

**Kim Karen Kleeberg**

---

**Identifizierung von Aminosäure-Radiolyseprodukten und  
sensorische Veränderungen in  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen  
(*Crangon crangon*) und anderen eiweißreichen Lebensmitteln**

Identification of Amino Acid-Radiation Products and Sensory Effects on  $\gamma$ -Irradiated  
Brown Shrimps (*Crangon crangon*) and other Protein-Rich Foods

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie der  
Universität Hamburg

---

Abteilung für Lebensmittelchemie  
Hamburg 2002

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von April 1997 bis Januar 2001 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie - Abteilung für Lebensmittelchemie - angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart
2. Gutachter: Prof. Dr. Bernward Bisping

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 15.08.2002

## Danksagungen

Für die vielseitige Unterstützung, die mir in meiner Promotionszeit zuteil wurde, bedanke ich mich ganz herzlich. Insbesondere bei:

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart für die Überlassung des Themas und sein stetes Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Bernward Bisping für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. Thomas Simat für die wissenschaftliche Betreuung und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Christoph Sippel, Herrn André Müller und Frau Wieda Wakilzadeh für ihre Unterstützung bei dieser Arbeit.

Den Mitarbeitern der Bundesforschungsanstalt für Fischerei, insbesondere Herrn Dr. Reinhard Schubring und Frau Delgado Blas für die Durchführung der physikalischen Texturprofilanalyse und Farbmessungen.

Den Mitarbeitern der Firma Beiersdorf in Hamburg-Moorburg und besonders Herrn Dr. Bogdahn für die Durchführung der  $\gamma$ -Bestrahlung.

Den Mitarbeitern der Firma Gammaster in Etten Leur, Niederlande für die Beratung und Durchführung der  $\gamma$ -Bestrahlung in einer kommerziellen Bestrahlungsanlage.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Tryptophan“ für die gute kollegiale Zusammenarbeit.

Herrn André Müller für die praktische Unterstützung dieser Arbeit auch nach Beendigung seiner Diplomarbeit.

Meinen Eltern für die seelische Unterstützung während dieser Arbeit.



## Publikationen und Vorträge

### Publikationen in Zeitschriften und Büchern

K. K. KLEEBERG, B. MÜLLER, M. SCHÜPPHAUS, T. J. SIMAT, H. STEINHART:  
Qualität biotechnologisch hergestellter Tryptophane – analytischer Vergleich der auf dem Markt befindlichen Produkte,  
*Lebensmittelchemie*, **52**, 126 (1998).

T. J. SIMAT, K. K. KLEEBERG, B. MÜLLER, A. SIERTS:  
Synthesis, Formation, and Occurrence of Contaminants in Biotechnologically Manufactured L-Tryptophan,  
in: G. Huether, W. Kochen, T. J. Simat, H. Steinhart (Editors);  
*Tryptophan, Serotonin, and Melatonin: Basic Aspects and Applications*  
Kluwer Academic / Plenum Publishers, 469-480, New York (1999).

K. K. KLEEBERG, B. VAN WICKERN, T. J. SIMAT, H. STEINHART:  
Determination of Hydroxytryptophan Isomers in  $\gamma$ -Irradiated Egg White, Chicken Meat and Shrimps,  
in: G. Huether, W. Kochen, T. J. Simat, H. Steinhart (Editors);  
*Tryptophan, Serotonin, and Melatonin: Basic Aspects and Applications*  
Kluwer Academic / Plenum Publishers, 685-691, New York (1999).

K. K. KLEEBERG, B. VAN WICKERN, T. J. SIMAT, H. STEINHART:  
Nachweis der Entstehung von Tryptophan-Radiolyseprodukten in  $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln,  
in: Knörr, M., Ehlermann, D. A. E., Delincee, H. (Hrsg.);  
*Lebensmittelbestrahlung – 5. Deutsche Tagung*,  
Bundesforschungsanstalt für Ernährung BFE-R-99-01, 153-161, Karlsruhe (1999).

K. K. KLEEBERG, A. MÜLLER, T. J. SIMAT, H. STEINHART:  
HPLC-Screening auf polare Radiolyseprodukte als mögliche Bestrahlungsmarker in  $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln  
*Lebensmittelchemie*, **55**, 89-90 (2001).

K. K. KLEEBERG, A. MÜLLER, T. J. SIMAT, H. STEINHART, R. SCHUBRING:  
Sensorische und physikalische Untersuchungen von Qualitätsveränderungen in  $\gamma$ -  
bestrahlten Nordseegarnelen,  
*Lebensmittelchemie*, **55**, 90-91 (2001).

### **Vorträge**

K. K. KLEEBERG, B. MÜLLER, M. SCHÜPPHAUS, T. J. SIMAT, H. STEINHART:  
Qualität biotechnologisch hergestellten Tryptophans – analytischer Vergleich der auf  
dem Markt befindlichen Produkte,  
Regionaltagung der GDCh, Fachgruppe Lebensmittelchemie, Lüneburg 1998.

K. K. KLEEBERG, B. VAN WICKERN, T. J. SIMAT, H. STEINHART:  
Determination of Hydroxytryptophan Isomers in  $\gamma$ -Irradiated Egg White, Chicken Meat  
and Shrimps,  
9<sup>th</sup> Meeting of the International Study Group for Tryptophan Research (ISTRY),  
Hamburg 1998.

K. K. KLEEBERG, B. VAN WICKERN, T. J. SIMAT, H. STEINHART:  
Nachweis der Entstehung von Tryptophan-Radiolyseprodukten in  $\gamma$ -bestrahlten  
eiweißreichen Lebensmitteln,  
Lebensmittelbestrahlung – 5. Deutsche Tagung, Karlsruhe 1998.

K. K. KLEEBERG, A. MÜLLER, T. J. SIMAT, H. STEINHART:  
HPLC-Screening auf polare Radiolyseprodukte als mögliche Bestrahlungsmarker in  
 $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln  
Regionaltagung der GDCh, Fachgruppe Lebensmittelchemie, Hannover 2001.

## Abkürzungsverzeichnis

3,4-DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
3-OH-BA	3-Hydroxybenzoesäure
4-OH-BA	4-Hydroxybenzoesäure
4-OH-TRP	4-Hydroxytryptophan
5-Me-TRP	5-Methyltryptophan
5-OH-TRP	5-Hydroxytryptophan
6-OH-TRP	6-Hydroxytryptophan
7-OH-TRP	7-Hydroxytryptophan
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
AP-ESI	Atmospheric Pressure Electrospray Ionization
AS	Aminosäure
BA	Benzoesäure
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BTS	Black Tiger Shrimps
CAC	Codex Alimentarius Commission
CBA	Carboxymethyl-
$e^-_{aq}$	solvatisiertes Elektron
ec	endcapped
EC	elektrochemisch
ECD	elektrochemische Detektion
EI	Eiklar
Em	Emissionswellenlänge
ESR	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie
EU	Europäische Union
eV	Elektronenvolt
Ex	Anregungswellenlänge
FAO	Food and Agriculture Organization
FL	Fluoreszenz
FLD	Fluoreszenz-Detektion
GC	Gaschromatographie
Gy	Gray
H•	Wasserstoffatom

---

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPPA	3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure
HU	Hühnerfleisch
IAEA	International Atomic Energy Agency
kDa	kilo Dalton
kGy	kilo Gray
KYN	Kynurenin
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
M	Molekülmasse
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MeV	Mega Elektronenvolt
MS	Massenspektrometrie
MSD	Massenselektive Detektion
m-TYR	<i>m</i> -Tyrosin
n.a.	Nicht analysiert
n.n.	Nicht nachweisbar
NFK	N-Formylkynurenin
NG	Nordseegarnelen
NG <sub>kons</sub>	konservierte Nordseegarnelen
•OH	Hydroxylradikal
OH	Hydroxyl-
OH-TRP	Hydroxytryptophan
OIA	Oxindolylalanin
o-TYR	<i>o</i> -Tyrosin
PDA	Photo Diode Array
PE	Polyethylen
PHE	Phenylalanin
PRS	Propylsulfonsäure
p-TYR	<i>p</i> -Tyrosin
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis



---

SCX	Benzolsulfonsäure
SIM	Single Ion Monitoring
SPE	Festphasenextraktion
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Total Ion Chromatogram
TL	Thermolumineszenz
TPA	Texturprofilanalyse
TRP	Tryptophan
TS	Tiefsee Shrimps
TYR	Tyrosin
UV	Ultraviolett
UVD	UV-Detektion
v/v	Volumenverhältnisse
VIS	Visible
WFR	Wiederfindungsrate
WHO	World Health Organization



---

# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG .....	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN .....	7
2.1	Bestrahlung von Lebensmitteln .....	7
2.1.1	Arten von Strahlung .....	7
2.1.2	Wirkung ionisierender Strahlung.....	8
2.1.3	Radiolyse des Wassers .....	8
2.1.4	Reaktionen mit Lebensmittelinhaltsstoffen .....	9
2.1.5	Reaktionen mit Aminosäuren und Proteinen .....	10
2.1.5.1	<i>Aliphatische Aminosäuren</i> .....	11
2.1.5.2	<i>Aromatische Aminosäuren</i> .....	13
2.1.5.3	<i>Proteine</i> .....	15
2.2	Nachweismethoden der Lebensmittelbestrahlung.....	16
2.2.1	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) .....	16
2.2.2	Thermolumineszenz-Messung (TL).....	17
2.2.3	Nachweis von Fettveränderungen .....	17
2.2.4	Nachweisverfahren für proteinreiche Lebensmittel .....	18
2.2.4.1	<i>o-Tyrosin-Methode</i> .....	18
2.2.4.2	<i>Nachweis von Tryptophan-Radiolyseprodukten</i> .....	18
3	PROBLEMSTELLUNG .....	19
4	PROBENMATERIAL UND BESTRAHLUNGSBEDINGUNGEN .....	21
4.1	Probenmaterial.....	21
4.1.1	Garnelen .....	21
4.1.2	Hühnerbrustfleisch.....	23
4.1.3	Hühnereiklar.....	24
4.1.4	Aminosäure-Modell-Lösungen.....	26
4.2	Bestrahlungsanlagen und -bedingungen.....	27
5	BESTIMMUNG VON OH-TRP-ISOMEREN IN $\gamma$ -BESTRAHLTEN NORDSEEGARNELEN.....	29
5.1	Abschätzung der in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen zu erwartenden Gehalte an freien OH-TRP-Isomeren.....	29
5.1.1	Bestimmung von TRP in verschiedenen Handelsproben.....	29
5.1.2	Bestimmung des TRP-Verlusts in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen .....	30
5.1.3	Abschätzung der zu erwartenden OH-TRP-Gehalte .....	31
5.2	Clean-up .....	32
5.2.1	Deproteinierung .....	32
5.2.2	Ionenaustauschchromatographie .....	32
5.2.3	Bestimmung der Kapazität der PRS-Kationenaustauscher.....	33

---

5.2.4	Untersuchung der Störeinflüsse durch das Garnelenserum bei der Isolierung von OH-TRP-Isomeren mittels PRS-SPE .....	34
5.2.5	C18-Festphasenextraktion.....	36
5.2.6	Optimierung der C18-SPE .....	37
5.2.7	Optimierung der PRS-Elution (Box-Behnken-Versuchsplan) .....	38
5.2.8	Kopplung von PRS- und C18-SPE .....	44
5.3	Bestimmung von OH-TRP-Isomeren in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen und Modell-Lösungen.....	45
5.4	Diskussion.....	48
5.4.1	TRP-Verlust bei Bestrahlung .....	48
5.4.2	Clean-up .....	48
5.4.3	Bestimmung von OH-TRP-Isomeren.....	51
5.4.4	Eignung von OH-TRP-Isomeren als Bestrahlungsmarker.....	52
6	SCREENING AUF POLARE RADIOLYSEPRODUKTE IN $\gamma$ -BESTRAHLTEN EIW EIßREICHEN LEBENS MITTELN.....	53
6.1	Methoden .....	54
6.1.1	Probenaufarbeitung .....	54
6.1.1.1	<i>Isolierung ohne Anreicherung</i> .....	55
6.1.1.2	<i>Isolierung mit Anreicherung</i> .....	55
6.1.2	HPLC-Bedingungen.....	55
6.1.3	Auswertung.....	57
6.2	Screening auf polare Radiolyseprodukte in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen	59
6.2.1	Isolierung und Anreicherung von polaren Radiolyseprodukten in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen .....	62
6.2.1.1	<i>Isolierung und Anreicherung mittels Festphasenextraktion</i> .....	62
6.2.1.2	<i>Isolierung und Anreicherung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion</i> .....	63
6.2.1.3	<i>Isolierung und Anreicherung von flüchtigen Radiolyseprodukten mittels Vakuumdestillation</i> .....	63
6.2.2	Identifizierung von polaren Radiolyseprodukten in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen .....	64
6.2.2.1	<i>Chromatographisches Verhalten</i> .....	64
6.2.2.2	<i>Identifizierung mittels HPLC-MS</i> .....	65
6.2.2.3	<i>Identifizierung von flüchtigen Radiolyseprodukten mittels GC-MS</i> .....	66
6.2.3	Bestimmung von Benzoesäure-Radiolyseprodukten in konservierten $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen .....	67
6.3	Screening auf polare Radiolyseprodukte in $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln.....	70
6.4	Screening auf polare Radiolyseprodukte in $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln nach Probenanreicherung.....	74

---

6.4.1	Identifizierung.....	81
6.4.1.1	<i>Modell-Versuche</i> .....	81
6.4.1.2	<i>Chromatographisches Verhalten</i> .....	84
6.4.1.3	<i>Identifizierung mittels HPLC-MS</i> .....	84
6.4.2	Bestimmung von HPPA in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen, Tiefsee Shrimps, Black Tiger Shrimps und Hühnerfleisch .....	86
6.4.3	HPPA in $\gamma$ -bestrahltem Eiklar.....	90
6.5	Diskussion.....	92
6.5.1	Screening.....	92
6.5.2	Bestimmung der BA-Radiolyseprodukte.....	93
6.5.3	Identifizierung von HPPA.....	95
6.5.4	Bestimmung von HPPA .....	96
6.5.5	Eignung von HPPA als Bestrahlungsmarker .....	97
6.5.6	Ausblick.....	100
7	SENSORISCHE UND PHYSIKALISCHE UNTERSUCHUNGEN AN $\gamma$ -BESTRAHLTEN NORDSEEGARNELEN .....	101
7.1	Methoden .....	102
7.1.1	Sensorische Methoden .....	102
7.1.2	Texturprofilanalyse und Bestimmung der Warner-Bratzler-Scherkraft.....	103
7.1.3	Farbmessung.....	104
7.2	Ergebnisse .....	106
7.2.1	Verbraucher-Test (Erweiterter Dreiecks-Test).....	106
7.2.2	Profilprüfung.....	107
7.2.2.1	<i>Profilprüfung Geruch</i> .....	107
7.2.2.2	<i>Profilprüfung Geschmack</i> .....	108
7.2.2.3	<i>Profilprüfung Textur</i> .....	109
7.2.2.4	<i>Profilprüfung Aussehen/Farbe</i> .....	110
7.2.3	Texturprofilanalyse und Bestimmung der Warner-Bratzler Scherkraft.....	111
7.2.4	Farbmessung.....	113
7.3	Diskussion.....	115
7.3.1	Verbrauchertest .....	115
7.3.2	Profilprüfung.....	118
7.3.3	Sensorische und physikalische Farbmessung .....	120
7.3.4	Sensorische und physikalische Texturmessung.....	121
8	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY .....	123
9	LITERATUR .....	129
10	ANHANG .....	145
10.1	Chemikalien und Geräte .....	145
10.1.1	Chemikalien .....	145

---

10.1.2	Geräte .....	146
10.2	HPLC-Bedingungen .....	148
10.2.1	Bestimmung von TRP in Garnelenserum .....	148
10.2.2	Bestimmung von TRP und 5-OH-TRP in dotiertem Garnelenserum (Test verschiedener Deproteinierungsmethoden) .....	148
10.2.3	Bestimmung von 5-OH-TRP (Versuche zur Charakterisierung der Festphasen) .....	148
10.2.4	Bestimmung der OH-TRP-Isomere in Garnelenserum .....	149
10.2.5	Screening auf unbekannte Bestrahlungsmarker in eiweißreichen Lebensmitteln .....	149
10.2.6	Bestimmung der BA-Radiolyseprodukte in konservierten Nordseegarnelen .....	150
10.2.7	Bestimmung von HPPA in eiweißreichen Lebensmitteln .....	151
10.3	GC-MS-Bedingungen .....	151
10.4	Kalibriergeraden und Verfahrenskenndaten .....	152
10.4.1	TRP .....	152
10.4.2	OH-TRP-Isomere .....	153
10.4.3	BA-Radiolyseprodukte .....	154
10.4.4	HPPA .....	155
10.5	Probenvorbereitung .....	156
10.5.1	Garnelen .....	156
10.5.2	Hühnerbrustfleisch .....	156
10.5.3	Hühnereiklar .....	156
10.5.4	Modell-Lösungen .....	157
10.6	Bestrahlungsbedingungen .....	158
10.7	Bestimmung von OH-TRP-Isomeren in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen ....	159
10.7.1	Bestimmung von TRP in Garnelenserum .....	159
10.7.2	Bestimmung des TRP-Verlusts in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen .....	160
10.7.3	Clean-up .....	161
10.7.3.1	<i>Deproteinierung</i> .....	161
10.7.3.2	<i>Ionenaustauschchromatographie</i> .....	163
10.7.3.3	<i>Charakterisierung der PRS-Kationenaustauscher (Fa. IST)</i> .....	164
10.7.3.4	<i>C18-Festphasenextraktion</i> .....	165
10.7.3.5	<i>Optimierung der C18-Festphasenextraktion</i> .....	167
10.7.3.6	<i>Optimierung der PRS-Elution (Box-Behnken-Versuchsplan)</i> .....	169
10.7.4	C18 ec/PRS-Festphasenextraktion zur Bestimmung der OH-TRP-Isomere in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen und Modell-Lösungen .....	171
10.8	Screening auf polare Radiolyseprodukte in $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln .....	173
10.8.1	Screening auf polare Radiolyseprodukte in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen .....	173
10.8.1.1	<i>Probenaufarbeitung</i> .....	173
10.8.1.2	<i>Isolierung und Anreicherung mittels Festphasenextraktion</i> .....	173

---

10.8.1.3	Isolierung und Anreicherung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion .....	174
10.8.1.4	Isolierung und Anreicherung von flüchtigen Radiolyseprodukten mittels Vakuumdestillation .....	176
10.8.1.5	Identifizierung mittels HPLC-MS .....	177
10.8.1.6	Identifizierung mittels GC-MS .....	178
10.8.2	Bestimmung von BA-Radiolyseprodukten in $\gamma$ -bestrahlten konservierten Nordseegarnelen .....	180
10.8.2.1	Probenaufarbeitung .....	180
10.8.2.2	Ergebnisse .....	180
10.8.3	Screening auf polare Radiolyseprodukte in $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln .....	182
10.8.3.1	Probenaufarbeitung .....	182
10.8.4	Screening auf polare Radiolyseprodukte in $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln nach Probenanreicherung .....	182
10.8.4.1	Probenaufarbeitung .....	182
10.8.4.2	Modellversuche .....	183
10.8.4.3	Identifizierung mittels HPLC-MS .....	185
10.8.5	Bestimmung von HPPA in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen, Tiefsee Shrimps, Black Tiger Shrimps und Hühnerfleisch .....	186
10.8.5.1	Probenaufarbeitung .....	186
10.8.5.2	Ergebnisse .....	186
10.9	Sensorische Untersuchungen an $\gamma$ - bestrahlten Nordseegarnelen .....	189
10.9.1	Ergebnisse der Profilprüfung .....	189





# 1 Einleitung

Das Thema der Sicherheit von Lebensmitteln ist in den vergangenen Jahren zunehmend zum Gegenstand öffentlicher Diskussionen geworden. Eine große gesundheitspolitische und wirtschaftliche Relevanz besitzt die weltweite Zunahme der zum Teil tödlich verlaufenden Lebensmittelintoxikationen, die auf den Befall von Lebensmitteln mit pathogenen Mikroorganismen zurückzuführen sind. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfiehlt zur Minimierung der mikrobiellen Belastung die Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierender Strahlung als alternatives Konservierungsverfahren (WHO, 1999).

