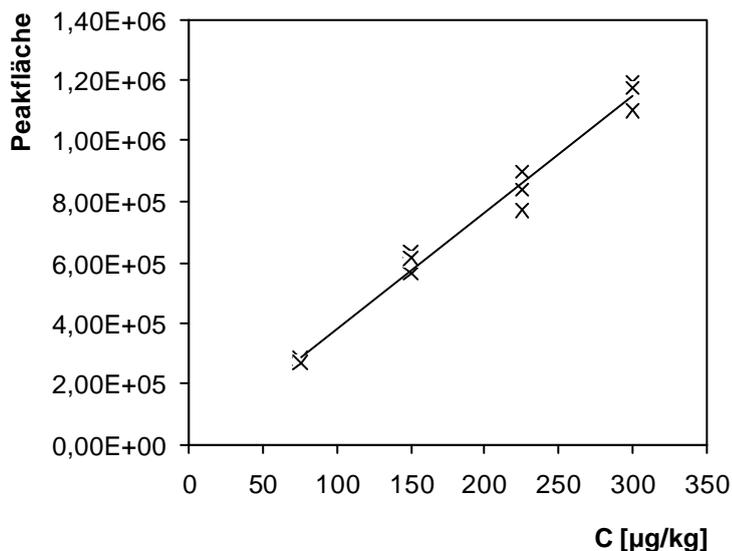
Abbildung 16: Grundkalibrierung o-Tyr; Trennsystem I

Kalibrierfunktion: $y = 5893.8 x - 18502$; $r = 0.9993$

Reststandardabweichung = 21296; Verfahrensstandardabweichung = 3.61 ng/mL

Verfahrensvariationskoeffizient = 1.93 %

13.10.2 Matrixkalibrierung mit Trennsystem I



C [µg/kg]	Peakfläche
75	267393
75	283409
75	271357
150	562912
150	637700
150	614483
225	771559
225	841375
225	897223
300	1193897
300	1099363
300	1173349

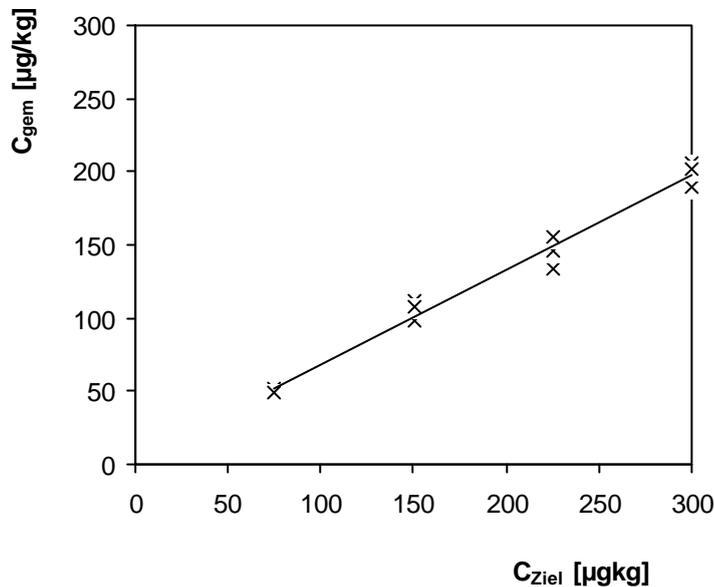
Abbildung 17: Matrixkalibrierung o-Tyr; Trennsystem I

Kalibrierfunktion: $y = 3834.8 x - 1198.7$; $r = 0.9915$

Reststandardabweichung = 46115.2; Verfahrensstandardabweichung = 12.03 µg/kg

Verfahrensvariationskoeffizient = 6.41 %

13.10.3 Wiederfindung mit Trennsystem I



C_{Ziel} [µg/kg]	C_{gem} [µg/kg]
75	48,51
75	51,23
75	49,18
150	98,65
150	111,34
150	107,40
225	134,05
225	145,90
225	155,37
300	205,71
300	189,67
300	202,22

Abbildung 18: Wiederfindungsplot o-Tyr; Trennsystem I

Wiederfindungsfunktion: $y = 0.6678 x + 6.85$; $r = 0.9915$

Wiederfindungsrate = 65.1 %

13.10.4 Nachweisgrenze von Trennsystem I

Kalibriergerade berechnet aus den Peakhöhen der Grundkalibrierung:

$$y = 0.305x + 1.265$$

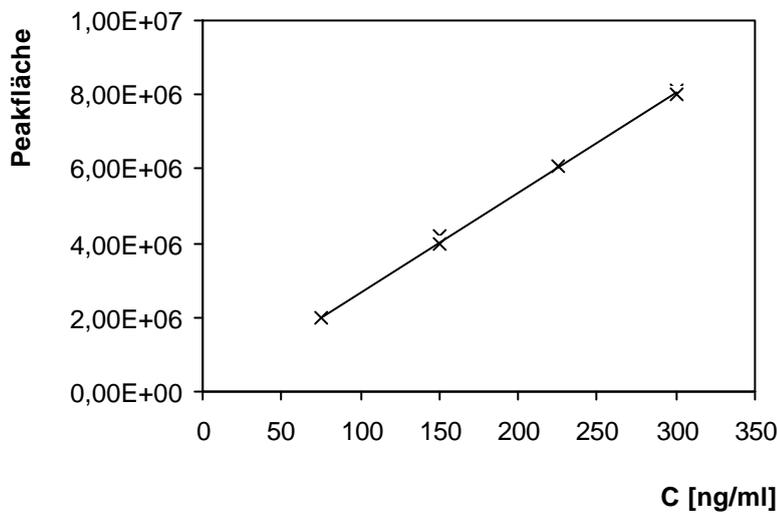
Grundrauschen gemessen in Grundkalibrierung:

Grundrauschen = 2.3 mV

Nachweiskriterium ($2 \times$ Grundrauschen) = 4.6 mV

Nachweisgrenze = 10.9 ng/mL

13.10.5 Grundkalibrierung mit Trennsystem II



C [ng/mL]	Peakfläche
75	1989852
75	1895520
75	2001220
150	4215150
150	4201537
150	3985260
225	5958741
225	5963251
225	6085423
300	8095822
300	8125698
300	7986552

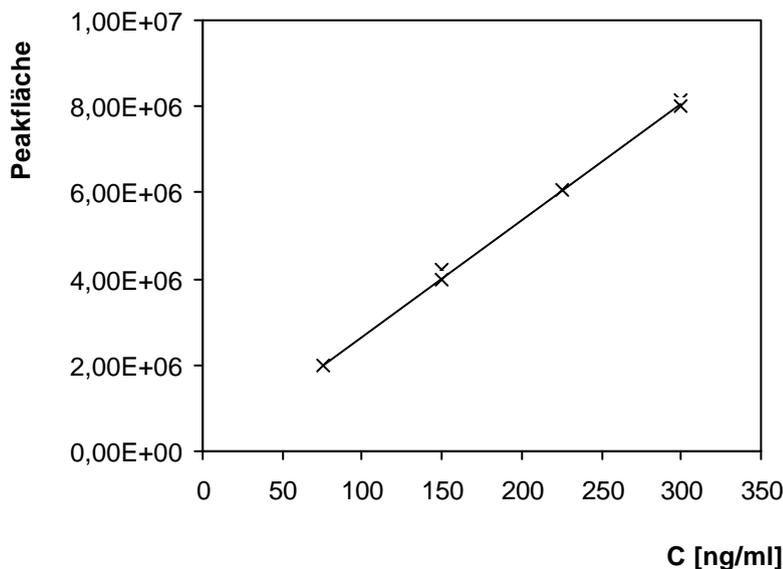
Abbildung 19: Grundkalibrierung o-Tyr; Trennsystem II

Kalibrierfunktion: $y = 26920 x - 5490.2$; $r = 0.9991$

Reststandardabweichung = 90685; Verfahrensstandardabweichung = 3.36 ng/mL

Verfahrensvariationskoeffizient = 1.79 %

13.10.6 Matrixkalibrierung mit Trennsystem II



C [µg/kg]	Peakfläche
75	1013216
75	1426067
75	1127359
150	2519067
150	2216414
150	2835739
225	3618053
225	3557089
225	4015738
300	5562875
300	5221106
300	5059040

Abbildung 20: Matrixkalibrierung o-Tyr; Trennsystem II

Kalibrierfunktion: $y = 17977 x - 189753$; $r = 0.9890$

Reststandardabweichung = 246481; Verfahrensstandardabweichung = 13.71 µg/kg

Verfahrensvariationskoeffizient = 7.31 %

13.10.7 Wiederfindung mit Trennsystem II

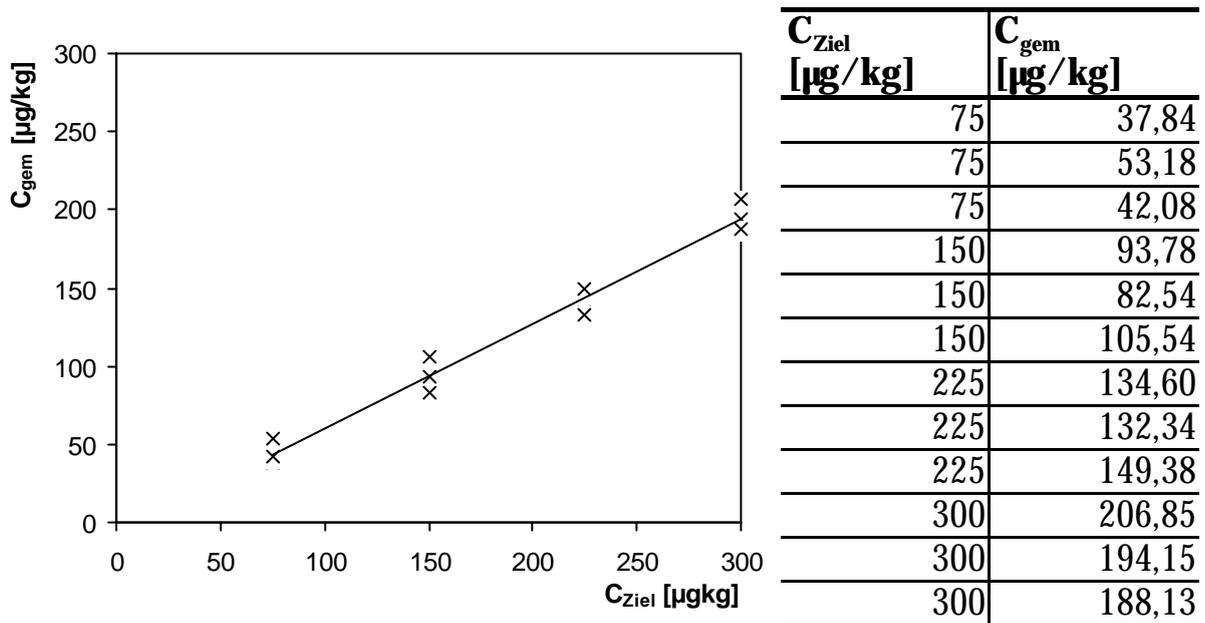


Abbildung 21: Wiederfindungsplot o-Tyr, Trennsystem II

Wiederfindungsfunktion: $y = 0.6507 x + 2.94$; $r = 0.9890$

Wiederfindungsrate = 65.1 %

13.10.8 Nachweisgrenze von Trennsystem II

Kalibriergerade berechnet aus den Peakhöhen der Grundkalibrierung:

$$y = 1.97x - 0.981$$

Grundrauschen gemessen in Grundkalibrierung:

Grundrauschen = 2.4 mV

Nachweiskriterium ($2 \times$ Grundrauschen) = 4.8 mV

Nachweisgrenze = 2.9 ng/mL

13.11 Untersuchung g-bestrahlter Proben

13.11.1 Messwerte nach Trennung mit Trennsystem I

Tabelle 11: o-Tyr in der Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren; Trennsystem I

Energiedosis (kGy)	Einwaage (g)	Peakfläche	Gehalt (µg/kg)	Mittelwert (µg/kg)	Stabw. (µg/kg)
0	0,9893	92149	23,97		
0	1,0719	100666	24,20		
0	0,968	83863	22,27		
0	1,0674	57583	13,77		
0	0,989	49556	12,75	19,39	5,66
1	0,9522	825577	225,76		
1	1,0122	859366	221,09		
1	1,0031	813637	211,20		
1	1,0078	850054	219,64		
1	0,9641	816361	220,49	219,64	5,28
3	1,0462	1609944	400,99		
3	1,0435	1672386	417,63		
3	1,0307	1865314	471,63		
3	1,0458	1994811	497,11		
3	1,0282	2037930	516,55	460,78	49,96
5	0,9562	2066343	563,20		
5	0,9768	2587200	690,37		
5	1,028	2348994	595,56		
5	1,1083	2872083	675,48		
5	1,0434	2672409	667,60	638,44	55,72

13.12 Untersuchung eines kleinen Warenkorbes

Tabelle 12: o-Tyr in der Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren; Trennsystem I, Trennsystem II

Probenart	ID-Nr.	Einwaage [g]	Trennsystem I		Trennsystem II	
			C (o-Tyr) [µg/kg]	MW [µg/kg]	C (o-Tyr) [µg/kg]	MW [µg/kg]
"Büsumer Krabbensuppe"	01 a	1,0562	20.47		27.00	
	01 b	1,0173	15.96	18.22	28.54	27.77
"Original Hamburger Krabbensuppe"	02 a	1,0578	n.n.		n.n.	
	02 b	1,0159	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Nordseekrabben, gekocht, geschält	04 a	1,0340	15.71		74.35	
	04 b	0,9909	13.73	14.72	64.43	69.39
Nordseekrabben, gekocht, geschält	07 a	1,0820	14.04		40.88	
	07 b	1,0367	13.32	13.68	27.31	34.10
Nordseekrabben, gekocht, geschält	09 a	0,9859	13.31		27.12	
	09 b	0,9997	12.84	13.07	26.01	26.56
frische ungeschälte Garnelen	13 a	1,0463	n.n.		66.26	
	13 b	1,0378	n.n.	n.n.	69.21	67.74
"Nordsee-Krabben-Salat"	05 a	1,0542	n.n.		33.01	
	05 b	1,0454	n.n.	n.n.	37.68	35.34
"Nordsee-Krabben-Salat"	06 a	1,0310	n.n.		28.69	
	06 b	0,9858	n.n.	n.n.	27.37	28.03
"Nordsee-Krabben-Salat"	08 a	1,0097	n.n.		23.46	
	08 b	1,003	n.n.	n.n.	20.94	22.20
"Nordsee-Krabben-Salat"	11 a	1,0495	n.n.		n.n.	
	11 b	1,0359	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
"Nordsee-Krabben-Salat"	12 a	1,0375	n.n.		32.65	
	12 b	1,0264	n.n.	n.n.	39.47	36.06