Die zunehmende Globalisierung der Märkte führt zu immer längeren Transport- und Lagerzeiten von Lebensmitteln auf dem Weg zum Verbraucher. Viele Lebensmittel sind „von Natur aus“ stark durch Schimmelpilze und Hefen sowie durch pathogene Keime der Gattungen *Salmonella*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Listeria*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Yersinia* und *Bacillus* belastet. Daraus ergeben sich für die Lebensmittelindustrie folgende Probleme (MOLINS et al., 2001; LOAHARANU, 1996):

- Hohe Keimbelastung von Rohstoffen, die zur Weiterverarbeitung bestimmt sind (Gewürze, pflanzliche Dickungsmittel, Gemüse, tierische Produkte)
- Hohe Keimbelastung von Fleischerzeugnissen mit pathogenen Keimen (z.B. Salmonellen und enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) bei Geflügel, Garnelen/Shrimps)
- Hohe Ernteverluste durch Schimmelpilze und Fraßinsekten sowie deren Larven (z.B. Kakao, Kaffee, Obst)
- Ernteverluste durch vorzeitige Reifung (z.B. Kartoffeln, Zwiebeln, Tomaten).

Gerade bei den oben genannten stark heterogenen Produkten ist eine Desinfektion bzw. ausreichende Konservierung mit herkömmlichen Methoden wie Kühlung, Begasung oder chemischer Konservierung nur unter hohem finanziellen Aufwand durchzuführen und/oder liefert nur unbefriedigende Ergebnisse. Die Begasung mit Ethylenoxid oder Methylbromid stellte die wirksamste Methode der Desinfektion dar, da hier vor allem Fraßinsekten wirkungsvoll abgetötet wurden. Diese Stoffe dürfen

heute nicht mehr verwendet werden, da Ethylenoxid als cancerogen eingestuft worden ist und Methylbromid die Ozonschicht zerstört (LOAHARANU, 1994).

Die Lebensmittelbestrahlung stellt ein sowohl gesundheitlich als auch ernährungsphysiologisch sicheres Verfahren dar, das gerade im Hinblick auf die genannten Probleme eine sinnvolle Alternative darstellt (WHO, 1994). Die Behandlung von Lebensmitteln mit  $\gamma$ -Strahlung bietet folgende Vorteile (EHLERMANN und DELINCEE, 1998, WHO, 1988):

- Einfache und schnelle Desinfektion von großen und inhomogenen Warenladungen (0,15 - 0,75 kGy)
- Verbesserung des mikrobiellen Status (1 - 10 kGy)
- Abtötung von pathogenen Mikroorganismen bis hin zur Sterilisation (bis 100 kGy)
- Verbesserung der Haltbarkeit (1 - 3 kGy)
- Verzögerung physiologischer Prozesse (z.B. Keimung von Kartoffeln, Reifung von Obst) (0,05 - 1 kGy)
- Dekontamination von Zutaten und Zusatzstoffen (z.B. Gewürze, Dickungsmittel) (10 - 50 kGy)
- Behandlung von Produkten in einer geschlossenen Verpackung zur Vermeidung einer Rekontamination.

Es wurde jedoch stets betont, dass die Anwendung der Lebensmittelbestrahlung nicht als Ersatz für die Einhaltung einer „Guten Herstellungspraxis“ (GMP-Richtlinien) angesehen werden darf (WHO, 1994). Die nachträgliche Entkeimung von nicht mehr verkehrsfähigen Produkten durch eine Bestrahlung ist daher unzulässig. Die Empfehlung der Lebensmittelbestrahlung seitens der WHO beschränkte sich bis 1997 auf eine zulässige Höchstdosis von 10 kGy. In einer weiteren Stellungnahme hat die WHO die Anwendung der Lebensmittelbestrahlung mit Dosen über 10 kGy als sicher eingestuft, sofern die sensorischen Eigenschaften des Produktes durch die Anwendung der Bestrahlung erhalten bleiben (WHO, 1999). Über eine entsprechende Änderung der Richtlinie der Codex Alimentarius Commission (CAC) für die Bestrahlung von Lebensmitteln wird zur Zeit diskutiert (CAC, 2002).

---

Obwohl die Lebensmittelbestrahlung in 41 Staaten weltweit zugelassen ist, wird sie aber nur in 28 kommerziell genutzt (LOAHARANU, 1996). Bei den bestrahlten Produkten handelt es sich vorwiegend um Nischenprodukte (z.B. Herstellung von Sterilnahrung, Keimungshemmung von Kartoffeln). Einer breiteren Anwendung der Lebensmittelbestrahlung stehen zur Zeit drei entscheidende Punkte entgegen (HUNTER, 2000):

- Mangelnde Akzeptanz in der Bevölkerung
- Uneinheitliche weltweite rechtliche Regelungen (Kennzeichnung, Anwendungsbereiche, Bestrahlungsdosen)
- Fehlende Nachweisverfahren für bestrahlte Lebensmittel.

Die Hauptursache der ablehnenden Haltung in der Bevölkerung gegenüber der Lebensmittelbestrahlung liegt darin begründet, dass die Bestrahlung mit der Erzeugung von Radioaktivität im Lebensmittel assoziiert wird (EHLERMANN und DELINCEE, 1998). Für eine erfolgreiche Vermarktung bestrahlter Produkte muss dem Verbraucher die Ungefährlichkeit der Lebensmittelbestrahlung sowie die hohe Qualität der bestrahlten Produkte vermittelt werden. Der Verbraucher erwartet heutzutage mikrobiell einwandfreie, kostengünstige, natürliche, lang haltbare Lebensmittel, die zudem einen hohen Nähr- und Geschmackswert aufweisen und schnell und einfach zuzubereiten sind. Die Anwendung der Lebensmittelbestrahlung erhöht die Sicherheit und die Haltbarkeit durch Verringerung der Keimbelastung. Allerdings kann es bei der Bestrahlung auch zu sensorischen Veränderungen kommen, die z.B. in einer erhöhten Lipidoxidation sowie in Strukturveränderungen an konsistenzgebenden Makromolekülen begründet liegen (KILCAST, 1991). Inwiefern diese Veränderungen zu einer negativen Bewertung durch den Verbraucher führen, ist bisher noch unzureichend untersucht. Die Möglichkeiten der Vermarktung bestrahlter Produkte werden derzeit evaluiert (FOX et al., 2002; FRENZEN et al., 2001).

Für eine weltweite Vermarktung bestrahlter Lebensmittel stellen die unterschiedlichen rechtlichen Regelungen in den einzelnen Staaten deutliche Handelshemmnisse dar. So besteht nach §13 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG) in Deutschland ein Bestrahlungsverbot mit

Erlaubnisvorbehalt. Im Zuge der Angleichung der Rechtsvorschriften der einzelnen EU-Mitgliedsstaaten wurde die Lebensmittelbestrahlung mit den Richtlinien des Europäischen Parlaments und des Rates 1999/2/EG und 1999/3/EG (Positivliste) neu geregelt. Die Richtlinien erlauben eine Bestrahlung von getrockneten aromatischen Kräutern und Gewürzen mit einer mittleren Höchstdosis von 10 kGy (EU, 1999a; EU, 1999b). Mit der Umsetzung dieser Richtlinien in die neue Lebensmittelbestrahlungsverordnung ist lediglich die  $\gamma$ -Bestrahlung von getrockneten aromatischen Gewürzen und Kräutern mit einer Dosis von bis zu 10 kGy in Deutschland zulässig. Über eine Erweiterung der Positivliste um z.B. getrocknete Früchte, Getreideflocken, Zusatzstoffe wie Gummi arabicum, Eiweiß oder geschälte Shrimps wird zur Zeit diskutiert. Bis zu einer endgültigen Festlegung der Positivliste bleiben bisherige einzelstaatliche Zulassungen bestehen (EU, 2001).

Der Erweiterung der Positivliste stehen jedoch zum einen die technologische Notwendigkeit sowie der erkennbare Nutzen für den Verbraucher und zum anderen das Fehlen geeigneter Nachweismethoden entgegen. Bisher konnte eine Vielzahl verschiedener Nachweisverfahren auf nationaler Ebene im Rahmen der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG sowie auf europäischer und internationaler Ebene (EN/ISO) validiert bzw. normiert werden. Die Bestrahlung von Gewürzen und Kräutern kann derzeit mittels der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) und der Thermolumineszenz-Messung (TL) sicher nachgewiesen werden. Weitere validierte Bestrahlungsnachweise basieren auf der Analyse der Cycloalkylbutanone und Kohlenwasserstoffe, die bei der Bestrahlung fettreicher Lebensmittel entstehen und mittels GC-MS nachweisbar sind (MASOTTI und ZONTA, 1999). Für Produkte wie reines Eiweiß (z.B. Hühnereiklar) oder proteinreiche und zugleich fettarme Lebensmittel wie Garnelen, Shrimps und Hühnerfleisch, für die eine Bestrahlung aufgrund der Verringerung der Belastung mit pathogenen Keimen technologisch zweckmäßig und für den Verbraucher nützlich wäre, ist zur Zeit kein routinetaugliches Verfahren verfügbar.

Für eine weitere Anwendung der Lebensmittelbestrahlung muss sowohl im europäischen als auch im internationalen Warenverkehr sichergestellt werden, dass die geltenden rechtlichen Bestimmungen durch validierte Nachweisverfahren überwachbar sind. Dies erfordert Verfahren, um zum einen die Einhaltung der

---

Bestrahlungshöchstdosen zu überprüfen und zum anderen die unzulässige Bestrahlung von Lebensmitteln (auch im Niederdosisbereich bis 3 kGy) sicher nachzuweisen. Eine unzulässige Bestrahlung liegt auch dann vor, wenn sie in Verbindung mit einer chemischen Konservierung erfolgt. Bisher existiert kein Verfahren, das den Einsatz einer chemischen Konservierung in Verbindung mit einer anschließenden Bestrahlung nachweist.



## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Bestrahlung von Lebensmitteln

#### 2.1.1 Arten von Strahlung

Der Gesetzgeber definiert unter dem Begriff „Lebensmittelbestrahlung“ Verfahren zur Entkeimung von Lebensmitteln durch direkte oder indirekte Einwirkung von ultravioletter bzw. Elektronen-, Gamma- oder Röntgenstrahlung. Die Behandlung von Trinkwasser, Oberflächen von Obst- und Gemüseerzeugnissen, Hartkäse bei der Lagerung sowie die Entkeimung der Luft durch ultraviolette Strahlung sind bereits seit langem in Deutschland zugelassen. Nach der Umsetzung der Richtlinien 1999/2/EG und 1999/3/EG in die neue Lebensmittelbestrahlungsverordnung vom 14. Dezember 2000 ist auch die Behandlung von getrockneten aromatischen Kräutern und Gewürzen mit ionisierender Elektronen-, Gamma- oder Röntgenstrahlung erlaubt (EU, 1999a; EU, 1999b).

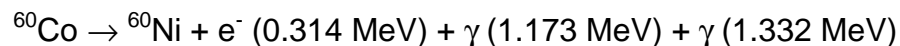
In Anlehnung an Empfehlungen der WHO (WHO, 1999) sowie der Codex Alimentarius Commission (CAC, 1983) gibt die Richtlinie genaue Vorgaben zur Anwendung ionisierender Strahlung zur Entkeimung von Lebensmitteln sowie zur Durchführung der Dosimetrie an. Lebensmittel dürfen nur mit folgenden Arten ionisierender Strahlung behandelt werden:

- Gammastrahlung aus Radionukliden  $^{60}\text{Co}$  und  $^{137}\text{Cs}$
- Röntgenstrahlung mit einer Maximalenergie von 5 MeV
- Elektronenstrahlung mit einer Maximalenergie von 10 MeV.

Die unterschiedlichen Strahlungsarten unterscheiden sich deutlich in ihrem Durchdringungsvermögen. Während Gamma- und Röntgenstrahlen Lebensmittel nahezu ungehindert durchdringen, besitzen die Elektronenstrahlen nur eine geringe Eindringtiefe von wenigen Millimetern, wodurch die Anwendungsmöglichkeiten zur Entkeimung entsprechend begrenzt sind. Für die Lebensmittelbestrahlung wird hauptsächlich Gammastrahlung natürlicher Radionuklide verwendet. Im Gegensatz zu der künstlich erzeugten Röntgen- bzw. Elektronenstrahlung ist sie einfacher und kostengünstiger in der Anwendung. Da  $^{137}\text{Cs}$  heute nicht mehr hergestellt wird, wird

in kommerziellen Bestrahlungsanlagen  $^{60}\text{Co}$  eingesetzt, das durch Neutronenbeschuss aus dem natürlichen Cobaltisotop  $^{59}\text{Co}$  gewonnen wird (MARX, 1998; DIEHL, 1995).

Die natürlichen Nuklide besitzen zudem den Vorteil, dass sie  $\gamma$ -Quanten mit definierter Energie aussenden. Diese liegt deutlich unterhalb der Energieschwelle von 13 MeV ( $1 \text{ MeV} = 1,6 \cdot 10^{-13} \text{ Joule}$ ), ab der Radioaktivität im bestrahlten Lebensmittel erzeugt werden könnte (DIEHL, 1995) (s. Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1** Radioaktiver Zerfall von  $^{60}\text{Co}$

### 2.1.2 Wirkung ionisierender Strahlung

Die keimtötende Wirkung der Bestrahlung beruht auf der Ionisierung von Zellbestandteilen. Es kommt zur Beschädigung der DNA, von Enzymen und Zellmembranen. Die Mikroorganismen verlieren die Fähigkeit zur Zellteilung und die Stoffwechselaktivität wird stark eingeschränkt, wodurch es letztlich zum Absterben des Organismus kommt (EHLERMANN und DELINCEE, 1998).

Chemisch kommt es sowohl zur direkten Ionisierung der DNA, die zu Veränderungen in der Basensequenz oder zum Verlust ganzer Sequenzen führen kann, als auch zu indirekten Reaktionen durch intermediär gebildete freie Radikale. Das Ausmaß dieser Schädigungen ist im Wesentlichen von der eingestrahnten Energiemenge, der Bestrahlungsdosis ( $\text{Gy} = 1 \text{ J/kg}$ ), abhängig. Die letale Bestrahlungsdosis ist abhängig von der Art des jeweiligen Organismus. Je komplexer ein Organismus ist, umso geringer ist die letale Dosis (MÜLLER und WEBER, 1996).

### 2.1.3 Radiolyse des Wassers

$\gamma$ -Strahlung vermag sämtliche Lebensmittelinhaltsstoffe anzuregen oder zu ionisieren. Das Ausmaß der entstehenden primären und sekundären Reaktionsprodukte ist hierbei von der Art und der Konzentration der Inhaltsstoffe sowie vom pH-Wert abhängig (VON SONNTAG, 1987). In vielen Lebensmitteln stellt Wasser einen Hauptbestandteil dar. Daraus resultiert, dass ein Großteil der eingestrahnten Energie durch Wassermoleküle aufgenommen wird, wobei die



Moleküle entweder angeregt oder ionisiert werden. Die Vielzahl an Folgereaktionen lässt sich für reines Wasser in erster Näherung durch folgende Gesamtgleichung beschreiben (s. Abbildung 2.2) (ELIAS und COHEN, 1977).



**Abbildung 2.2** Radiolyse des Wassers

Die Zahlenwerte auf der rechten Seite entsprechen den jeweiligen Bildungsraten (G-Werte). Der G-Wert entspricht der Anzahl gebildeter Teilchen pro 100 eV absorbierter Energie. Das bedeutet, dass bei der Bestrahlung von 1 Liter reinem Wasser mit einer Dosis von 1 kGy ca. 0,3 mMol (ca.  $1,8 \times 10^{20}$ ) Hydroxylradikale gebildet werden.

Die bei der Lebensmittelbestrahlung entstandenen Radiolyseprodukte des Wassers können sowohl mit sich selbst als auch mit anderen Lebensmittelbestandteilen reagieren. Hierbei kommt es zu Oxidationen und Reduktionen, die entweder zu stabilen Endprodukten oder zur Bildung weiterer Radikale (Kettenfortpflanzung) führen.

#### 2.1.4 Reaktionen mit Lebensmittelinhaltsstoffen

Die Auswirkungen der Bestrahlung auf den Nährwert von Lebensmitteln werden seit nahezu 50 Jahren untersucht. Es hat sich hierbei gezeigt, dass alle Lebensmittelinhaltsstoffe durch die Behandlung mit  $\gamma$ -Strahlen beeinflusst werden (DIEHL, 1995). Aber selbst bei der Anwendung hoher Bestrahlungsdosen von 50 kGy ist der Anteil an Radiolyseprodukten in Lebensmitteln gering (ELIAS, 1992). Die WHO hat daher nach Auswertung aller vorliegenden Untersuchungen feststellen können, dass der Verzehr bestrahlter Lebensmittel aus toxikologischer, mikrobiologischer und ernährungsphysiologischer Sicht unbedenklich ist (WHO, 1999).

Die radiolytische Spaltung von Proteinen, Polysacchariden und Lipiden mag, bezogen auf die absoluten Gehalte der entstehenden Radiolyseprodukte, nur ein geringes Ausmaß besitzen, dennoch kann es zu Veränderungen der Textur, des

Geruchs und des Geschmacks kommen. Gerade im Hinblick auf die Initiierung von Autoxidationsreaktionen bei Lipiden ist die Lebensmittelbestrahlung kritisch zu betrachten (MÖRSEL, 1999). Die entstehenden Reaktionsprodukte zeigen sehr niedrige Geruchsschwellenwerte und können zur Bildung eines Off-flavours führen.

Die Reaktionen, die bei der  $\gamma$ -Bestrahlung auftreten, sind höchst komplex. Sie sind von der Zusammensetzung, insbesondere dem Wassergehalt, dem Sauerstoffgehalt und dem pH-Wert des Lebensmittels abhängig. Die bisher durchgeführten Studien beschränken sich daher auf die Untersuchung von Modellsystemen weniger komplexer Gemische. Diese Studien haben weitreichende Erkenntnisse zum Reaktionsverhalten verschiedener Lebensmittelinhaltsstoffe liefern können. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Resultate dieser Modellversuche nicht ohne weiteres auf die Komplexität einer Lebensmittelmatrix übertragbar sind (VON SONNTAG, 1987; ELIAS und COHEN, 1977). Durch Untersuchungen an sauerstoffhaltigen und sauerstofffreien Lösungen konnten zwei verschiedene Reaktionsmechanismen nachgewiesen werden, die zu unterschiedlichen Hauptradiolyseprodukten führen. Bei der Bestrahlung von Lebensmitteln ist zu Beginn noch Sauerstoff vorhanden, der aber sehr schnell durch die Bestrahlung aufgebraucht wird. So konnte DIEHL (1995) zeigen, dass bei der Bestrahlung mit Elektronenstrahlen der in einer Lösung vorhandene Sauerstoff ab einer Dosis von 0,6 kGy verbraucht war. Es ist daher anzunehmen, dass während der Bestrahlung anaerobe Bedingungen im Lebensmittel auftreten können.

### **2.1.5 Reaktionen mit Aminosäuren und Proteinen**

Die  $\gamma$ -Bestrahlung führt zur Bildung von Radikalen von Aminosäuren und Proteinen im Lebensmittel. Die Art und Menge der gebildeten Radikale sowie die Sekundär- und Endprodukte sind von der Zusammensetzung des Lebensmittels, der Temperatur, dem pH-Wert und der Menge an verfügbarem Sauerstoff abhängig (THAKUR und SINGH, 1994; URBAIN, 1986; TAUB et al., 1978; PETER und RAJEWSKI, 1963). Hierbei treten die folgenden Reaktionen auf:

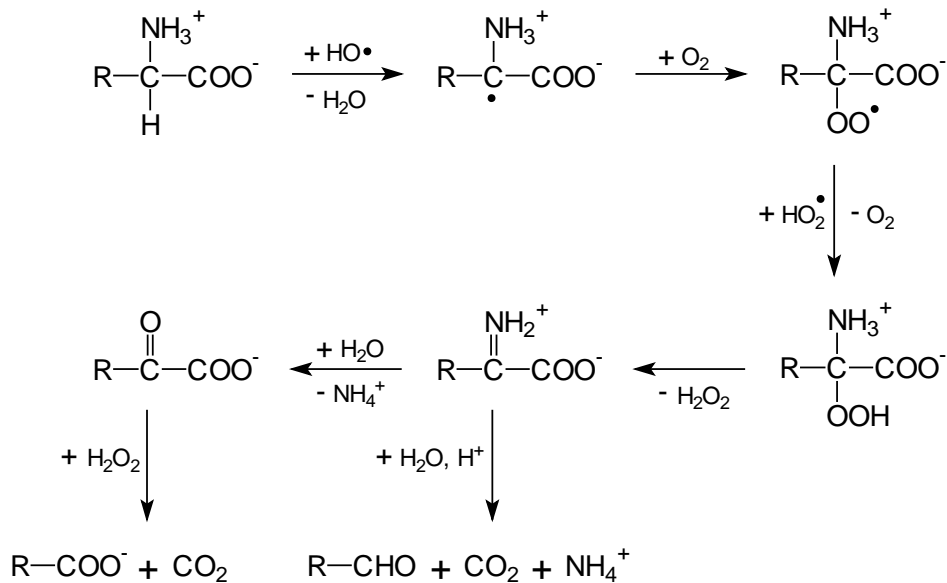
- Oxidative Desaminierung
- Reduktive Desaminierung
- Hydroxylierung
- Dimerisierung
- Decarboxylierung.

Welche Reaktionen ablaufen, hängt im Allgemeinen von den beteiligten Reaktionspartnern ab. Es hat sich aber in Modelluntersuchungen gezeigt, dass aromatische Aminosäuren empfindlicher auf  $\gamma$ -Bestrahlung reagieren als aliphatische (MASKOS et al., 1992a; SIMIC, 1978; RAO und HAYON, 1975). Der Reaktionsmechanismus der Kettenfortpflanzung führt zur Bildung stabilisierter Radikalzwischenstufen, bei der unter Rekombination von Radikalen, Eliminierungen und Disproportionierungen stabile Endprodukte entstehen. Wasserstoffradikale werden nur zu einem geringen Anteil bei der Radiolyse des Wassers gebildet. Ihr Anteil an den Folgereaktionen ist daher so gering, dass dieser im Allgemeinen zu vernachlässigen ist (ARMSTRONG und SWALLOW, 1969). Im Folgenden werden nur die Reaktionen der Hydroxylradikale sowie des solvatisierten Elektrons betrachtet.

#### **2.1.5.1 Aliphatische Aminosäuren**

Bei der Bestrahlung sauerstoffhaltiger Lösungen aliphatischer Aminosäuren kommt es zu einer oxidativen Desaminierung. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Im ersten Reaktionsschritt spaltet ein Hydroxylradikal ein Wasserstoffatom vom  $\alpha$ -Kohlenstoffatom der Aminosäure unter Bildung eines Wassermoleküls ab. Unter Addition eines Sauerstoffmoleküls kommt es zur Bildung eines Peroxoradikals, das unter Reaktion mit einem Superoxidradikal zu einem Alkylperoxid und Sauerstoff weiterreagiert. Beim Zerfall dieser Verbindung entstehen Wasserstoffperoxid und das entsprechende Iminoderivat, das unter Kohlendioxid- und Ammoniumabspaltung zu dem Aldehyd hydrolysiert bzw. nur unter Ammoniumabspaltung eine  $\alpha$ -Ketosäure bildet. In einem weiteren Schritt kann die  $\alpha$ -Ketosäure durch Wasserstoffperoxid zu Kohlendioxid und der entsprechenden Säure oxidiert werden (STADTMAN, 1993; GARRISON, 1981; WEEKS und GARRISON, 1958). Der Gehalt an Oxidationsprodukten ist abhängig von der Art der reagierenden

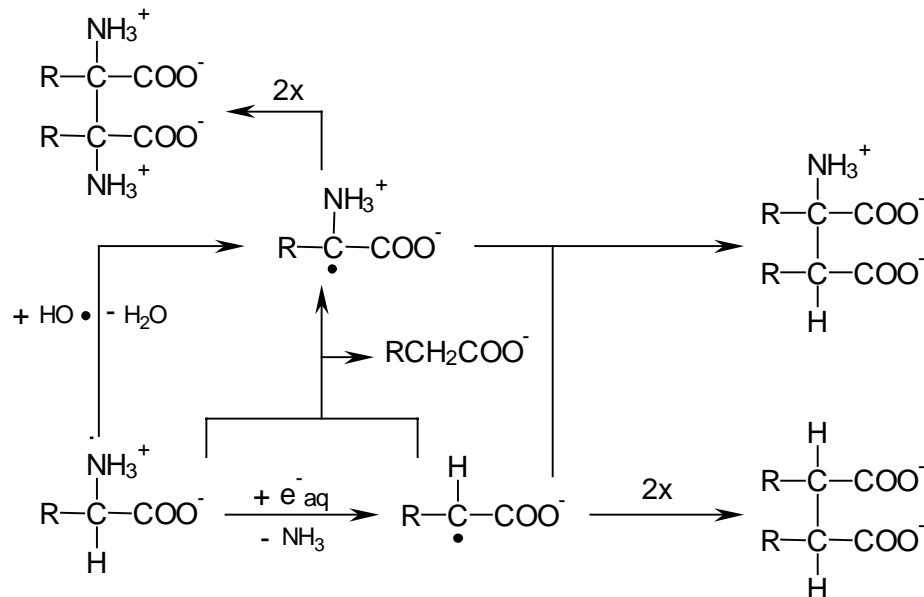
Aminosäuren. Je länger die Seitenkette der Aminosäure ist, um so mehr Möglichkeiten für eine Wasserstoffabstraktion sind gegeben, so dass die Reaktion am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom eine untergeordnete Rolle spielt. Mit größerer Komplexität der Seitenkette nimmt die Bedeutung von Hydroxylierungsreaktionen zu (VON SONNTAG, 1987).



**Abbildung 2.3** Mechanismus der oxidativen Desaminierung (STADTMAN, 1993; GARRISON, 1981; WEEKS und GARRISON, 1958)

Unter sauerstofffreien Bedingungen kommt es bei der Bestrahlung wässriger Lösungen aliphatischer Aminosäuren vor allem zur reduktiven Desaminierung sowie zur Dimerisierung. Der Reaktionsmechanismus der zugrunde liegenden Reaktionen ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Im Wesentlichen kommt es zur Desaminierung durch die Reaktion des solvatisierten Elektrons mit der Aminosäure sowie zur Wasserstoffabstraktion am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom. Durch den fehlenden Sauerstoff wird die Bildung von Peroxyverbindungen unterdrückt, so dass Dimerisierungsreaktionen an Bedeutung gewinnen. Hierbei entstehen Mono- und Diamino-dicarbonsäuren (STADTMAN, 1993; GARRISON, 1968).

Zusätzlich kommt es zur Decarboxylierung, wobei das um ein Kohlenstoffatom gekürzte Amin sowie Kohlendioxid entstehen. Der Bildungsmechanismus ist bisher ungeklärt (ELIAS und COHEN, 1977).

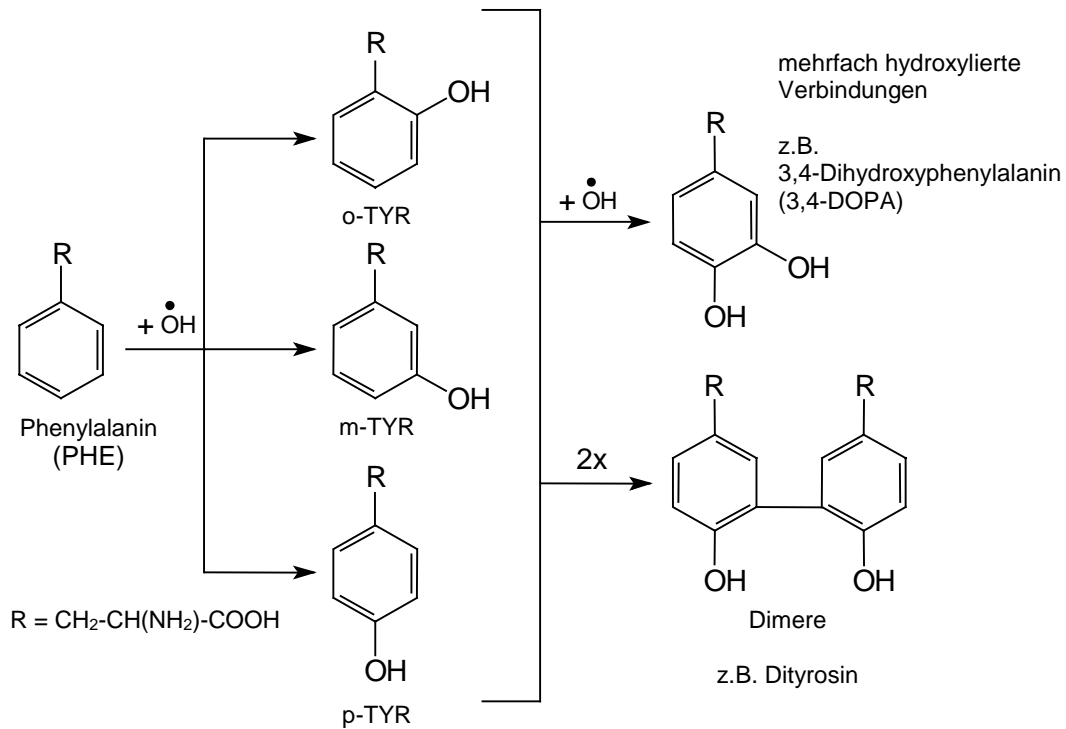


**Abbildung 2.4** Mechanismus der reduktiven Desaminierung (STADTMAN, 1993; GARRISON, 1968)

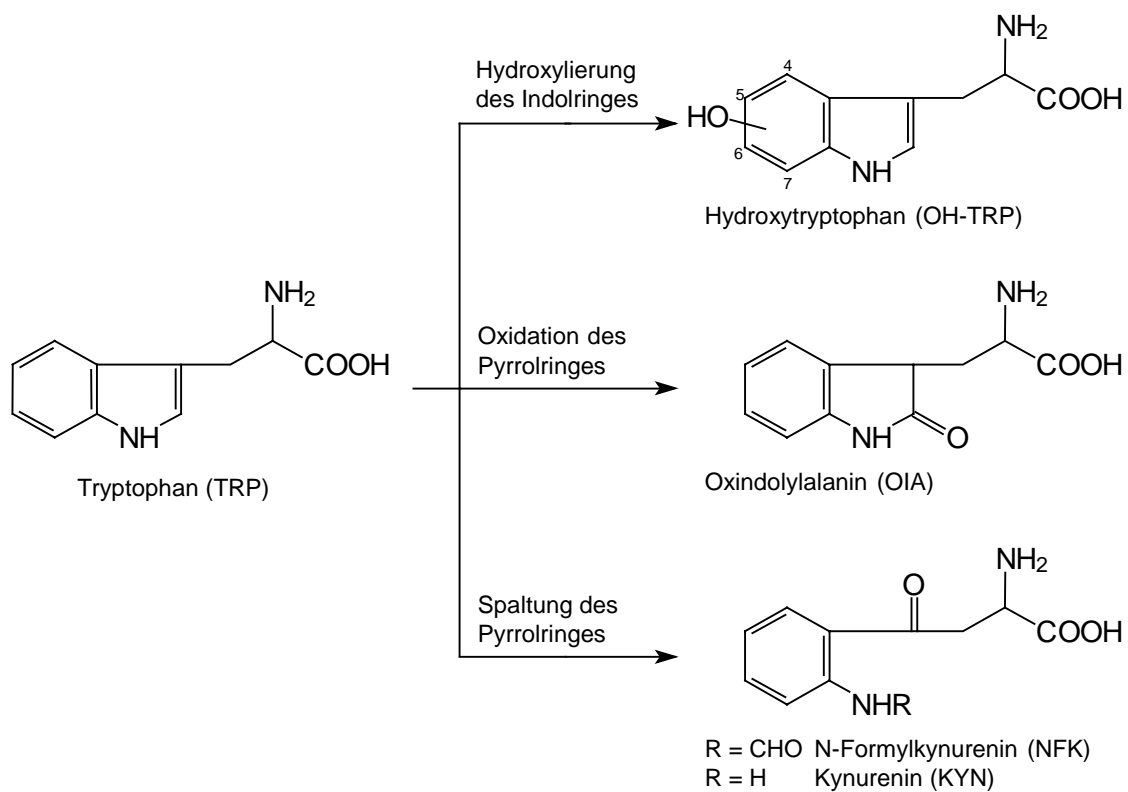
### 2.1.5.2 Aromatische Aminosäuren

Bei der Bestrahlung wässriger Lösungen von aromatischen Aminosäuren spielen die oxidative und die reduktive Desaminierung nur eine untergeordnete Rolle. Aromatische Systeme in der Seitenkette bieten eine gute Angriffsstelle für Hydroxylierungsreaktionen (GETOFF, 1992; MASKOS et al., 1992a, MASKOS et al., 1992b; SOLAR et al., 1984). Die auftretenden Reaktionen werden im Folgenden an den Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan dargestellt.

Bei der Bestrahlung von Phenylalanin-Lösungen kommt es zur Addition von Hydroxylradikalen am aromatischen System (Abbildung 2.5). Durch Anlagerung von Sauerstoff entsteht ein Peroxylradikal, das unter Abspaltung eines Superoxidradikals zur Bildung von *o*- (50%), *m*- (14%) und *p*-Tyrosin (30%) (*o*-, *m*-, *p*-TYR) führt (BERNWIESER et al., 1995; GETOFF, 1992). Die entstandenen Radiolyseprodukte können mit weiteren Radikalen unter Bildung von mehrfachhydroxylierten Verbindungen z.B. 3,4-Dihydroxyphenylalanin, Dimeren und Polymeren weiter reagieren (AUDETTE et al., 2000; GETOFF, 1992).



**Abbildung 2.5** Radiolyseprodukte des Phenylalanins



**Abbildung 2.6** Radiolyseprodukte des Tryptophans

Bei der Bestrahlung wässriger Tryptophan-Lösungen treten im Wesentlichen Hydroxylierungen am Indolring sowie Oxidation und Spaltungen am Pyrrolring auf (s. Abbildung 2.6). Die energetisch bevorzugten Angriffspunkte des Hydroxylradikals sind aufgrund des induktiven Effektes des Indolstickstoffs die Positionen C-2, C-3, C-5 und C-7 am Indolkörper (ARMSTRONG und SWALLOW, 1969). Bei diesen Untersuchungen konnten N-Formylkynurenin (NFK), Kynurenin (KYN) sowie 4-, 5-, 6- und 7-Hydroxytryptophan (4-, 5-, 6-, 7-OH-TRP) als Hauptradiolyseprodukte nachgewiesen werden (VAN WICKERN, 1997; MASKOS et al., 1992a; KOPOLDOVA et al., 1985; SINGH et al., 1984; ARMSTRONG und SWALLOW, 1969). Zusätzlich kommt es zur Dimerisierung und Polymerisierung von Radiolyseprodukten, wobei braungefärbte Reaktionsprodukte entstehen (GETOFF, 1992; KOPOLDOVA et al., 1985; JOSIMOVIC et al., 1983).

### 2.1.5.3 Proteine

Die Reaktionen von Proteinen mit primären Radiolyseprodukten des Wassers sind von der chemischen Zusammensetzung sowie der räumlichen Molekülanordnung abhängig. Das Carbonyl-Kohlenstoffatom der Peptid-Bindung reagiert hauptsächlich mit dem solvatisierten Elektron, wobei es zur Wanderung des Radikals entlang der Peptidkette und zur Spaltung von Peptidbindungen kommen kann (GARRISON, 1968). Bei der Bestrahlung von fibrillären Proteinlösungen konnte durch die Spaltung von Proteinketten eine Abnahme der Viskosität beobachtet werden. Globulare Proteine neigen bei der Bestrahlung zu Dimerisierungs- und Polymerisierungsreaktionen, die zu einer Erhöhung der Viskosität führten (DIEHL, 1995).

Disulfid-Brückenbindungen, die entscheidend zur Tertiärstruktur und damit auch zur Funktion von Proteinmolekülen beitragen, werden durch Bestrahlung leicht gespalten, wodurch es zum Verlust der Funktion kommen kann (VON SONNTAG, 1987).

Zusätzlich kommt es zu radikalischen Additionsreaktionen an Seitenketten durch Hydroxylradikale oder Sekundärradikale. Diese Reaktionen können ebenfalls zur Veränderung der geometrischen Struktur des Moleküls und somit zum Verlust der Funktion führen (SIMIC, 1978).

## 2.2 Nachweismethoden der Lebensmittelbestrahlung

Zur Zeit stehen 13 Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG zum Nachweis der Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierenden Strahlen zur Verfügung. Alle diese Verfahren basieren auf einer der folgenden Methoden:

- Elektronenspinresonanz-Spektroskopie
- Thermolumineszenz-Messung
- Messung der strahleninduzierten Veränderung von Lipiden.

Die EU-Kommission hat die Mitgliedsstaaten in der Richtlinie 1999/2/EG dazu verpflichtet, bis zum 1. Januar 2003 geeignete Methoden zum Nachweis der Lebensmittelbestrahlung im Hinblick auf eine mögliche Erweiterung der Positivliste zu validieren (EU, 1999a).