13.13 Chromatogramme

13.13.1 Chromatogramme einer Standard-Lösung

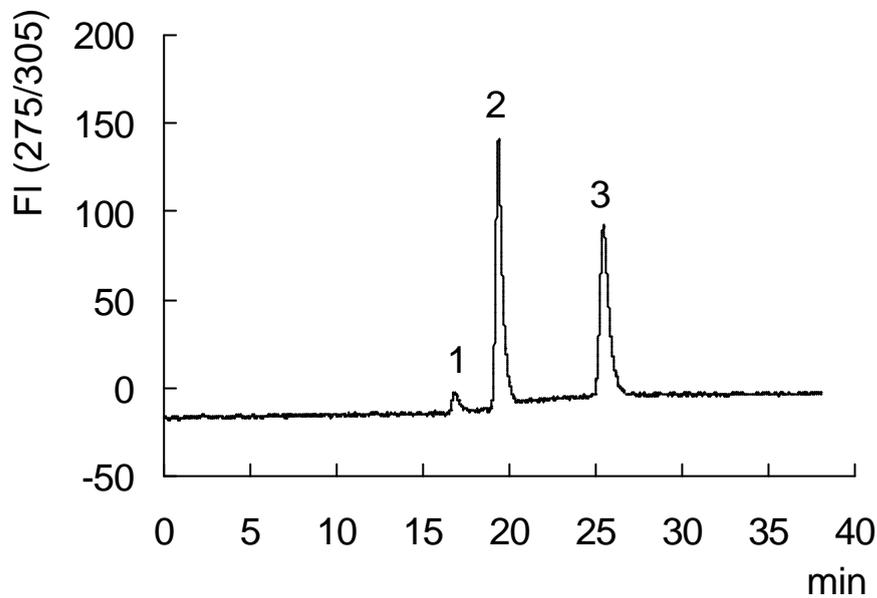


Abbildung 22: Chromatogramm in einer Standard-Lösung (300 mg/L); Trennsystem I; 1 p-Tyr, 2 m-Tyr, 3 o-Tyr

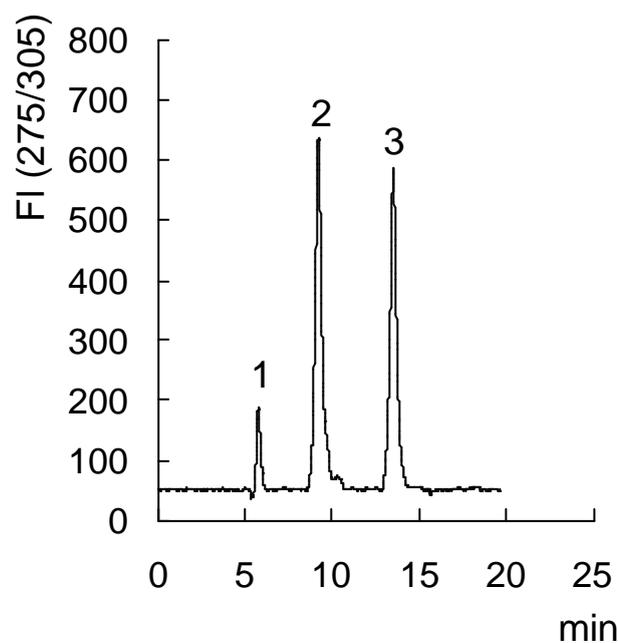


Abbildung 23: Chromatogramm einer Standard-Lösung (300 mg/L); Trennsystem II; 1 p-Tyr, 2 m-Tyr, 3 o-Tyr

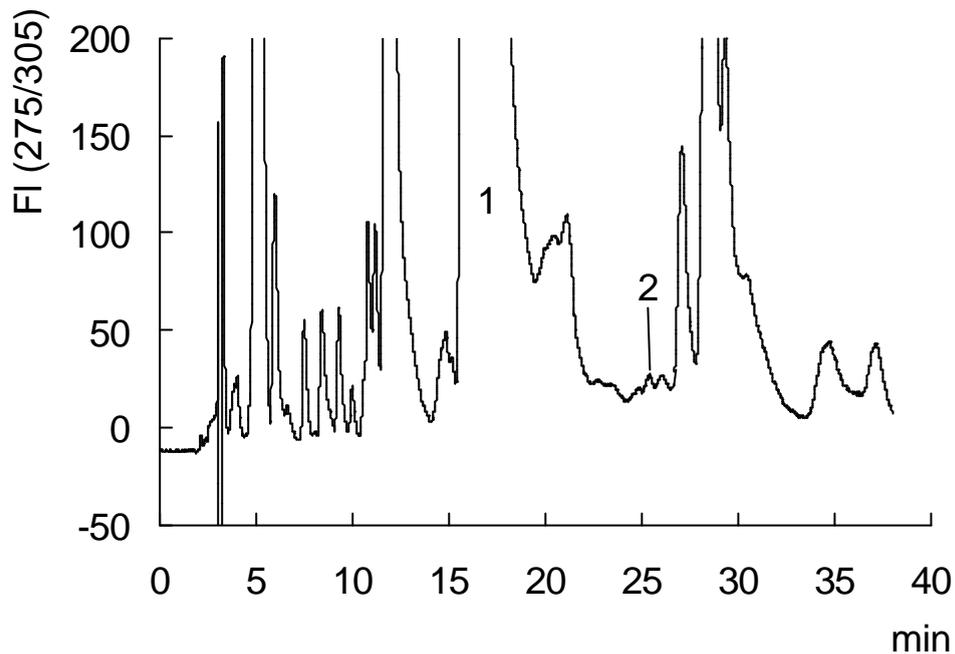
13.13.2 Chromatogramme einer unbestrahlten Garnelen-Probe

Abbildung 24: Chromatogramm einer unbestrahlten Garnelen-Probe; Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren; Trennsystem I; 1 p-Tyr, 2 o-Tyr