### 2.2.1 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

Bei der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie handelt es sich um eine zerstörungsfreie, spektroskopische Methode, die zur Erfassung paramagnetischer Radikale in Lebensmitteln dient. Durch die hohe Energie der  $\gamma$ -Strahlung entstehen Radikale, die in bestimmten wasserfreien Bereichen des Lebensmittels stabilisiert werden können (MARX, 1998). In Fleisch und Fisch kann das bestahlungsspezifische Signal des  $\text{CO}_2^-$ -Radikals, das aus dem Hydroxylapatit der Knochen- und Grätenmatrix entsteht, gemessen werden (STEVENSON und GRAY, 1990). Auch bei Krebstieren wird die Bildung des  $\text{CO}_2^-$ -Radikals beobachtet. Allerdings ist das Signal stark vom Kalzifizierungsgrad des Panzers abhängig und kann bei Anwesenheit des paramagnetischen  $\text{Mn}^{2+}$ -Ions überlagert werden (HELLE et al., 1996; MOREHOUSE und DESROSIERS, 1993). In frischen Früchten, Nüssen, Gewürzen sowie in cellulosehaltigen Verpackungsmaterialien kommt es durch Bestrahlung vermutlich zur Bildung eines Radikals aus der Cellulose (STEVENSON und GRAY, 1990). Die ESR-Spektroskopie ist vor allem für knochen- und grätenhaltige Lebensmittel sowie für einen indirekten Bestrahlungsnachweis über cellulosehaltige Verpackungsmaterialien geeignet. Es handelt sich aber um keine universelle Methode, die zudem nur eine Abschätzung der angewandten Bestrahlungsdosis zulässt.



### **2.2.2 Thermolumineszenz-Messung (TL)**

Thermolumineszenz-Messungen können zum Bestrahlungsnachweis für alle Lebensmittel, die mineralische Bestandteile enthalten, eingesetzt werden. Durch die Bestrahlung werden Elektronen im Kristall freigesetzt, die sich an Störstellen im Gitter stabilisieren. Erhitzt man den Kristall, so können die angeregten Elektronen wieder in ihren Grundzustand zurückkehren. Die durch die Bestrahlung aufgenommene Energie wird bei der Erwärmung des Kristalls in Form von Lumineszenzstrahlung abgegeben (MARX, 1998).

Die Methode ist besonders geeignet für pflanzliche Produkte wie Obst, Gemüse und Gewürze, da diese zumeist deutliche Mengen an mineralischen Verunreinigungen aufweisen (SCHREIBER et al., 1993b; SCHREIBER et al., 1993c). Die Methode liefert sehr gute Resultate und ermöglicht die Bestimmung der Bestrahlungsdosis. Ein Nachteil des Verfahrens liegt in der hohen benötigten Menge an Mineralien. So kann ein Nachweis an ungeschälten Garnelen nur durchgeführt werden, wenn sich ausreichende Mengen an Mineralien aus dem Darm der Tiere isolieren lassen. Bei geschälten Garnelen ist die Methode entsprechend nicht anwendbar (SCHREIBER et al., 1993a).

### **2.2.3 Nachweis von Fettveränderungen**

Die Behandlung von fetthaltigen Lebensmitteln mit  $\gamma$ -Strahlen führt zur Bildung einer Reihe von (flüchtigen) Kohlenwasserstoffen und Aldehyden (SCHREIBER et al., 1994). Zusätzlich entstehen 2-Alkylcyclobutanone als strahlungsspezifische Markersubstanzen, die mittels GC-MS nachgewiesen werden können. Da der Gehalt dieser Substanzen linear mit der Bestrahlungsdosis im Lebensmittel ansteigt, ist eine genaue Bestimmung der Bestrahlungsdosis möglich. Allerdings ist der Arbeitsaufwand zur Isolierung der Radiolyseprodukte sehr hoch und die Methode eignet sich für sehr fettarme Lebensmittel (< 1% Fett) wie z.B. Garnelen nur bedingt (NDIAYE et al., 1999).

## **2.2.4 Nachweisverfahren für proteinreiche Lebensmittel**

### **2.2.4.1 o-Tyrosin-Methode**

Die o-Tyrosin-Methode basiert auf dem Nachweis von o-Tyrosin, das bei der Bestrahlung proteinreicher Lebensmittel durch Hydroxylierung aus der Aminosäure Phenylalanin gebildet wird (siehe Abschnitt 2.1.5.2). Eine Reihe von Arbeitsgruppen hat diese Methode zum Nachweis der Bestrahlung an bei Raumtemperatur bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln (z.B. Shrimps, Geflügelprodukten, Eiprodukten) angewendet (HEIN et al., 2000; KRACH et al., 1999; KRACH et al., 1997; MEIER et al., 1996; CHUAQUI-OFFERMANN und MCDOUGALL, 1991). Die Methode ist bis heute nicht vollständig validiert. Untersuchungen von KRAJNIK et al. (1995) haben gezeigt, dass bei der Bestrahlung von gefrorenen Phenylalanin-Lösungen kein o-Tyrosin entsteht. Bei der Bestimmung von nicht proteingebundenem o-Tyrosin in tiefgefroren bestrahlten Nordseegarnelen konnten HUNKOVA et al. (2000) keine dosisabhängige Bildung feststellen. Die routinemäßige Anwendbarkeit der Methode auf gefroren bestrahlte Produkte ist daher fraglich.

### **2.2.4.2 Nachweis von Tryptophan-Radiolyseprodukten**

In Anlehnung an die o-Tyrosin-Methode entwickelte VAN WICKERN (1997) eine Methode zur Bestimmung von OH-TRP-Isomeren in  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen, Hühnerfleisch und Eiklar nach enzymatischer Hydrolyse. Bei dieser Methode traten jedoch hohe Blindwerte auf, so dass bei niedrigen Bestrahlungsdosen (bis 3 kGy) vor allem für Nordseegarnelen keine signifikanten Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben festgestellt werden konnten. Es konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei diesen Blindwerten um natürliche Gehalte in den Garnelen oder um Artefakte handelt, die bei der Lagerung, durch mikrobielle Aktivität oder bei der Hydrolyse entstehen. Außerdem besteht die Möglichkeit einer Koelution bei der HPLC-Bestimmung, da außer einer Abtrennung der Enzyme durch Ultrafiltration kein weiteres Clean-up durchgeführt wurde.

### 3 Problemstellung

Der Einsatz von OH-TRP-Isomeren als Marker für bestrahlte Lebensmittel unter den von VAN WICKERN (1997) gewählten Bedingungen ist bisher nicht möglich. Es soll daher untersucht werden, ob die OH-TRP-Isomere bei Bestrahlung auch aus dem frei in den Nordseegarnelen vorkommenden TRP in ausreichender Menge gebildet werden. Dadurch könnte auf die Hydrolyse verzichtet und damit dieser Aufarbeitungsschritt als mögliche Ursache für eine Artefaktbildung ausgeschlossen werden. Dazu ist es zunächst notwendig, den Gehalt an freiem TRP und den TRP-Verlust bei Bestrahlung in Nordseegarnelen zu bestimmen. Anhand dieser Werte und der von VAN WICKERN (1997) ermittelten OH-TRP-Bildungsrate in bestrahlten TRP-Lösungen kann eine Abschätzung der zu erwartenden OH-TRP-Gehalte in  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen erfolgen. Sofern diese theoretischen Gehalte im nachweisbaren Bereich liegen, muss eine geeignete Methode zur Isolierung und gegebenenfalls auch zur Anreicherung der freien OH-TRP-Isomere aus den Nordseegarnelen entwickelt werden. Anhand der entwickelten Methode ist dann zu überprüfen, ob es sich bei den von VAN WICKERN (1997) gemessenen OH-TRP-Gehalten in den unbestrahlten Proben tatsächlich um Blindwerte handelt oder ob diese als Artefakte bei der Hydrolyse entstanden sind. Weiterhin ist die Dosisabhängigkeit der OH-TRP-Bildung und damit die Eignung der OH-TRP-Isomere als Bestrahlungsmarker für  $\gamma$ -bestrahlte Nordseegarnelen zu überprüfen.

Anhand eines Screenings soll nach weiteren möglichen Bestrahlungsmarkern in verschiedenen  $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln gesucht werden. Es sind hauptsächlich Aminosäure-Radiolyseprodukte zu erwarten, bei denen es sich vorwiegend um polare und schwerflüchtige Substanzen handelt. Das Screening soll daher mittels HPLC durchgeführt werden. Für die Detektion eignen sich Massenspektrometer, UV-, Fluoreszenz- (FL) und elektrochemische (EC) Detektoren. Bei dem Screening sollen nur die Substanzen berücksichtigt werden, die sowohl in bei Raumtemperatur als auch in gefroren bestrahlten Lebensmitteln nachweisbar sind. Potenzielle Bestrahlungsmarker müssen identifiziert werden. Des Weiteren sind die Gehalte der neuen Bestrahlungsmarker in den bestrahlten Lebensmitteln in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und gegebenenfalls Blindwerte in unbestrahlten Proben zu bestimmen. Abschließend soll die Eignung der

neuen Markersubstanzen für einen Bestrahlungsnachweis in proteinreichen und zugleich fettarmen Lebensmitteln diskutiert werden.

Weiterhin sollen die sensorischen Veränderungen in  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen untersucht werden. Zunächst soll festgestellt werden, ob ein ungeschulter Verbraucher bestrahlte Nordseegarnelen von unbestrahlten anhand des Aussehens, des Geruchs, des Geschmacks sowie der Textur unterscheiden kann und inwiefern diese Veränderungen zu einer negativen Bewertung durch den Verbraucher führen. Anschließend sollen diese Veränderungen gegebenenfalls im Rahmen einer Profilprüfung von einem geschulten Sensorik-Panel in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis beschrieben und quantifiziert werden. Weiterhin soll untersucht werden, ob sich durch die Anwendung physikalischer Messverfahren wie die instrumentelle Texturprofilanalyse (TPA) und Farbmessung einfache Parameter zur Qualitätskontrolle und Qualitätssicherung von bestrahlten Nordseegarnelen festlegen lassen. Die Ergebnisse dieser Messungen sollen mit den Ergebnissen der sensorischen Beurteilung durch ein geschultes Panel verglichen werden.

## 4 Probenmaterial und Bestrahlungsbedingungen

### 4.1 Probenmaterial

#### 4.1.1 Garnelen

Garnelen besitzen eine große kulinarische Bedeutung. Vor allem die in den letzten Jahren erheblich verbesserten Transportmöglichkeiten sowie ein anhaltender Trend zu hochwertigen Feinkostprodukten haben die Garnelen zu einer weit verbreiteten Delikatesse werden lassen. Darüber hinaus zeichnen sich Garnelen durch ihr ernährungsphysiologisch wertvolles Fleisch aus.

Die Garnele zählt gemeinsam mit dem Hummer, der Languste und dem Flusskrebs zur Gattung der Krustentiere. Es werden vier Familien unterschieden: die Geißelgarnelen (*Penaeidae*), die Tiefseegarnelen (*Pandalidae*), die Felsengarnelen (*Palaemonidae*) und die Sandgarnelen (*Crangnidae*). Die *Penaeidae* besitzen den größten Marktanteil. Die bedeutendsten Fanggründe liegen an der Ost- und Westküste der nordamerikanischen Staaten sowie im Indopazifik. Sie werden aufgrund ihres Lebensraumes als Tiefsee- bzw. Kaltwasser-Garnelen bezeichnet. In Norddeutschland werden hauptsächlich die Nordseegarnelen verzehrt, die zu den Sandgarnelen gehören. Sie leben auf dem sandigen, schlickigen Boden in flachen Küstengewässern und in den Prielen des Wattenmeeres und werden daher auch als Warmwasser-Garnelen bezeichnet.

Garnelen zeichnen sich aufgrund ihrer Zusammensetzung (s. Tabelle 4.1) durch eine hohe Verderblichkeit aus. Neben dem hohen Wasser- und Proteingehalt spielt auch der hohe Gehalt an freien Aminosäuren (s. Tabelle 4.2) bei dem Verderb eine große Rolle. Dieser Aminosäurepool dient vor allem Krustentieren aus salzhaltigen Gewässern dazu, das osmotische Gleichgewicht mit ihrer Umwelt aufrecht zu erhalten (CLAYBROOK, 1983; WEBER und VAN MARREWIJK, 1972). Die zur Zeit beim Fang, Transport und Verarbeitung eingesetzten Methoden ermöglichen keine ausreichende Reduzierung der Keimbelastung. Trotz Kochen der Garnelen direkt nach dem Fang werden zumeist nicht alle Keime abgetötet, da die Einhaltung der Kochtemperatur und -dauer nicht gewährleistet ist. Bei den Temperaturen von ca. 90 °C werden außerdem die proteolytischen Enzyme nicht vollständig inaktiviert (HOVART et al., 1972). Wegen der hohen Verderblichkeit wird in vielen Ländern eine Konservierung mit  $\gamma$ -Strahlen durchgeführt. Ein Nachweis der Bestrahlung ist aber

zur Zeit bei geschälten Shrimps aufgrund des niedrigen Fettgehaltes (Tabelle 4.1) schwierig. Für einen Bestrahlungsnachweis über Aminosäure-Radiolyseprodukte ohne Hydrolyse ist der Gehalt an freien Aminosäuren in den Garnelen (Tabelle 4.2) von Bedeutung.

**Tabelle 4.1** Zusammensetzung verschiedener Garnelenarten in g/100g Frischgewicht (SOUCI et al., 1994; TAKADA et al., 1988)

	Nordseegarnelen ( <i>Crangon crangon</i> )	Black Tiger Shrimps ( <i>Penaeus monodon</i> )	Tiefsee Shrimps ( <i>Penaeus indicus</i> )
Wasser	78,4	77,9	81,7
Protein	18,6	19,0	16,4
Fett	1,4	2,0	1,1
Mineralstoffe	1,4	1,1	0,8

**Tabelle 4.2** Freie Aminosäuren in Nordseegarnelen (WEBER und VAN MARREWIJK, 1972), Black Tiger und Tiefsee Shrimps (TAKADA et al., 1988) in mg/kg Frischgewicht

Aminosäure	Nordseegarnelen ( <i>Crangon crangon</i> )	Black Tiger Shrimps ( <i>Penaeus monodon</i> )	Tiefsee Shrimps ( <i>Penaeus indicus</i> )
Alanin	1571	1440	470
Arginin	3383	4060	3600
Asparagin	98	400	180
Asparaginsäure	31	30	20
Glutamin	1172	1560	400
Glutaminsäure	518	340	210
Glycin	17557	6180	2880
Histidin	149	170	80
Isoleucin	150	180	110
Leucin	278	340	180
Lysin	140	390	220
Methionin	181	180	110
Ornithin	Spur	360	330
Phenylalanin	84	140	80
Prolin	3232	4550	630
Serin	169	460	180
Taurin	1229	500	1260
Threonin	108	290	130
Tryptophan	nicht bestimmt	110	nicht bestimmt
Tyrosin	105	190	70
Valin	265	390	150

Nordseegarnelen kommen in geschälter und ungeschälter Form hauptsächlich gekühlt aber auch tiefgefroren in den Handel. Dagegen werden importierte Garnelen fast ausschließlich tiefgefroren gehandelt.

Für die Untersuchungen wurden kommerziell erhältliche Nordseegarnelen verwendet. Ungeschälte, gekühlte Nordseegarnelen wurden per Hand geschält und anschließend bei -18 °C tiefgefroren. Weiterhin wurden tiefgekühlte Shrimps im Supermarkt gekauft. Bei den „Black Tiger Shrimps“ handelt es sich um Shrimps der Art *Penaeus monodon* aus Farmhaltung. Die unter der Bezeichnung „Tiefsee Shrimps“ erhältlichen Garnelen gehören ebenfalls zur Gattung *Penaeus*. Es handelt sich aber vornehmlich um die Arten *Penaeus indicus* und *Penaeus merguensis* (genaue Probenvorbereitung s. Anhang 10.5.1).

#### 4.1.2 Hühnerbrustfleisch

Hühnerbrustfleisch ist das von Fett und Knochen befreite Brustmuskelfleisch von Hähnchen. In Tabelle 4.3 ist die durchschnittliche Zusammensetzung von Hühnerbrustfleisch dargestellt.

Geflügelfleisch ist ernährungsphysiologisch hochwertig. Allerdings tritt häufig eine mikrobielle Kontamination mit Salmonellen auf. Aus diesem Grunde erlauben viele Länder die Behandlung von Geflügelfleisch mit  $\gamma$ -Strahlen zur Abtötung der pathogenen Mikroorganismen. Ein Bestrahlungsnachweis kann zum einen anhand der ESR-Spektroskopie von spezifischen Radikalen in Knochen und zum anderen über strahleninduzierte Fettveränderungen erfolgen. Die ESR-Methode lässt sich jedoch nicht für entbeintes Hühnerfleisch anwenden. Aufgrund des sehr geringen Fettgehaltes (Tabelle 4.3) von Hühnerbrustfleisch ist die Identifizierung charakteristischer Fettradiolyseprodukte sehr aufwendig. Für einen Bestrahlungsnachweis über Aminosäureradiolyseprodukte ohne Hydrolyse ist der Gehalt an freien Aminosäuren im Hühnerbrustfleisch wichtig (Tabelle 4.4). Im Vergleich zu den Garnelen besitzt Hühnerbrustfleisch hohe Anteile an den Aminosäuren Lysin und Histidin. Die Gehalte an freien Aminosäuren liegen ca. um den Faktor 5 niedriger als in den Garnelen.

Für die Untersuchungen wurde frisches Hühnerbrustfleisch im Supermarkt gekauft und anschließend bei -18 °C tiefgefroren (genaue Probenvorbereitung s. Anhang 10.5.2).

**Tabelle 4.3** *Zusammensetzung von Hühnerbrustfleisch (SOUCI et al., 1994)*

	g/100g Fleisch
Wasser	75,0
Protein	22,8
Fett	0,9
Mineralstoffe	1,2

**Tabelle 4.4** *Freie Aminosäuren im Hühnerbrustfleisch (MILLER et al., 1965)*

Aminosäure	mg/kg Fleisch
Alanin	93,5
Arginin	69,0
Asparaginsäure	26,8
Glutaminsäure	185,4
Glycin	47,7
Histidin	2963,6
Isoleucin	31,3
Leucin	64,8
Lysin	2690,3
Methionin	49,5
Phenylalanin	33,4
Prolin	43,4
Serin	135,6
Taurin	124,5
Threonin	50,0
Tyrosin	50,6
Valin	47,6

### 4.1.3 Hühnereiklar

Eiklar ist eine ca. 10%ige Lösung verschiedener Proteine (Tabelle 4.5). Es besteht aus zwei dünnflüssigen Schichten, die durch eine zähflüssige Schicht getrennt sind. Mit Ausnahme von Lysozym handelt es sich bei allen Eiklarproteinen um Glykoproteine, an deren durchgehender Polypeptidkette Oligosaccharide in unterschiedlicher Zahl und Zusammensetzung kovalent gebunden vorkommen. Das Hauptprotein des Eiklars ist das Ovalbumin (ACKER und TERNES, 1994). Hühnereiklar wird in großen Mengen in der Backwarenindustrie eingesetzt. Tiefgekühlt ist pasteurisiertes flüssiges Hühnereiklar ein Jahr haltbar. Ebenso wie Hühnerfleisch ist auch Eiklar stark mit Salmonellen belastet. Eine Bestrahlung von Eiklar zum Abtöten pathogener Mikroorganismen wird von Mikrobiologen empfohlen.



**Tabelle 4.5** *Zusammensetzung von Hühnereiklar (SOUCI et al., 1994)*

	g/100g Eiklar
Wasser	87,3
Protein	11,1
Fett	0,2
Kohlenhydrate	0,7
Mineralstoffe	0,7

**Tabelle 4.6** *Freie Aminosäuren im Hühnereiklar (PARTMANN und SCHLASZUS, 1980)*

Aminosäure	mg/kg Flüssigeiklar
Alanin	1,52
Arginin	2,97
Asparagin	0,39
Asparaginsäure	1,92
Glutamin	1,54
Glutaminsäure	4,64
Glycin	0,99
Histidin	1,02
Isoleucin	1,89
Leucin	5,86
Lysin	0,38
Methionin	1,57
Ornithin	0,17
Phenylalanin	5,64
Prolin	1,97
Serin	0,69
Threonin	0,47
Tryptophan	0,80
Tyrosin	3,57
Valin	2,15

Bisher wird ein Bestrahlungsnachweis bei Eiklar nur indirekt mittels ESR-Spektroskopie über die spezifischen Radikale des Verpackungsmaterials geführt. Einen direkten Nachweis von Radiolyseprodukten im Eiklar gibt es bisher noch nicht. Für einen Bestrahlungsnachweis über Aminosäure-Radiolyseprodukte ohne Hydrolyse der Eiklarproteine ist der Gehalt an freien Aminosäuren im Eiklar von Bedeutung (Tabelle 4.6). Mit Ausnahme von Cystin kommen alle Aminosäuren im Eiklar frei vor. Die Gehalte sind jedoch mit ca. 40 mg freie Aminosäuren pro kg Eiklar sehr gering.

Für die Untersuchungen wurden Hühnereier aufgeschlagen und das Eiklar isoliert. Das gesammelte Eiklar wurde anschließend bei -18 °C tiefgefroren (genaue Probenvorbereitung s. Anhang 10.5.3).

#### **4.1.4 Aminosäure-Modell-Lösungen**

Zur Überprüfung, ob es sich bei den in Lebensmitteln detektierten Radiolyseprodukten um von Aminosäuren abgeleitete Produkte handelt, wurden verschiedene bestrahlte Modell-Lösungen untersucht:

- TRP-Lösung
- Aminosäure-Modell-Lösung mit TRP-Zusatz
- Aminosäure-Modell-Lösung ohne TRP-Zusatz
- Benzoessäure-Lösung.

Die Aminosäure-Modell-Lösung wurde entsprechend den Gehalten an freien Aminosäuren in Nordseegarnelen (siehe Abschnitt 4.1.1, WEBER und VAN MARREWIJK, 1972) angesetzt. Für die Untersuchung von TRP-Radiolyseprodukten wurde diese Modell-Lösung einmal mit TRP- und einmal ohne TRP-Zusatz hergestellt. Zur Überprüfung der Abhängigkeit der Bildung von TRP-Radiolyseprodukten von der Anwesenheit anderer Aminosäuren wurde außerdem eine reine TRP-Lösung bestrahlt. Da die Nordseegarnelen direkt nach dem Fang auf dem Schiff unter Zusatz von Benzoessäure gekocht werden, wurde ebenfalls eine Benzoessäure-Lösung zur Untersuchung der Benzoessäure-Radiolyseprodukte bestrahlt (genaue Probenvorbereitung siehe Anhang 10.5.4).

## 4.2 Bestrahlungsanlagen und -bedingungen

Die Bestrahlung der Proben bei Raumtemperatur mit den Zieldosen 1, 3, 5 und 10 kGy erfolgte in einer Blutbestrahlungsanlage IBL-437C (CIS-Isotopendiagnostik) der Firma Beiersdorf AG, Hamburg. Die Anlage besitzt eine  $^{137}\text{Cs}$ -Strahlenquelle, die Dosisleistung betrug zum Zeitpunkt der Bestrahlung ca. 0,5 kGy/h. Diese Anlage wird zu mikrobiologischen Forschungszwecken eingesetzt.

Die Bestrahlung der Proben im gefrorenen Zustand mit den Zieldosen 1, 3, 5, und 10 kGy erfolgte in einer kommerziellen Bestrahlungsanlage der Firma Gammaster in Etten Leur, Niederlande. Die Anlage besitzt eine  $^{60}\text{Co}$ -Strahlenquelle, die Dosisleistung betrug zum Zeitpunkt der Bestrahlung ca. 2 kGy/h.

Die Kontrolle der absorbierten Dosis wird mit „Amber Perspex“ Dosimetern durchgeführt. Je nach absorbierte Strahlendosis verfärben sich die zwischen den Proben verteilten Messplättchen aus Polyacrylmetacrylat. Diese Verfärbung wird photometrisch bestimmt.

Die genauen Bestrahlungsbedingungen sind im Anhang 10.6 aufgeführt.



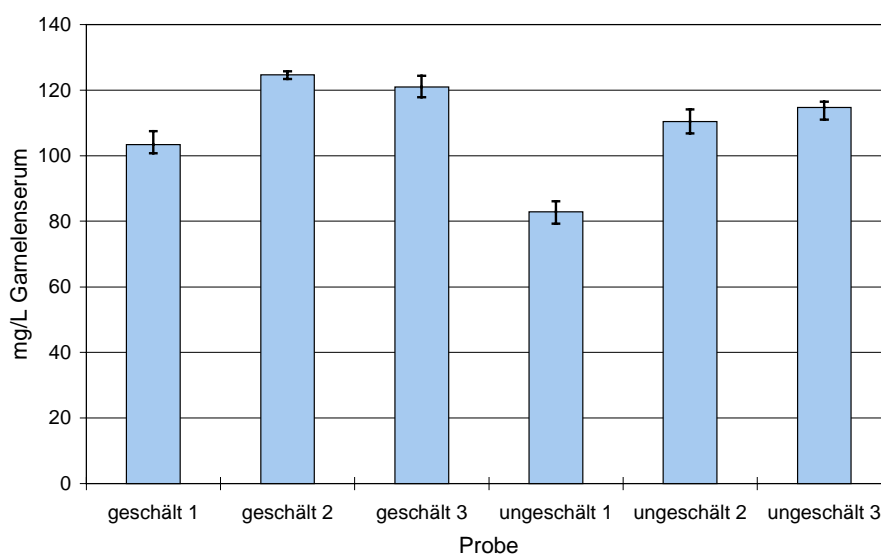
## 5 Bestimmung von OH-TRP-Isomeren in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen

### 5.1 Abschätzung der in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen zu erwartenden Gehalte an freien OH-TRP-Isomeren

Eine Abschätzung des in den bestrahlten Nordseegarnelen zu erwartenden Gehaltes an freien OH-TRP-Isomeren kann über den Gehalt an freiem TRP in verschiedenen unbestrahlten Handelsproben, den Verlust an freiem TRP bei bestrahlten Proben und die von VAN WICKERN (1997) ermittelte OH-TRP-Bildungsrate in bestrahlten TRP-Lösungen erfolgen.

#### 5.1.1 Bestimmung von TRP in verschiedenen Handelsproben

Die Bestimmung des freien TRP in verschiedenen Garnelenproben erfolgte in Anlehnung an die Methode der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG zur Bestimmung von TRP in diätetischen Lebensmitteln (BgVV, 1989) mittels HPLC an einer RP18-Säule und FL-Detektion. Zur Isolierung des freien TRP wurden die Garnelen ausgepresst und das resultierende Garnelenserum mit Essigsäure deproteiniert (genaue Durchführung siehe Anhang 10.7.1).



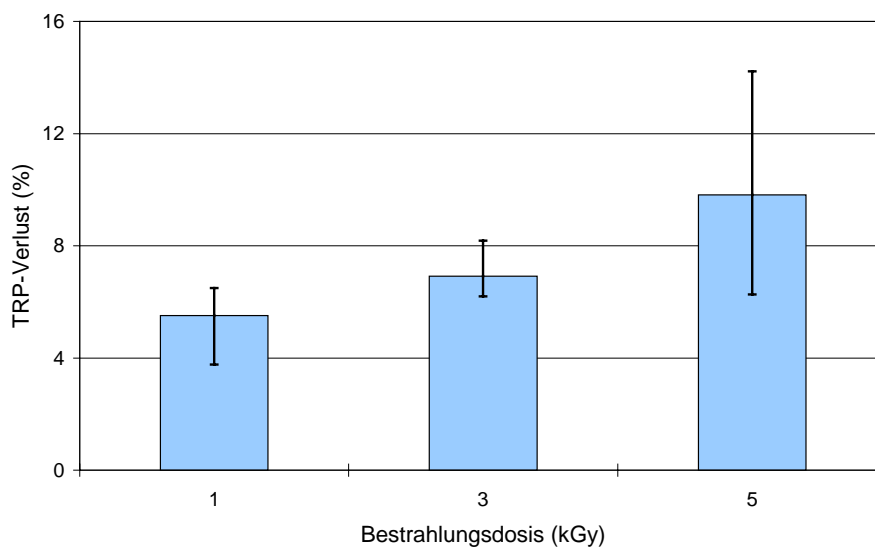
**Abbildung 5.1** TRP-Gehalt in verschiedenen Nordseegarnelen (Fehlerbalken = Spannweite)

Es wurden drei ungeschälte und drei geschälte Nordseegarnelen-Proben untersucht (siehe Abbildung 5.1). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte einer Fünffachbestimmung (Einzelergebnisse siehe Anhang 10.7.1). Die Fehlerbalken geben die Spannweite an.

Die TRP-Gehalte schwankten zwischen 80 - 130 mg/L Garnelenserum. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen geschälten und ungeschälten Proben feststellbar.

### 5.1.2 Bestimmung des TRP-Verlusts in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen

Zur Bestimmung des TRP-Verlusts in  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen wurden unbestrahlte und mit den Dosen 1, 3 und 5 kGy bestrahlte Nordseegarnelen der gleichen Charge nach der in Abschnitt 5.1.1 beschriebenen Methode auf ihren Gehalt an freiem TRP untersucht. Abbildung 5.2 zeigt den prozentualen TRP-Verlust (bezogen auf den TRP-Gehalt in den unbestrahlten Proben) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Es sind jeweils die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung dargestellt (Einzelergebnisse siehe Anhang 10.7.2). Die Fehlerbalken geben die Spannweite an. Der TRP-Verlust nimmt mit steigender Bestrahlungsdosis zu. Bereits bei einer Bestrahlungsdosis von 1 kGy ist ein TRP-Verlust von ca. 5% zu messen, der bei Bestrahlung mit 5 kGy auf 10% ansteigt.



**Abbildung 5.2** Prozentualer TRP-Verlust in  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen (Fehlerbalken = Spannweite)

### 5.1.3 Abschätzung der zu erwartenden OH-TRP-Gehalte

VAN WICKERN (1997) bestimmte eine Bildungsrate von 0,1 - 2% bei 1 - 5 kGy für die OH-TRP-Isomere in bestrahlten TRP-Lösungen (200 mg/L). Geht man von der niedrigsten Bildungsrate von 0,1% und einem mittleren Gehalt an freiem TRP im Garnelenserum von 100 mg/L aus, sollten ca. 100  $\mu\text{g}$  OH-TRP-Isomere/L Garnelenserum gebildet werden. Da jedoch im Garnelenserum viele andere Inhaltsstoffe enthalten sind, ist davon auszugehen, dass diese ebenfalls mit den Hydroxylradikalen reagieren. Daher ist eine geringere OH-TRP-Bildungsrate zu erwarten. Auf diese niedrigere Bildungsrate weist auch der in den bestrahlten Nordseegarnelen gemessene TRP-Verlust hin. Er ist mit 5 - 10% sehr viel geringer als in den von VAN WICKERN (1997) untersuchten TRP-Lösungen (10 - 60%). Aber auch bei einer um den Faktor 10 geringeren Bildungsrate von 0,01% würde der OH-TRP-Gehalt noch ca. 10  $\mu\text{g}$ /L Garnelenserum betragen. Damit sollte bei einer Nachweisgrenze von 0,6 - 5,9  $\mu\text{g}$ /L Garnelenserum (EC-Detektion, 0,75 V) ein Bestrahlungsnachweis über die freien OH-TRP-Isomere in Nordseegarnelen möglich sein.

## 5.2 Clean-up

Für einen möglichst empfindlichen Nachweis der OH-TRP-Isomere in Nordseegarnelen ist neben einer empfindlichen Detektion auch eine selektive Isolierung erforderlich. Zur Erzielung einer ausreichenden Messgenauigkeit ist aufgrund der sehr geringen zu erwartenden Gehalte an Radiolyseprodukten zusätzlich eine Anreicherung aus der Probenmatrix erforderlich.

### 5.2.1 Deproteinierung

Zunächst müssen die im Garnelenserum in größeren Mengen enthaltenen gelösten Proteine entfernt werden, da sie die Chromatographie stören und Schäden am HPLC-Säulenmaterial hervorrufen können.

Zur Abtrennung der Proteine wurden verschiedene Fällungsmethoden (Essigsäure-, Perchlorsäure-, Trichloressigsäure- und Sulfosalicylsäurefällung) und die Ultrafiltration getestet (Durchführung und Ergebnisse siehe Anhang 10.7.3.1).

Die besten Wiederfindungsraten und geringsten Schwankungen für 5-OH-TRP und TRP wurden mit  $95 \pm 1\%$  sowohl mit der Essigsäure- als auch mit der Perchlorsäurefällung erreicht. Bei den anderen drei Methoden lagen die Wiederfindungsraten für 5-OH-TRP nur zwischen 80 und 90%. Bei der Ultrafiltration traten zusätzlich höhere Schwankungen (8%) auf.

### 5.2.2 Ionenaustauschchromatographie

Bei den OH-TRP-Isomeren handelt es sich um amphotere Substanzen, die je nach pH-Wert als Kationen oder Anionen vorliegen. Die Isolierung dieser Substanzen aus der Probenmatrix sollte demnach mittels Ionenaustausch-Festphasenextraktion (SPE) möglich sein. Da die OH-TRP-Isomere nach der Proteinfällung mit Essigsäure als Kationen vorliegen, wurden verschiedene Kationenaustauscher getestet. GROSSI et al. (1990) verwendeten Propylsulfonsäure-Kationenaustauscher zur Isolierung von Serotonin aus Plasma. Serotonin weist als Decarboxylierungsprodukt von 5-OH-TRP ähnliche chemische Eigenschaften auf.

Die Versuche wurden beispielhaft für 5-OH-TRP an Kationenaustauschern mit einer Benzolsulfonsäure-Gruppe (SCX), einer Propylsulfonsäure-Gruppe (PRS) und einer Carboxymethyl-Gruppe (CBA) durchgeführt (Versuchsdurchführung und Ergebnisse siehe Anhang 10.7.3.2).



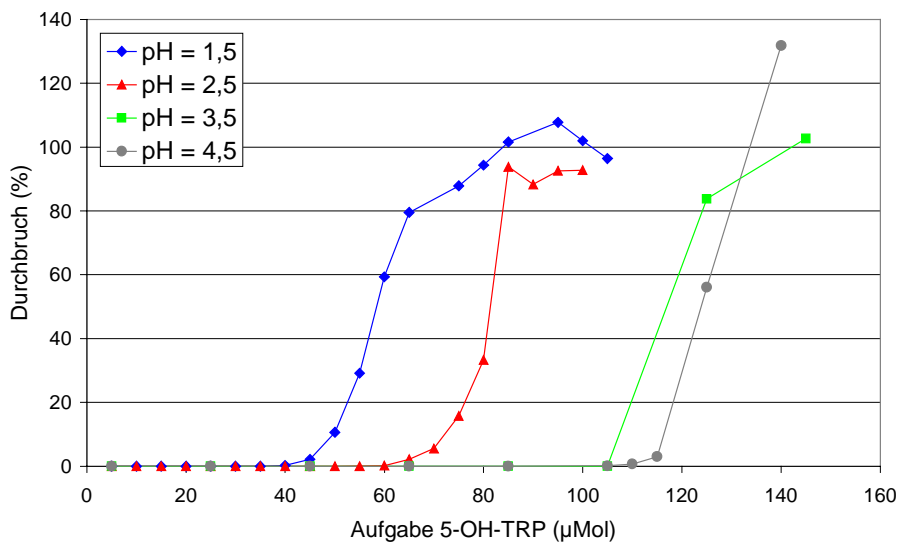
Nach Konditionierung der Säulen wurde die 5-OH-TRP-Standardlösung (pH 3,5) aufgegeben. Anschließend wurde mit Wasser gewaschen. Die Elution erfolgte zum einen mit Salzsäure 1 M und zum anderen mit einem Phosphat-Puffer-Gemisch mit organischem Modifier (GROSSI et al., 1990). Bei den CBA-Kationenaustauschern trat bereits bei der Probenaufgabe und im Waschschrift ein fast vollständiger Durchbruch auf, während bei den SCX-Kationenaustauschern unter den gleichen Bedingungen kein 5-OH-TRP eluiert werden konnte. Die besten Ergebnisse zeigten die PRS-Kationenaustauscher. Weder bei der Probenaufgabe noch beim Waschschrift war ein Durchbruch feststellbar. Die Elution von 5-OH-TRP gelang sowohl mit 1 M Salzsäure als auch mit dem Elutionspuffer nach GROSSI et al. (1990). Die beste Wiederfindungsrate von 76% wurde mit der PRS-Säule von Varian und dem Elutionspuffer nach GROSSI et al. (1990) erreicht. Grundsätzlich ist die PRS-SPE zur Isolierung der OH-TRP-Isomere geeignet. Zur Optimierung der Methode musste zunächst eine Charakterisierung der PRS-Kationenaustauscher erfolgen.

### **5.2.3 Bestimmung der Kapazität der PRS-Kationenaustauscher**

Die vom Hersteller angegebene Kapazität des PRS-Kationenaustauschers liefert einen ersten Anhaltspunkt auf die maximal aufzunehmende Menge an OH-TRP-Ionen. Sie ist von der Affinität der Ionen und dem pH-Wert abhängig. SAMUELSON (1963) stellte bei seinen Versuchen mit Kationenaustauschern fest, dass für verschiedene Metallionen die Durchbruchskapazität mit fallendem pH-Wert abnimmt. Die Kapazität des PRS-Kationenaustauschers wurde beispielhaft für 5-OH-TRP bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Alle folgenden Versuche wurden aufgrund der höheren Kapazität an den PRS-Säulen der Firma IST (Bad Homburg) durchgeführt. (Versuchsdurchführung siehe Anhang 10.7.3.3).