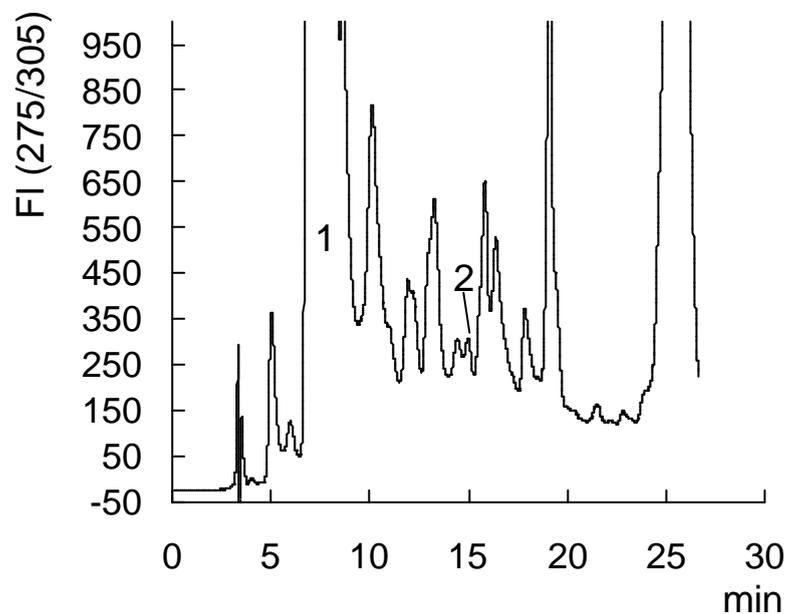


Abbildung 25: Chromatogramm einer unbestrahlten Garnelen-Probe; Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren; Trennsystem II; 1 p-Tyr, 2 o-Tyr

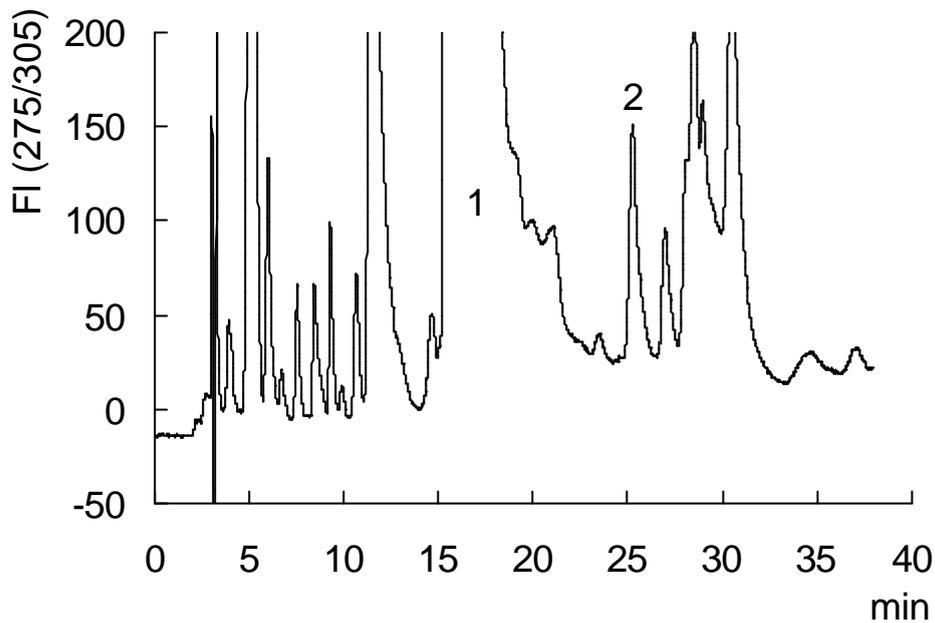
13.13.3 Chromatogramme einer bestrahlten Garnelen-Probe

Abbildung 26: Chromatogramm einer mit 3 kGy bestrahlten Garnelen-Probe; Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren; Trennsystem I; 1 p-Tyr, 2 o-Tyr

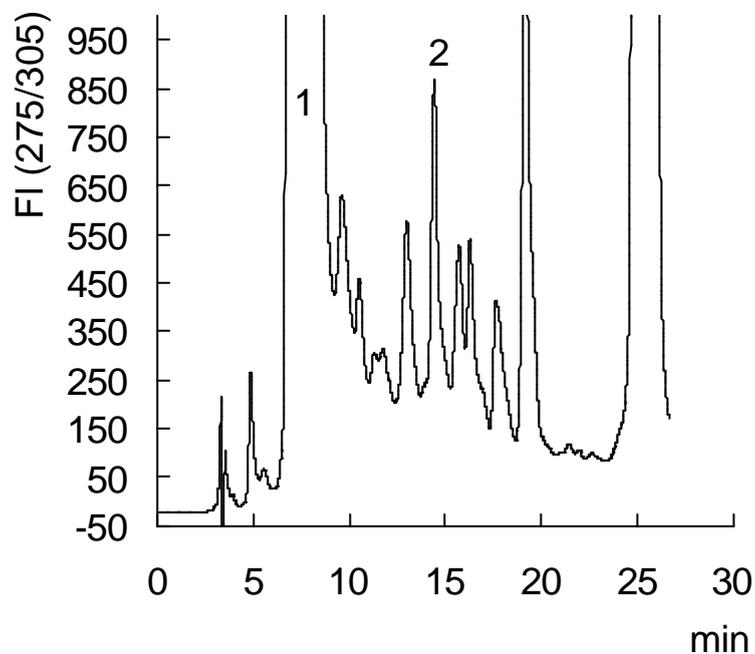


Abbildung 27: Chromatogramm einer mit 1 kGy bestrahlten Garnelen-Probe; Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren; Trennsystem II; 1 p-Tyr, 2 o-Tyr