In Abbildung 5.3 ist die Abhängigkeit der Kapazität des PRS-Kationenaustauschers der Firma IST vom pH-Wert der Aufgabelösung dargestellt. Die vom Hersteller angegebene Kapazität dieser Säule beträgt 175  $\mu\text{Mol}$ . Es zeigt sich, dass bei einem pH-Wert von 1,5 nur 20% dieser Menge (35  $\mu\text{Mol}$ ) auf der Säule retardiert werden. Wird der Aufgabe-pH-Wert auf 2,5 erhöht, ergibt sich eine Steigerung um ca. 100% auf 60  $\mu\text{Mol}$ . Bei einem pH-Wert von 3,5 erfolgt nochmals eine Steigerung auf 105  $\mu\text{Mol}$ . Dies entspricht ca. 60% der vom Hersteller angegebenen Kapazität des

Ionenaustauschers. Das protonierte 5-OH-TRP konkurriert mit den  $H^+$ -Ionen um die Bindungsplätze auf dem Ionenaustauscher. Bei geringeren  $H^+$ -Konzentrationen wird das protonierte 5-OH-TRP verstärkt retardiert. Der pH-Wert kann nicht beliebig erhöht werden, da das 5-OH-TRP nur unterhalb des isoelektrischen Punktes (5,5) protoniert vorliegt. Eine weitere Erhöhung des pH-Wertes auf 4,5 hat entsprechend nur noch eine geringe Erhöhung der maximal retardierten Substanzmenge zur Folge. Es zeigt sich hier eine erhöhte Wiederfindung (>100%), die auf bereits einsetzende Elutionseffekte bei diesem pH-Wert zurückzuführen ist. Der optimale pH-Wert für die Retention von 5-OH-TRP auf der PRS-Säule der Firma IST beträgt daher 3,5.

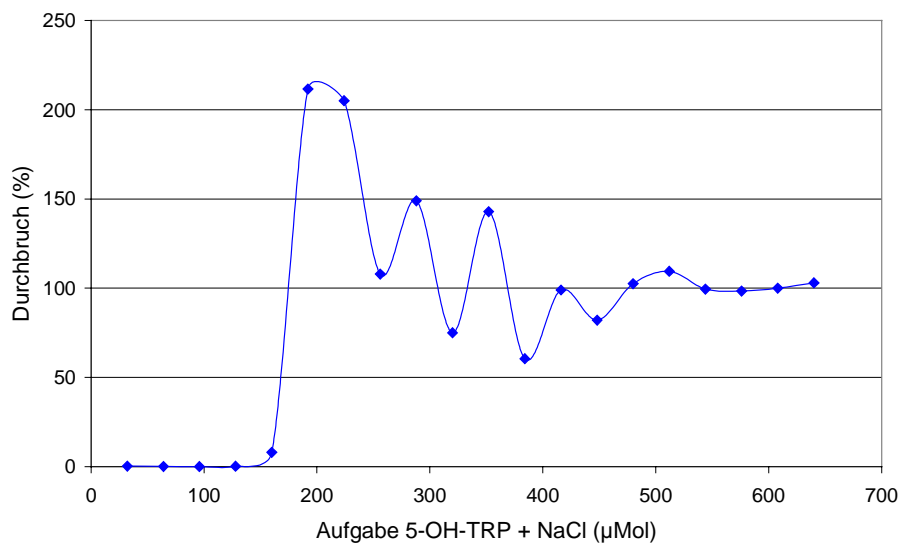


**Abbildung 5.3** Kapazitätskurven des PRS-Kationenaustauschers bei verschiedenen pH-Werten

#### 5.2.4 Untersuchung der Störeinflüsse durch das Garnelenserum bei der Isolierung von OH-TRP-Isomeren mittels PRS-SPE

Alle im Garnelenserum enthaltenen kationischen Inhaltsstoffe weisen ebenfalls eine bestimmte Affinität zum PRS-Kationenaustauscher auf und können damit die Kapazität der Säule für die OH-TRP-Isomere weiter herabsetzen. Dabei handelt es sich hauptsächlich um anorganische Kationen und Aminosäuren (siehe Kapitel 4.1.1). Um diese Störeinflüsse näher zu untersuchen, wurden einer 5-OH-TRP-Lösung jeweils definierte Mengen an Natriumchlorid und Alanin zugesetzt und wiederum die Kapazitätskurven aufgenommen (Versuchsdurchführung siehe Anhang 10.7.3.3).

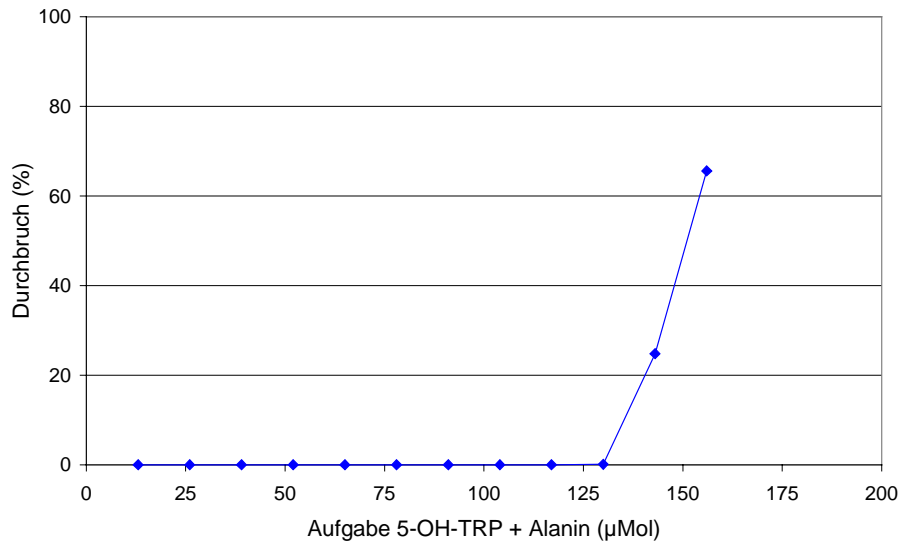
In Abbildung 5.4 ist ein merklicher Durchbruch erst nach einer Aufgabe von ca. 130  $\mu\text{Mol}$  5-OH-TRP + NaCl zu erkennen. Dieser Wert stimmt nahezu mit der für 5-OH-TRP allein ermittelten Kapazität von 105  $\mu\text{Mol}$  überein. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass beide Ionen ungefähr gleich gebunden werden. Die leichte Erhöhung der Kapazität kann darauf zurückgeführt werden, dass die kleinen Natriumionen noch Plätze auf dem Ionenaustauscher belegen können, die von den größeren 5-OH-TRP-Molekülen nicht mehr genutzt werden können.



**Abbildung 5.4** Kapazitätskurve des PRS-Kationenaustauschers mit Natriumzusatz

Die Natriumionen konkurrieren mit dem protonierten 5-OH-TRP um die Bindungsstellen auf dem Ionenaustauscher. Erst bei der Überschreitung der Kapazität des Ionenaustauschers zeigt sich der Elutionseffekt der Natriumionen. Bei weiterer Aufgabe von Probelösung wird das 5-OH-TRP durch die Natriumionen vollständig eluiert. Letzlich kommt es bei vollständiger Natrium-Belegung des Ionenaustauschers zur Gleichgewichtseinstellung (100% Durchbruch).

Abbildung 5.5 zeigt die Kapazitätskurve des PRS-Ionenaustauschers mit Alaninzusatz. Hier ist die Kapazität ebenfalls mit 130  $\mu\text{Mol}$  leicht erhöht. Wie bereits bei der Untersuchung des Natriumioneneinflusses beschrieben, können auch die Alaninmoleküle aufgrund ihrer geringeren Größe noch Plätze auf dem Ionenaustauscher belegen, die für das 5-OH-TRP nicht mehr zugänglich sind.



**Abbildung 5.5** Kapazitätskurve des PRS-Kationenaustauschers mit Alaninzusatz

Insgesamt kann gesagt werden, dass sowohl die Natriumionen als auch das Alanin mit dem 5-OH-TRP um freie Plätze auf dem Kationenaustauscher konkurrieren. Grundsätzlich sind die PRS-Kationenaustauscher zur selektiven Isolierung der OH-TRP-Isomere aus Garnelenserum geeignet. Um jedoch eine für den Nachweis der OH-TRP-Isomere ausreichende Menge an Garnelenserum auf die PRS-Säulen aufgeben zu können, müssen die störenden anorganischen Ionen und polaren Aminosäuren abgetrennt werden.

### 5.2.5 C18-Festphasenextraktion

OH-TRP-Isomere lassen sich sehr gut an einer C18-HPLC-Säule trennen. Daher sollte auch eine C18-Festphasenextraktion möglich sein. VAN WICKERN (1997) hat bereits verschiedene C18-Phasen zur Extraktion von OH-TRP-Isomeren getestet. Die besten Ergebnisse erzielte VAN WICKERN (1997) mit einer C18 OH-Säule der Firma Varian (Darmstadt). Bei der Anwendung der Methode auf Eiklarhydrolysate kam es jedoch aufgrund der hohen Aminosäuregehalte in den Hydrolysaten schon bei der Aufgabe und beim Waschen zu einem Durchbruch der Analyten. Eine Anwendung auf Garnelenserum, in dem wesentlich weniger Aminosäuren enthalten sind als in den Eiklarhydrolysaten, sollte möglich sein.

Es wurden die C18 OH-Säule und eine weitere C18 ec-Säule der Firma Varian zunächst mit 5-OH-TRP als Standardsubstanz getestet. Weiterhin wurde mit

5-OH-TRP dotiertes Garnelenserum auf die Säulen aufgegeben (Versuchsdurchführung und Ergebnisse siehe Anhang 10.7.3.4).

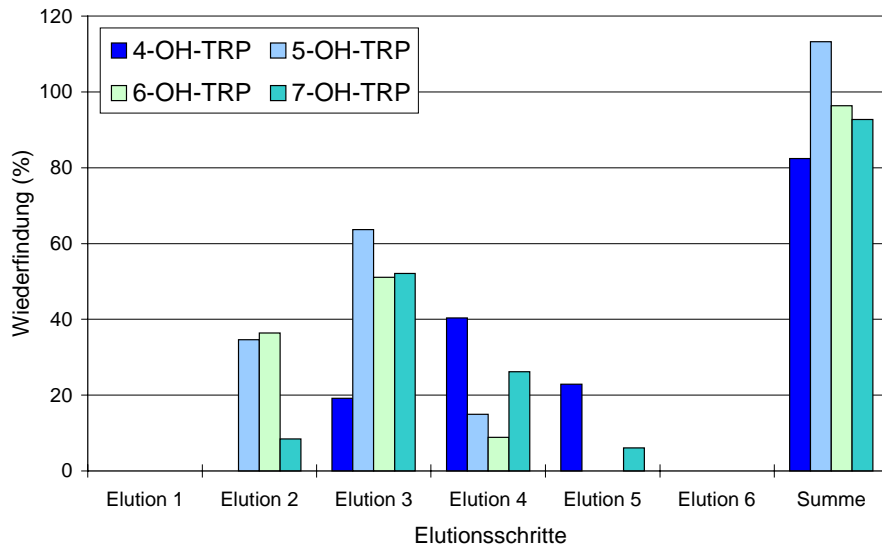
Beide C18-Säulen erwiesen sich als geeignet zur Isolierung des 5-OH-TRP-Standards. Weder bei der Probenaufgabe noch beim Waschschrift war ein Durchbruch erkennbar. 5-OH-TRP konnte mit einem Wasser/MeOH-Gemisch (50/50, v/v) vollständig eluiert werden. Bei der Anwendung auf dotiertes Garnelenserum zeigte sich nur die C18 ec-Säule als geeignet. Die Wiederfindung von 5-OH-TRP beträgt hier ebenfalls 100%. Bei der C18 OH-Säule kam es bereits bei der Probenaufgabe und beim Waschen zu einem fast vollständigen Durchbruch von 5-OH-TRP.

Damit ist die C18-SPE zur Isolierung von OH-TRP-Isomeren aus Garnelenserum geeignet. Allerdings reicht diese Reinigung noch nicht aus, da weitere Störpeaks im Chromatogramm des Elutionsschrittes zu erkennen sind. Außerdem wird das Garnelenserum durch den Elutionsschritt ca. um den Faktor 10 verdünnt, so dass die Gehalte der OH-TRP-Isomere in der Messlösung für einen Bestrahlungsnachweis zu gering werden. Die Entfernung der stark polaren kationischen Bestandteile des Garnelenserums müsste aber ausreichen, um den eigentlichen Reinigungsschritt des Kationenaustausches zu ermöglichen. Hierzu ist jedoch eine weitere Optimierung von Probenaufgabe, Waschschrift und Elution von der C18 ec-Phase notwendig.

### **5.2.6 Optimierung der C18-SPE**

Zur Optimierung der Probenaufgabe wurden 350 - 641  $\mu$ L dotiertes Garnelenserum auf die C18 ec-Phase (Fa. Varian, Darmstadt) aufgegeben und die Aufgabefraktionen auf einen Durchbruch der OH-TRP-Isomere untersucht. Bei allen Aufgabemengen waren für 5- und 6-OH-TRP geringe Durchbrüche zwischen 0 und 5% feststellbar, die jedoch vernachlässigbar sind. Bei 4- und 7-OH-TRP war kein Durchbruch zu erkennen.

Im Folgenden wurden 600  $\mu$ L Garnelenserum auf die PRS-Säulen aufgegeben und mit Wasser in 1 mL Schritten gewaschen. Es zeigte sich, dass mit drei mL Wasser ohne nennenswerten Durchbruch der OH-TRP-Isomere gewaschen werden kann. Erst im vierten mL traten Durchbrüche von ca. 7% für 5- und 6-OH-TRP und 2% für 7-OH-TRP auf.



**Abbildung 5.6** Optimierung der C18-Elution mit Wasser/MeOH 95/5 (v/v)

Die Elution sollte mit einem möglichst geringen MeOH-Anteil erfolgen, damit außer den OH-TRP-Isomeren nur wenig lipophile Störsubstanzen mit eluiert werden. Eine Elution der OH-TRP-Isomere sollte mit einem Gemisch aus Wasser/MeOH 95/5 (v/v) gelingen, da dieses auch für die HPLC-Trennung an einer C18-Säule eingesetzt werden kann. Es wurden daher 600  $\mu$ L Garnelenserum auf die PRS-Säulen aufgegeben, mit 3 mL Wasser gewaschen und anschließend in 1 mL Schritten mit Wasser/MeOH 95/5 (v/v) eluiert. In Abbildung 5.6 ist das Elutionsdiagramm dargestellt. Es zeigt sich, dass die OH-TRP-Isomere nach 5 mL vollständig von der C18-Phase eluiert sind. Lediglich für das 4-OH-TRP wird nur eine Wiederfindungsrate von 80% erreicht. (Versuchsdurchführung und Einzelergebnisse der Optimierung der C18-SPE siehe Anhang 10.7.3.5)

### 5.2.7 Optimierung der PRS-Elution (Box-Behnken-Versuchsplan)

Bei der Optimierung von Methoden ist es oft notwendig, mehrere Parameter zu betrachten, die einen Einfluss auf das gewünschte Endergebnis besitzen können. Die statistische Versuchsplanung bedient sich mathematischer Modelle, um den Einfluss einer großen Anzahl verschiedener Parameter bei möglichst geringem Aufwand zu überprüfen.

Für die Versuchsplanung müssen zunächst Ziel- und Einflussgrößen festgelegt werden. Die Zielgröße definiert das Resultat der Versuchsoptimierung, bei dem es sich z.B. um eine Ausbeutemaximierung oder eine Arbeitszeitminimierung handeln

kann. In diesem Fall stellt die Zielgröße die Maximierung der Wiederfindungsraten für die Elution der OH-TRP-Isomere von dem PRS-Kationenaustauscher dar. Unter den Einflussgrößen versteht man die Parameter, von denen die Zielgröße abhängig ist. Diese als Faktoren bezeichneten Einflussgrößen sind z.B. pH-Wert, Reagenzienkonzentration und Reaktionsdauer. Die Faktoren lassen sich meistens empirisch ermitteln. In diesem Fall zeigte sich bereits bei den Versuchen mit verschiedenen Kationenaustauschern (siehe Kapitel 5.2.2), dass die Parameter Ionenstärke, pH-Wert und Modifizieranteil mögliche Einflussgrößen für die PRS-Elution darstellen.

Zur Planung und statistischen Auswertung eines Versuches sind drei verschiedene mathematische Modelle beschrieben worden, die sich zum einen im benötigten experimentellen Aufwand und zum anderen in der Aussagekraft der gewonnenen Informationen unterscheiden.

Bei der **OVAT-Methode (One-Variable-At-a-Time)** werden alle Parameter schrittweise nacheinander optimiert. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Faktoren nicht erkannt werden. Da außerdem nur ein sehr enger Ausschnitt aller möglichen Wertekombinationen untersucht wird, handelt es sich bei dem gefundenen Optimum oftmals gar nicht um das tatsächliche Optimum (OTTO, 1997). Bei der Untersuchung mehrerer Parameter kann der experimentelle Aufwand sehr groß werden.

Bei der **sequenziellen Optimierung** werden die Parameter gleichzeitig untersucht. Hierbei bauen die Experimente aufeinander auf, so dass der vorherige Versuch die Parametereinstellungen des folgenden Versuches festlegt (Simplexverfahren). Da nur systematisch nach einem Optimum gesucht wird, kommt der Größe der Änderung der einzelnen Parameter von Versuch zu Versuch (Schrittweite) eine besondere Bedeutung zu. Bei einer zu kleinen Schrittweite ist der experimentelle Aufwand sehr groß und es wird möglicherweise nur ein lokales Suboptimum gefunden. Ist die Schrittweite zu groß, wird vielleicht gar kein Optimum gefunden. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass Zusammenhänge zwischen den Zielgrößen und Einflussgrößen nicht näher untersucht werden (OTTO, 1997).

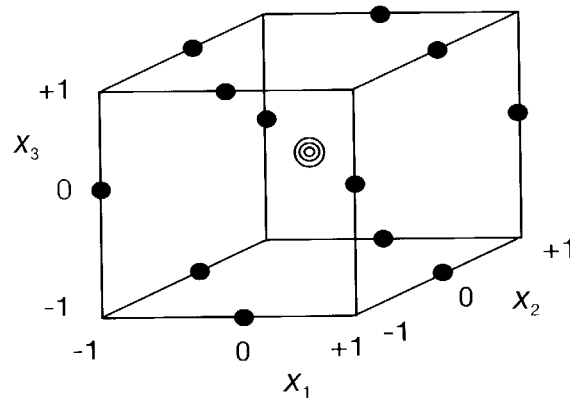
Bei der **simultanen Optimierung** werden Zusammenhänge zwischen der Zielgröße und den einzelnen Faktoren untersucht. Dazu werden Experimente durchgeführt, die einen bestimmten experimentellen Raum abdecken. Mit Hilfe eines mathematischen Modells können dann aus diesen Ergebnissen die Zielgrößenwerte an allen Stellen

des Raumes vorhergesagt und so das tatsächliche Optimum ermittelt werden (ESBENSEN et al., 1996; OTTO, 1997).

Zur Untersuchung des Einflusses der drei Faktoren Ionenstärke, pH-Wert und Modifizieranteil auf die Elution der OH-TRP-Isomere von dem PRS-Kationenaustauscher wurde das Verfahren der simultanen Optimierung gewählt. Dadurch können Aussagen über den Einfluss der einzelnen Faktoren sowie mögliche Wechselwirkungen gemacht werden. Der Aufwand einer Versuchsoptimierung ist von der Anzahl der Faktoren und der gewählten Versuchsstufen abhängig. Der Vorteil von mehreren Versuchsstufen liegt in einem höheren Informationsgewinn. So lassen sich bei der Verwendung von zwei Stufen nur lineare Zusammenhänge erkennen, während bei drei Stufen auch quadratische Zusammenhänge betrachtet werden können. Gleichzeitig mit der Stufenzahl erhöht sich jedoch die Anzahl der durchzuführenden Experimente beträchtlich. Die Anzahl der durchzuführenden Experimente beträgt bei  $n$  Stufen und  $k$  Faktoren  $n^k$ . Ein solcher vollständiger faktorieller Versuchsplan mit zwei Stufen und drei Faktoren läßt sich graphisch als Würfel darstellen, wobei jeder Eckpunkt einer Faktorenkombination ( $X_1, X_2, X_3$ ) eines Versuches entspricht. Die einzelnen Stufen werden durch die Kodierung +1 bzw. -1 beschrieben und stellen eine Erhöhung bzw. Erniedrigung einer vorher gewählten Standardgröße (0) des entsprechenden Faktors dar.

Für die vorliegende Fragestellung wurde ein Versuchsplan nach Box und Behnken verwendet. Ein dreistufiger Box-Behnken-Plan mit drei Faktoren benötigt insgesamt 15 Versuche (gegenüber 27 bei einem vollständigen faktoriellen Versuchsplan). Die einzelnen Versuche lassen sich graphisch ebenfalls als Würfel darstellen (Abbildung 5.7). Die Punkte befinden sich jedoch nicht an den Eckpunkten sondern in der Mitte der Kanten des Würfels. Ein spezieller Punkt (Zentralpunkt) befindet sich in der Mitte des Würfels. Der Versuch an diesem Punkt wird dreimal ausgeführt, um die versuchsbedingte Streuung der Messwerte zu bestimmen. Aus der berechneten Varianz wird die Signifikanz der Einflussgrößen ermittelt.





**Abbildung 5.7** Graphische Darstellung des Box-Behnken-Plans für drei Faktoren und drei Stufen

Im Folgenden werden die Einflussfaktoren näher definiert:

**Ionenstärke:** Als Elutionspuffer wurde statt des bisher verwendeten Natriumphosphat-Puffers ein Ammoniumformiat-Puffer verwendet. Die Elutionswirkung beruht auf der Verdrängung der OH-TRP-Isomere durch das Ammoniumion, das eine höhere Affinität zu dem Kationenaustauscher als das Natriumion besitzt. Die Untersuchung wurde für die drei Stufen 25, 50 und 75 mMol/L  $\text{NH}_4^+$  durchgeführt.

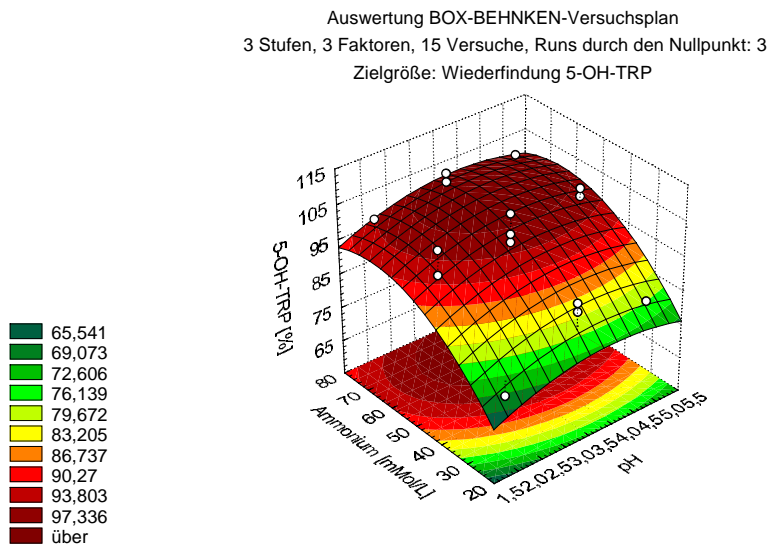
**pH-Wert:** Der pH-Wert des Elutionspuffers wurde im Bereich des optimalen Aufgabe-pH-Wertes 3,5 (siehe Kapitel 5.2.3) untersucht. Es wurden die Stufen pH 2, 3,5 und 5 gewählt.

**Modifizieranteil:** GROSSI et al. (1990) zeigten bei ihren Versuchen zur Festphasenextraktion von Serotonin eine Verbesserung der Elutionseigenschaften des Natriumphosphat-Puffers bei Zusatz von organischem Modifier. Es wurde daher der Einfluss verschiedener Methanolanteile im Elutionsgemisch auf die Elution der OH-TRP-Isomere untersucht. Die Versuche wurden für die Stufen 0, 10 und 20% Methanol durchgeführt.

Die Aufstellung und Auswertung des Box-Behnken-Plans erfolgte mit dem Programm STATISTICA (STATSOFT, Inc.; Version 5.1). Die ermittelten Wiederfindungsraten für die OH-TRP-Isomere wurden als Zielgrößen den jeweiligen Faktorkombinationen (Versuchen) zugeordnet (Box-Behnken-Versuchsplan, Durchführung und Einzelergebnisse siehe Anhang 10.7.3.6).

In Abbildung 5.8 ist ein 3D-Flächenplot des Box-Behnken-Versuchsplans für das 5-OH-TRP dargestellt. Die Wiederfindungsrate des 5-OH-TRP wird in Abhängigkeit von der  $\text{NH}_4$ -Konzentration und dem pH-Wert gezeigt. Der Methanolanteil beträgt

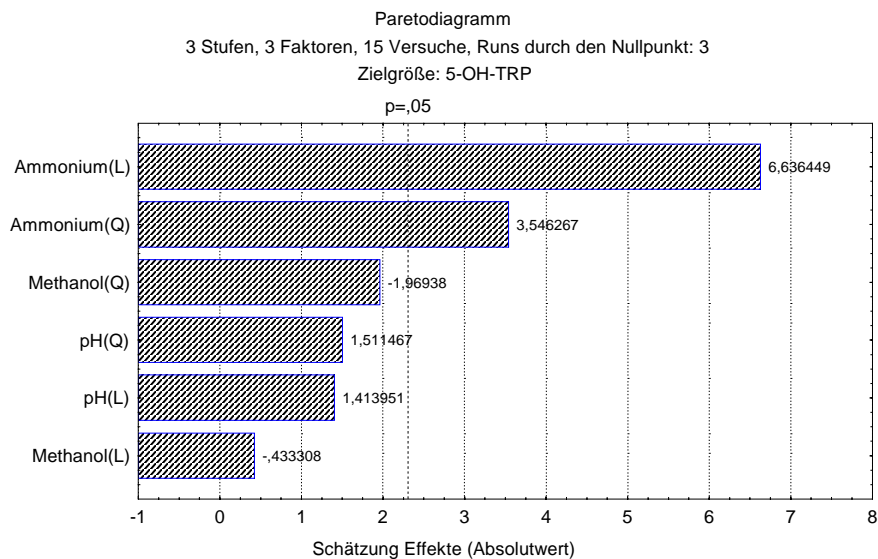
konstant 10%. Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte für die 15 Versuche dar. Der Zentralpunkt in der Mitte der Graphik zeigt exemplarisch für einen Elutionspuffer die Streuung der Messwerte an, aus der sich die Signifikanzen für die einzelnen Faktoren berechnen.



**Abbildung 5.8** 3D-Flächenplot für das 5-OH-TRP (Methanolanteil 10%)

Es ist zu erkennen, dass die Wiederfindungsrate deutlich mit der  $\text{NH}_4$ -Konzentration ansteigt. Auch mit ansteigendem pH-Wert ist ein Anstieg der Wiederfindungsrate zu verzeichnen, dieser ist jedoch sehr viel geringer. Der dunkelrote Bereich stellt die Zonen mit einer Wiederfindungsrate größer 97% dar. Es zeigt sich, dass die Wiederfindungsrate bei einer ausreichend hohen  $\text{NH}_4$ -Konzentration über einen großen pH-Bereich praktisch 100% beträgt.

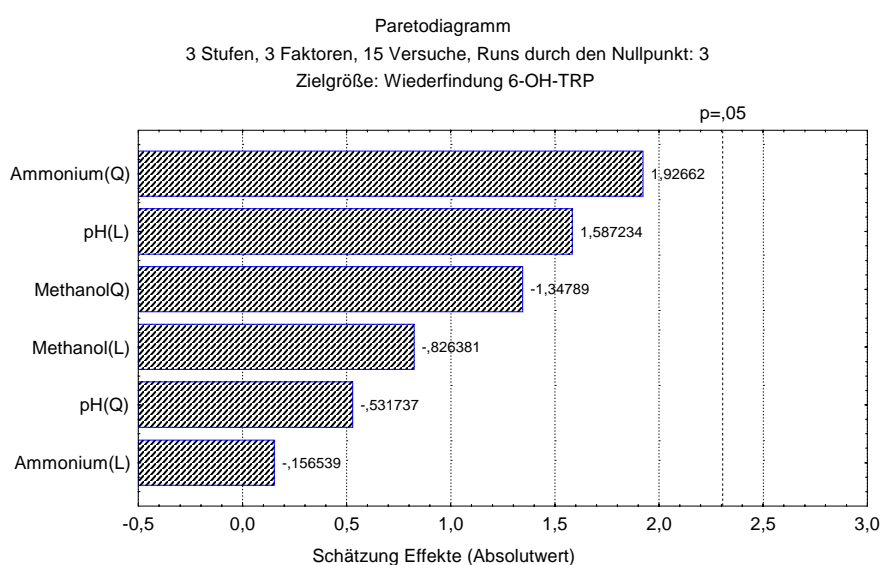
In Abbildung 5.9 ist das Paretdiagramm für das 5-OH-TRP dargestellt. In diesem Diagramm sind die Ergebnisse der statistischen Betrachtung der einzelnen Faktoren jeweils für eine lineare oder eine quadratische Abhängigkeit dargestellt. Signifikante Einflüsse werden durch Überschreitung einer Signifikanzschranke ( $p=0,05$ ) gezeigt. Das Diagramm zeigt, dass die  $\text{NH}_4$ -Konzentration (Ionenstärke) sowohl bei Betrachtung der linearen als auch der quadratischen Abhängigkeit einen signifikanten Einfluss ausübt. Für die Faktoren pH-Wert und Methanolanteil ist keine Signifikanz feststellbar. 4- und 7-OH-TRP zeigen analoge Ergebnisse. Auf eine graphische Darstellung wird daher verzichtet.



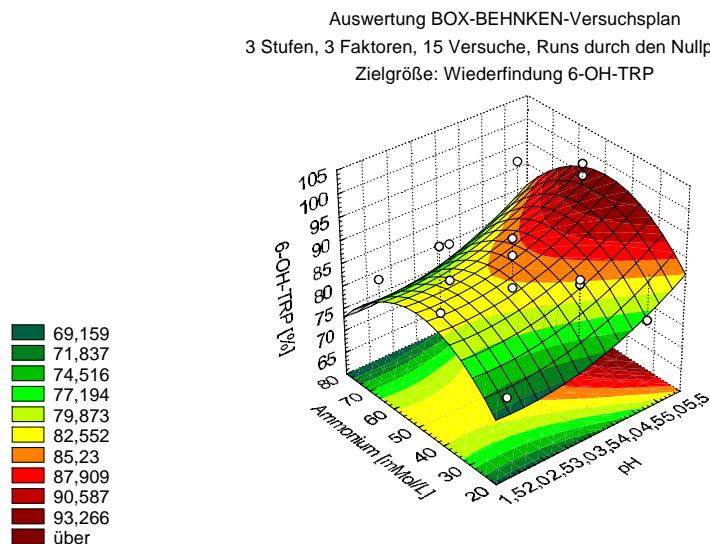
**Abbildung 5.9** Paretdiagramm für das 5-OH-TRP

Für das 6-OH-TRP konnte kein signifikanter Einfluss eines der Faktoren ermittelt werden (Abbildung 5.10). Die Gründe hierfür liegen in der starken Streuung der Wiederfindungsrate am Zentralpunkt (Abbildung 5.11). Aufgrund der höheren Varianz ist eine Signifikanz nicht mehr statistisch belegbar. Ein derartiges abweichendes Elutionsverhalten des 6-OH-TRP gegenüber den anderen Isomeren ist jedoch nicht zu erwarten.

Das 6-OH-TRP zeigt höhere Wiederfindungsraten bei höheren pH-Werten. Dieser Einfluss ist jedoch ebenfalls nicht signifikant.



**Abbildung 5.10** Paretdiagramm für das 6-OH-TRP



**Abbildung 5.11** 3D-Flächenplot für das 6-OH-TRP (Methanolanteil 10%)

Für die drei Faktoren Ionenstärke, pH-Wert und Methanolanteil im Elutionspuffer konnte nur für die Ionenstärke ein signifikanter Einfluss auf die Elution von 4-, 5- und 7-OH-TRP nachgewiesen werden. Für das 6-OH-TRP konnte dieser Zusammenhang nicht statistisch bewiesen werden. Die beste Elution sollte demnach mit einem Ammoniumformiat-Puffer möglichst hoher Ionenstärke ohne Modifieranteil im pH-Bereich von 3 - 5 erreicht werden. Um das Elutionsvolumen von 5 mL auf 1,5 mL reduzieren zu können, wurde im Folgenden die Elution von dem PRS-Kationenaustauscher mit einem Ammoniumformiat-Puffer (200 mMol, pH 3) durchgeführt. Dadurch konnte auf den Schritt der Lyophilisierung verzichtet werden.

### 5.2.8 Kopplung von PRS- und C18-SPE

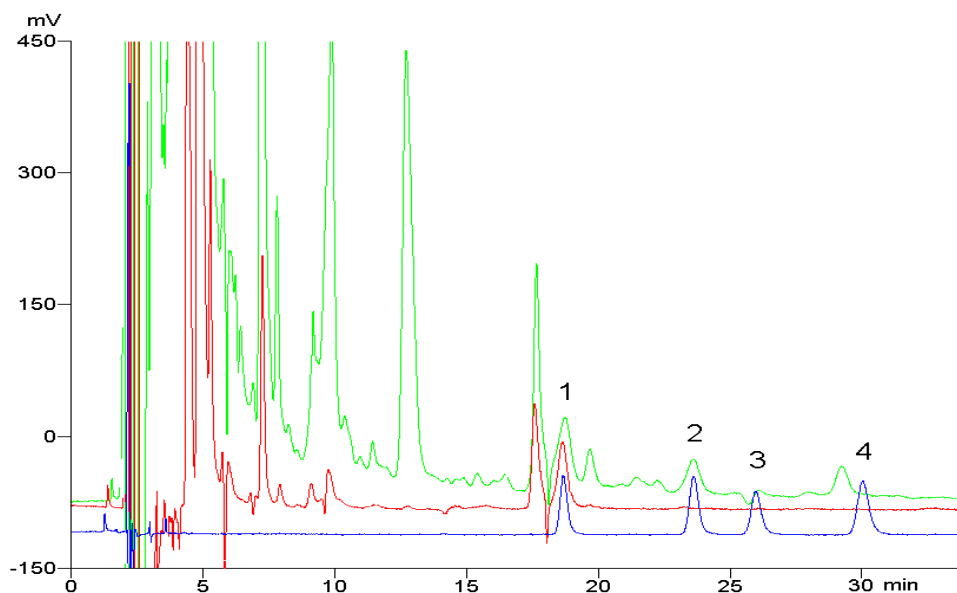
Nachdem die einzelnen Parameter der Proteinfällung, Probenaufgabe, Waschschrift und Elution für die beiden Festphasenextraktionen optimiert waren, sollte nun eine Kombination beider Clean-up-Schritte erfolgen und mit diesem Verfahren die Wiederfindungsraten der OH-TRP-Isomere in dotiertem Garnelenserum bestimmt werden (Durchführung und Einzelergebnisse siehe Anhang 10.7.4).

Die hohe durchschnittliche Wiederfindungsrate von 139% für 5-OH-TRP lässt sich dadurch erklären, dass in den Nordseegarnelen natürlicherweise schon 5-OH-TRP enthalten ist. Die Wiederfindungsraten für die nicht physiologischen OH-TRP-Isomere 6- und 7-OH-TRP sind mit ca. 75% zufriedenstellend. Lediglich für das 4-OH-TRP konnte nur eine Wiederfindungsrate von 57% erreicht werden.

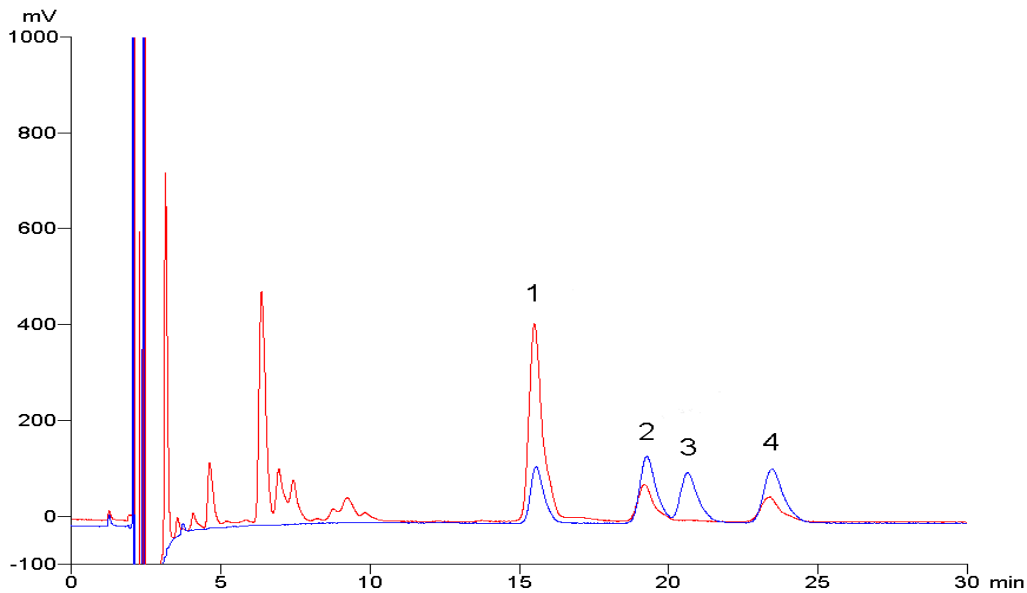
### 5.3 Bestimmung von OH-TRP-Isomeren in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen und Modell-Lösungen

Die entwickelte Methode wurde zur Bestimmung der OH-TRP-Gehalte in  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen angewendet (Durchführung siehe Anhang 10.7.4). Es wurden unbestrahlte und mit den Zieldosen 1, 3 und 5 kGy bestrahlte Garnelen untersucht. In Abbildung 5.12 sind die Chromatogramme von mit 5 kGy bestrahlten Garnelen ohne und nach dem SPE-Clean-up dargestellt. Zum Vergleich ist zusätzlich das Chromatogramm eines OH-TRP-Standards abgebildet. In dem Chromatogramm ohne Clean-up sind verschiedene Störpeaks zu erkennen, die durch die SPE abgetrennt werden. Außer 5-OH-TRP sind in den bestrahlten Garnelen keine weiteren OH-TRP-Isomere enthalten.