13.13.4 Chromatogramme einer mit o-Tyr dotierten, unbestrahlten Garnelen-Probe

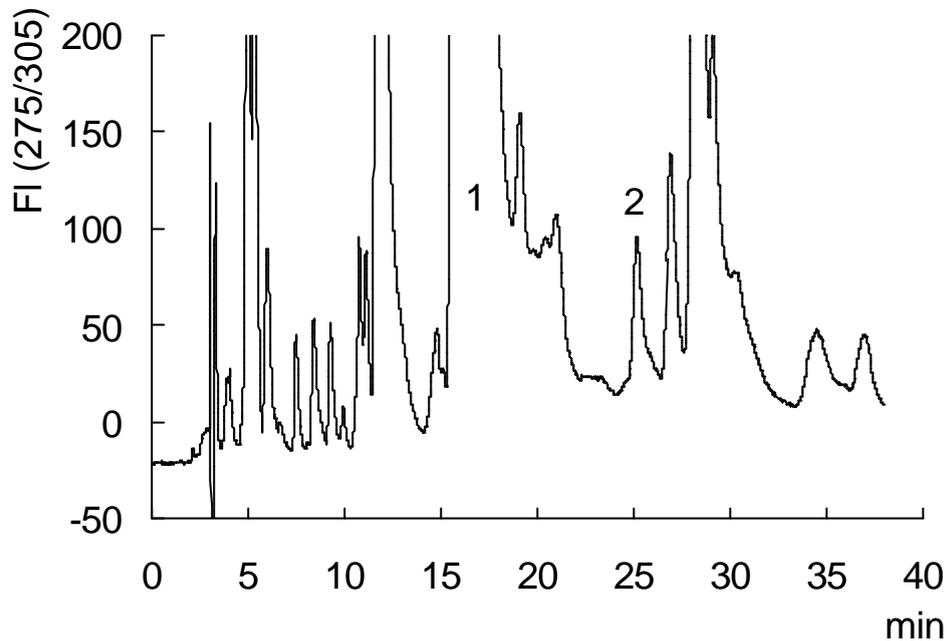


Abbildung 28: Chromatogramm einer mit 300 µg/kg o-Tyr dotierten unbestrahlten Garnelen-Probe; Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren; Trennsystem I; 1 p-Tyr, 2 o-Tyr

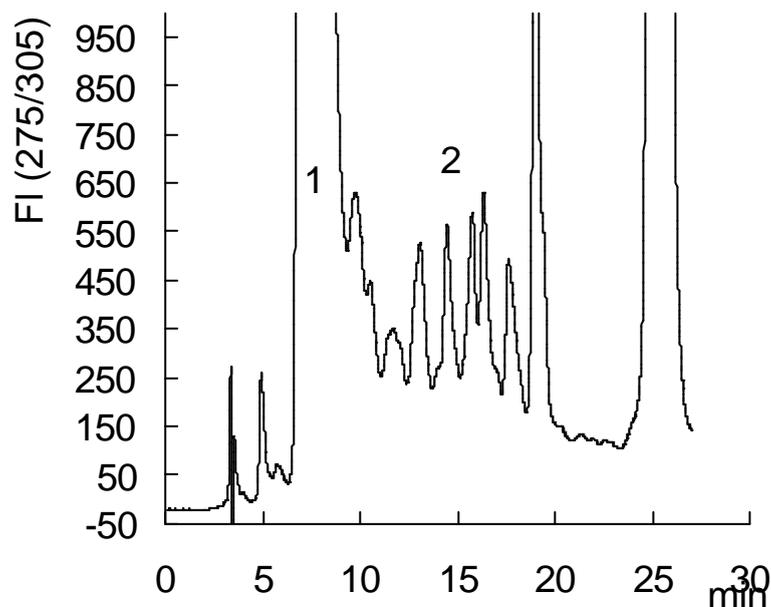


Abbildung 29: Chromatogramm einer mit 300 µg/kg o-Tyr dotierten unbestrahlten Garnelen-Probe; Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren; Trennsystem II; 1 p-Tyr, 2 o-Tyr

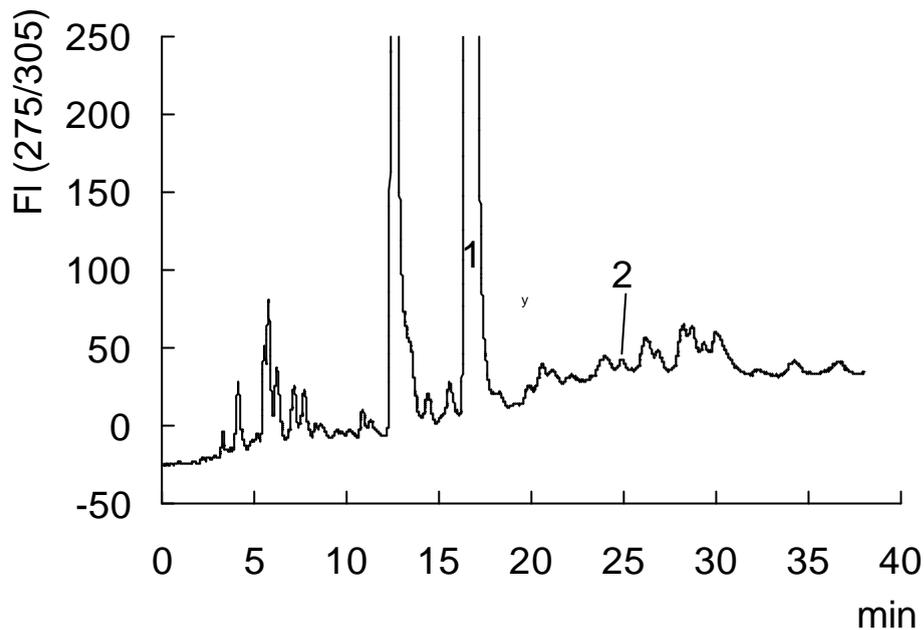
13.13.5 Chromatogramme einer "Krabbensuppe"

Abbildung 30: Chromatogramm der Garnelen aus einer "Krabbensuppe"; Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren; Trennsystem I; 1 p-Tyr, 2 o-Tyr

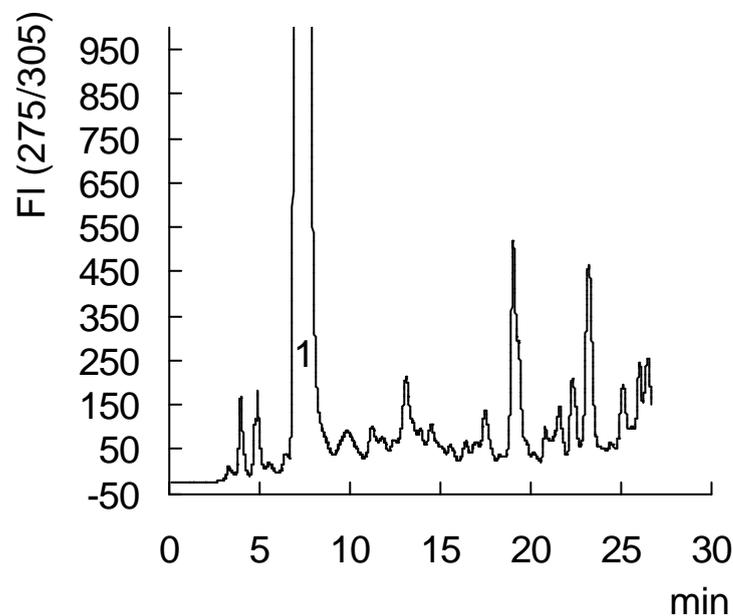


Abbildung 31: Chromatogramm der Garnelen aus einer "Krabbensuppe"; Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren; Trennsystem II; 1 p-Tyr

13.13.6 Chromatogramme eines "Krabbensalates"

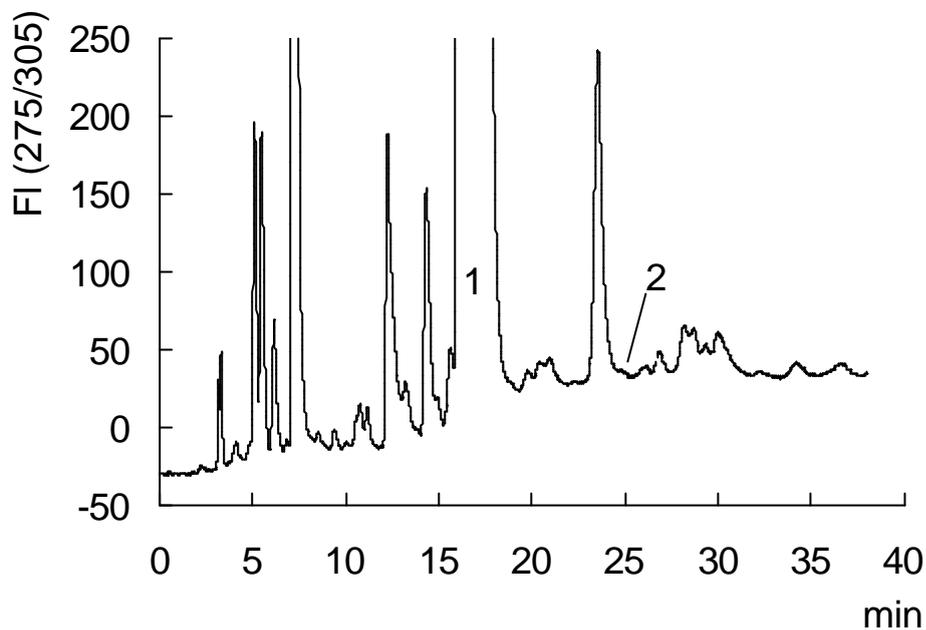


Abbildung 32: Chromatogramm der Garnelen aus einem "Krabbensalat"; Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren; Trennsystem I; 1 p-Tyr, 2 o-Tyr

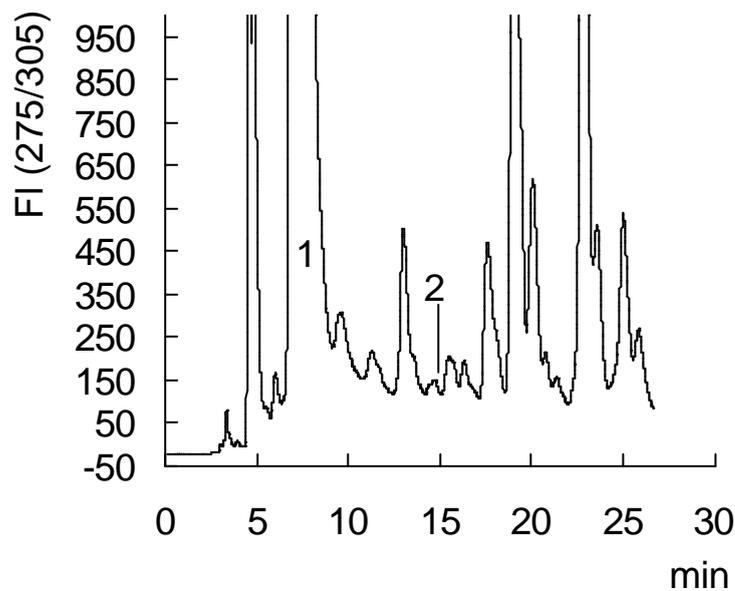


Abbildung 33: Chromatogramm der Garnelen aus einem "Krabbensalat"; Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren; Trennsystem II; 1 p-Tyr, 2 o-Tyr

13.13.7 Chromatogramme von "Krabbenfleisch"

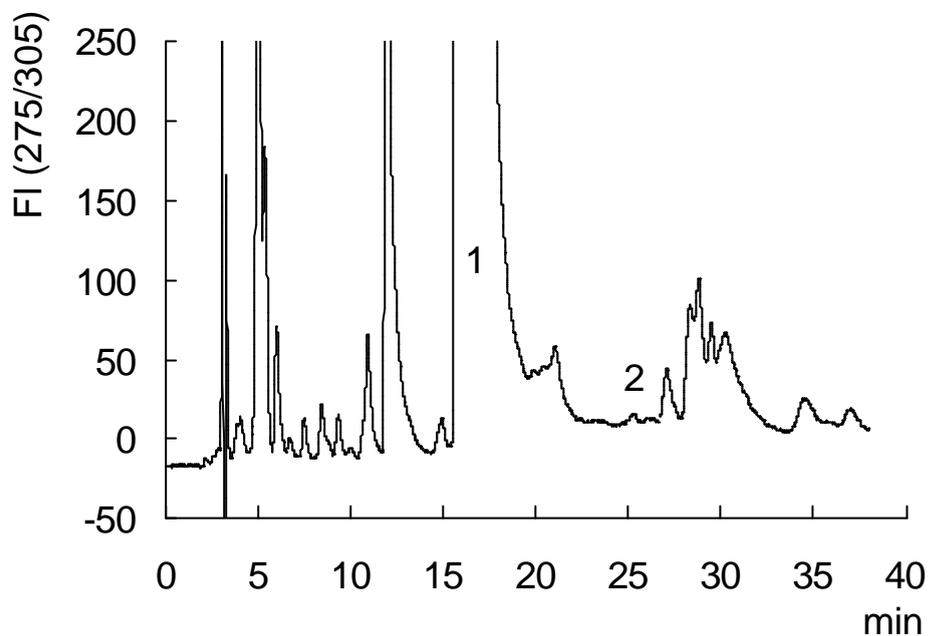


Abbildung 34: Chromatogramm von "Krabbenfleisch"; Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren; Trennsystem I; 1 p-Tyr, 2 o-Tyr

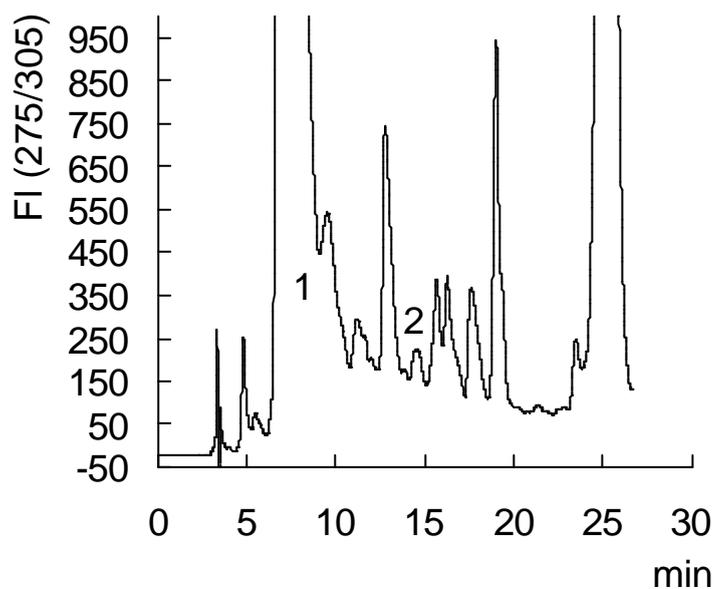


Abbildung 35: Chromatogramm von "Krabbenfleisch"; Fraktion der nicht proteingebundenen Aminosäuren; Trennsystem I; 1 p-Tyr, 2 o-Tyr

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Wolfgang Gernot Hein
Geburtsdatum 28.02.1969
Geburtsort Hamburg

Schulbildung

08/1975 - 08/1979 Grundschule Hoisbüttel (Schleswig-Holstein)
09/1979 - 07/1988 Gymnasium im Schulzentrum am Heimgarten (Ahrensburg
Schleswig-Holstein)
05/1988 Allgemeine Hochschulreife

Studium und Berufsausbildung

10/1988 - 02/1995 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität
Hamburg - Diplom und Staatsexamen
02/1993 - 10/1993 Diplomarbeit
10/1993 Diplom in Lebensmittelchemie
10/1993 Erste Lebensmittelchemische Staatsprüfung
02/1995 Zweite Lebensmittelchemische Staatsprüfung
seit 03/1995 Doktorarbeit bei Prof. Dr. Dr. H. Steinhart, Hamburg

Beruflicher Werdegang

11/1993 - 05/1994 Praktikum im IQS - Institut für Qualitätssicherung,
Hamburg
05/1994 - 11/1994 Praktikum in der CLUA, Hamburg
03/1995 - 04/1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Hamburg,
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
seit 12/1998 Mitarbeiter der Laboratorium Dr. Jung GmbH, Köln