Um zu überprüfen, ob die Bildung der OH-TRP-Isomere in Anwesenheit anderer Aminosäuren unterdrückt wird, wurden eine bestrahlte TRP-Lösung und eine Aminosäure-Modell-Lösung mit dem gleichen TRP-Gehalt untersucht (genaue Zusammensetzung siehe Anhang 10.5.4). Die Versuchsdurchführung ist im Anhang 10.7.4 beschrieben.

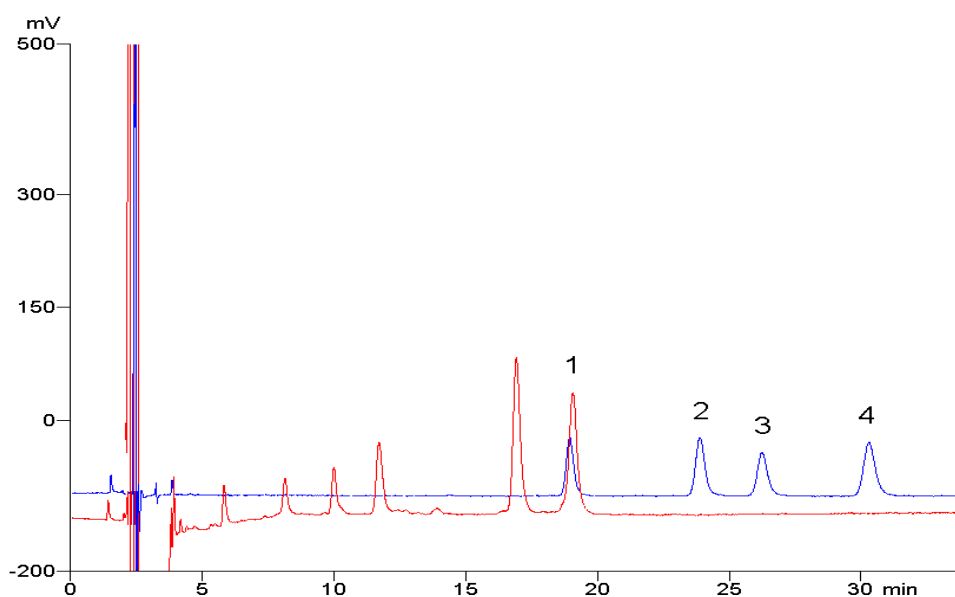


**Abbildung 5.12** OH-TRP-Isomere in  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen (5 kGy) vor und nach SPE-Clean-up (Nucleosil, 0,1% TFA/MeOH 93/7 (v/v), ECD 0,75 V); grün: vor SPE, rot: nach SPE, blau: OH-TRP-Standard 1 5-OH-TRP 2 6-OH-TRP 3 4-OH-TRP 4 7-OH-TRP



**Abbildung 5.13** OH-TRP-Isomere in  $\gamma$ -bestrahlter TRP-Lösung (5 kGy) nach SPE-Clean-up (Nucleosil, 0,1% TFA/MeOH 93/7 (v/v), ECD 0,75 V); rot: bestrahlte TRP-Lösung nach SPE, blau: OH-TRP-Standard **1** 5-OH-TRP **2** 6-OH-TRP **3** 4-OH-TRP **4** 7-OH-TRP

Abbildung 5.13 zeigt die Chromatogramme der bestrahlten TRP-Lösung nach SPE-Clean-up und des OH-TRP-Standards. In dem Chromatogramm der bestrahlten TRP-Lösung sind deutlich die Peaks von 5-, 6- und 7-OH-TRP zu erkennen. 4-OH-TRP ist nicht nachweisbar. In dem Chromatogramm der Aminosäure-Modell-Lösung, die den gleichen TRP-Gehalt aufweist, ist dagegen nur 5-OH-TRP nachweisbar (siehe Abbildung 5.14).



**Abbildung 5.14** OH-TRP-Isomere in  $\gamma$ -bestrahlter AS-Modell-Lösung (5 kGy) nach SPE-Clean-up (Nucleosil, 0,1% TFA/MeOH 93/7 (v/v), ECD 0,75 V); rot: bestrahlte AS-Lösung nach SPE, blau: OH-TRP-Standard **1** 5-OH-TRP **2** 6-OH-TRP **3** 4-OH-TRP **4** 7-OH-TRP

Die OH-TRP-Gehalte in den  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen und Modell-Lösungen wurden über eine externe Kalibrierreihe berechnet (siehe Anhang 10.4.2). Die Ergebnisse sind in den Tabellen 5.1 und 5.2 dargestellt. Im Vergleich zu der bestrahlten TRP-Lösung (123  $\mu\text{g/L}$ ) sind die 5-OH-TRP-Gehalte in der Aminosäure-Modell-Lösung um den Faktor 4 und in den bestrahlten Garnelen um den Faktor 7 geringer (Bestrahlungsdosis 5 kGy). Nur in der bestrahlten TRP-Lösung sind 6- und 7-OH-TRP mit ca. 50  $\mu\text{g/L}$  nachweisbar. Würden die nichtphysiologischen OH-TRP-Isomere in der Aminosäure-Modell-Lösung und in den Garnelen im gleichen Verhältnis wie in der TRP-Lösung bei der Bestrahlung gebildet, so müssten die Gehalte ca. 12 bzw. 4  $\mu\text{g/L}$  betragen. Diese Gehalte wären noch nachweisbar (Nachweisgrenzen siehe Anhang 10.4.2). Die Bildung der OH-TRP-Isomere wird in Anwesenheit anderer Aminosäuren und weiterer Inhaltsstoffe des Garnelenserums, die ebenfalls mit den OH-Radikalen reagieren, unterdrückt. Außerdem steigt der 5-OH-TRP-Gehalt in den Garnelen nicht linear mit der Bestrahlungsdosis an. Der höchste Gehalt wurde mit 18,4  $\mu\text{g/L}$  in der mit drei kGy bestrahlten Probe gefunden, bei 5 kGy nahm der 5-OH-TRP-Gehalt wieder ab.

Damit ist ein Bestrahlungsnachweis über die aus dem frei vorkommenden TRP in Nordseegarnelen entstehenden OH-TRP-Isomere nicht möglich.

**Tabelle 5.1** 5-OH-TRP-Gehalte in  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen

Probe	5-OH-TRP ( $\mu\text{g/L}$ Garnelenserum)
Unbestrahlt	3,9
1 kGy	11,3
3 kGy	18,4
5 kGy	16,9

**Tabelle 5.2** OH-TRP-Gehalte in  $\gamma$ -bestrahlten Modell-Lösungen (5 kGy)

Probe	4-OH-TRP $\mu\text{g/L}$ (Mol%)	5-OH-TRP $\mu\text{g/L}$ (Mol%)	6-OH-TRP $\mu\text{g/L}$ (Mol%)	7-OH-TRP $\mu\text{g/L}$ (Mol%)
TRP-Lösung (135 mg/L, 0,66 mMol/L)	<5,9 (<0,004)	122,8 (0,08)	52,1 (0,04)	51,2 (0,04)
Aminosäure-Modell-Lösung (TRP 135 mg/L, 0,66 mMol/L)	<5,9 (<0,004)	34,2 (0,02)	<1,4 (<0,001)	<2,2 (<0,002)

## 5.4 Diskussion

### 5.4.1 TRP-Verlust bei Bestrahlung

Die essenzielle Aminosäure TRP kommt in geringen Gehalten frei in Nordseegarnelen vor. Untersuchungen zum TRP-Verlust durch  $\gamma$ -Bestrahlung wurden bisher hauptsächlich an wässrigen TRP-Lösungen durchgeführt. Es hat sich gezeigt, dass der ermittelte TRP-Verlust von der eingesetzten TRP-Konzentration abhängig ist. JOSIMOVIC et al. (1983) stellten an niedrig konzentrierten Lösungen (200 mg/L) bei Bestrahlung zwischen 0,1 und 10 kGy eine lineare Abnahme des TRP-Gehaltes bis 1 kGy fest. Bei höheren Dosen kam es zu einer asymptotischen Annäherung an einen konstanten Wert. Bei der Verwendung hochkonzentrierter TRP-Lösungen (3 g/L) ermittelten ARMSTRONG und SWALLOW (1969) einen nahezu linearen Zusammenhang zwischen dem TRP-Verlust und der Bestrahlungsdosis im Bereich von 5 - 60 kGy. ANTUNES und NOVAK (1978) bestimmten das TRP/Protein-Verhältnis in bestrahlten Shrimps (2 - 45 kGy) nach Hydrolyse. Die Bestrahlung führte zu einer sehr geringen Abnahme des TRP/Proteinverhältnisses von ca. 2%. Für die eigenen Versuche wurde der Verlust des freien TRP in Nordseegarnelen bei Bestrahlung mit 1 - 5 kGy bestimmt. Der Gehalt an freiem TRP im Presssaft von unbestrahlten Garnelen wurde mit ca. 100 mg/L bestimmt. Bereits bei 1 kGy war ein TRP-Verlust von 5% festzustellen, der bei 5 kGy auf einen Wert von ca. 10% anstieg. Nach einem deutlichen TRP-Verlust bei 1 kGy ist es nicht zu einer linear höheren TRP-Abnahme bei stärkerer Bestrahlung gekommen. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von JOSIMOVIC et al. (1983) überein. Die Ursache für den asymptotischen Verlauf liegt möglicherweise in einer Konkurrenzreaktion zwischen TRP und bereits gebildeten Radiolyseprodukten. Durch Disproportionierungsreaktionen kann es außerdem zur Rückbildung von TRP unter gleichzeitiger Oxidation von Radiolyseprodukten kommen (GETOFF, 1992). Da TRP sehr empfindlich gegenüber Oxidationsreaktionen ist, kann es bereits durch längere Standzeiten und Erwärmung zum TRP-Abbau kommen. Dieser weitere Einflussfaktor ist im Rahmen der durchgeführten Versuche nicht untersucht worden.

### 5.4.2 Clean-up

Aufgrund der geringen erwarteten OH-TRP-Gehalte in den bestrahlten Nordseegarnelen musste eine Aufarbeitungsmethode entwickelt werden, die neben



einer selektiven Isolierung auch eine Konzentrierung der Analyten ermöglicht. Um Verluste und Artefaktbildung bei der Probenaufarbeitung zu vermeiden, wurde auf eine Homogenisierung mittels Ultra-Turrax oder Ultraschall-Extraktion verzichtet. Stattdessen wurde durch Auspressen der Nordseegarnelen ein Presssaft (Garnelenserum) hergestellt. Dies hatte zudem den Vorteil, dass keine Verdünnung der Probe erfolgte. Gelöste Proteine mussten vor der HPLC-Analyse abgetrennt werden, da sie die Säule beschädigen und so die chromatographische Trennung beeinflussen (LIU und WORTHEN, 1992). Es musste daher ein geeignetes Proteinfällungsverfahren gefunden werden, bei dem es zu keinen Verlusten der Analyten kommt (RALSTON und STREIN, 1997, BLANCHARD, 1981). Verschiedene Proteinfällungsmethoden mit Perchlorsäure, Essigsäure, Trichloressigsäure, 5-Sulphosalicylsäure, Aceton sowie die Ultrafiltration wurden an mit 5-OH-TRP dotierten Lösungen getestet. Die Fällungen durch Perchlorsäure und Essigsäure erwiesen sich als geeignet, da nahezu quantitative Wiederfindungen und keine Beeinflussungen der Chromatographie aufgetreten sind. Die einfache Proteinfällung war jedoch nicht ausreichend, um eine vollständige Abtrennung von Störsubstanzen zu erreichen. Die Analyse mittels HPLC-ECD (750 mV) zeigte noch zu viele Störsubstanzen im Elutionsbereich der OH-TRP-Isomere, die eine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung erschwerten. Zur weiteren Abtrennung von Matrixbestandteilen waren weitere Reinigungsschritte erforderlich. In Anlehnung an eine Methode von GROSSI et al. (1990) zur Bestimmung von Serotonin in Plasma wurde der Probenextrakt nach Proteinfällung einer weiteren Reinigung mittels SPE unterzogen. Zur Anwendung kamen verschiedene SPE-Kationenaustauschphasen (CBA, PRS und SCX). In Vorversuchen mit OH-TRP-Standardlösungen erwies sich der PRS-Kationenaustauscher in Analogie zu den Ergebnissen von GROSSI et al. (1990) als geeignet, die OH-TRP-Isomere zu isolieren. Bei der Anwendung des Verfahrens auf dotierte Probenlösungen zeigte sich, dass die Kapazität des verwendeten Ionenaustauschers nur für geringe Serummengen ausreichend war. Da diese Mengen selbst für eine empfindliche Bestimmung der OH-TRP-Isomere mittels HPLC-ECD unzureichend waren, mussten kationische Störsubstanzen zuvor aus dem Garnelenserum entfernt werden. Bei diesen handelt es sich vor allem um einfache polare Aminosäuren sowie Metallkationen. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass der verwendete PRS-Kationenaustauscher eine geringe Selektivität für OH-TRP-Isomere aufweist, so dass große Mengen weiterer kationischer

Verbindungen in direkte Konkurrenz um Bindungsstellen am Ionenaustauscher treten. Bei komplexen Probenmaterialien hat sich für die Analyse kationischer Verbindungen eine weitere Abtrennung organischer Substanzen und anorganischer Ionen an einer zweiten Festphase (z.B. Aluminiumoxid, Aktivkohle und C18-Material) vor der selektiven Anreicherung mittels Kationenaustauscher als geeignet erwiesen (DEFENDENTI et al., 1998; COSBEY et al., 1995; RUSHING et al., 1995). Der Probenextrakt wurde nach der Proteinfällung mittels C18-SPE gereinigt, wodurch der Großteil an einfachen Aminosäuren sowie anorganische Kationen abgetrennt werden konnten. Die maximale Probenaufgabemenge auf den PRS-Kationenaustauscher konnte durch diese Maßnahme um den Faktor 5 gesteigert werden. Die Elutionskraft des von GROSSI et al. (1990) verwendeten Natriumphosphat-Puffers erwies sich für die OH-TRP-Isomere als nicht ausreichend. Daher wurde ein Ammoniumformiat-Puffer eingesetzt, der zum einen aufgrund der höheren Selektivität des Ammoniumions eine größere Elutionskraft besitzt und zum anderen nicht zu Störungen der Chromatographie führt. Zur Optimierung der Elution vom PRS-Kationenaustauscher wurde der Einfluss des pH-Wertes, der Ionenstärke sowie des Methanolanteiles mittels statistischer Versuchsplanung überprüft. Die Elution vom Kationenaustauscher ist im Wesentlichen von der Ionenstärke und dem pH-Wert abhängig. Es kann aber insbesondere bei aromatischen Aminosäuren zu nichtionischen Adsorptionen am Austauschermaterial kommen. Diese Wechselwirkungen können durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln (Modifier) zum Elutionspuffer unterdrückt werden und damit zu einer verbesserten Elution beitragen (LEE und HONG, 1995). Die Auswertung des Versuchsplanes zeigte nur einen signifikanten Einfluss der Ionenstärke auf die Elution. Aufgrund der hohen Elutionskraft der Ammoniumionen führte eine Zugabe von Methanol zum Puffer zu keiner weiteren Erhöhung der Wiederfindungsraten. Die Bestimmung der Wiederfindungsraten für die OH-TRP-Isomere an dotierten Proben ergab für 5-OH-TRP einen Mittelwert von 139%. Dieser Wert ist auf die physiologischen Gehalte an 5-OH-TRP zurückzuführen. Für die nichtphysiologischen Isomere ergaben sich Wiederfindungsraten von ca. 75% für 6- und 7-OH-TRP während für 4-OH-TRP nur eine WFR von ca. 57% erreicht wurde. 4-OH-TRP ist sehr empfindlich gegenüber Oxidation, so dass es bei der Aufarbeitung zu Verlusten kommt. Während für die anderen drei OH-TRP-Isomere nach der C18-SPE eine 100%ige Wiederfindung erzielt werden konnte, lag diese für 4-OH-TRP nur bei 80% (siehe

Abschnitt 5.2.6). Bei der PRS-SPE kommt es zu weiteren Verlusten (siehe Abschnitt 5.2.8). In den Chromatogrammen zeigte sich, dass durch die zweistufige SPE ein Großteil der Störsubstanzen abgetrennt werden konnte.

### 5.4.3 Bestimmung von OH-TRP-Isomeren

Die Untersuchungen von VAN WICKERN (1997) und die eigenen Untersuchungen über den TRP-Verlust ließen erwarten, dass unter Berücksichtigung von Matrixeffekten im Presssaft von bestrahlten Nordseegarnelen OH-TRP-Isomere in Konzentrationen von ca. 10  $\mu\text{g/L}$  entstehen (s. Abschnitt 5.1.3). Die entwickelte Methode ist geeignet, entsprechende 5-, 6- und 7-OH-TRP-Konzentrationen in bestrahlten Proben sicher nachzuweisen. Aufgrund der höheren Nachweisgrenze ist ein Nachweis von 4-OH-TRP in Konzentrationen von 10  $\mu\text{g/L}$  nicht möglich. Bei der Anwendung der entwickelten Methode auf bestrahlte Nordseegarnelen konnte lediglich 5-OH-TRP in den Proben nachgewiesen werden. Der höchste Gehalt wurde bei einer Bestrahlungsdosis von 3 kGy ermittelt. Bei 5 kGy kam es wieder zu einem Abfall der 5-OH-TRP-Konzentration. Bei der Analyse einer bestrahlten TRP-Lösung konnten lediglich 5-, 6- und 7-OH-TRP mittels HPLC-ECD und HPLC-MS nachgewiesen werden (4-OH-TRP  $<5,9$  mg/L bzw.  $<0,004$  Mol%). In einer bestrahlten Aminosäuremodell-Lösung, deren Konzentration und Zusammensetzung in etwa der des Garnelenserums entsprach, war nur noch 5-OH-TRP nachweisbar. Die ermittelten Gehalte an OH-TRP-Isomeren in der bestrahlten TRP-Lösung (135 mg/L bzw. 0,66 mMol/L) lagen prozentual (bezogen auf den ursprünglichen TRP-Gehalt) um einen Faktor 8 (5-OH-TRP) bzw. Faktor 20 (6-, 7-OH-TRP) niedriger als die von VAN WICKERN (1997) bestimmten Werte. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Bildungsrate der OH-TRP-Isomere mit sinkender TRP-Konzentration abnehmen. Insbesondere für die nicht-physiologischen OH-TRP-Isomere zeigte sich dieser Trend bereits bei den von VAN WICKERN (1997) untersuchten TRP-Lösungen (200 und 400 mg/L). Bei niedrigen TRP-Konzentrationen kommt es verstärkt zu diffusionskontrollierten Reaktionen der Hydroxylradikale untereinander bzw. mit bereits gebildeten Radiolyseprodukten, so dass die Bildungsrate für OH-TRP-Isomere im Vergleich zu höher konzentrierten Lösungen sinkt. Wie durch den Versuch mit der Aminosäuremodell-Lösung gezeigt werden konnte, kommt es durch den großen Überschuss weiterer freier Aminosäuren in den Nordseegarnelen zu einer weiteren Senkung der Bildungsrate der OH-TRP-

Isomere, so dass lediglich das thermodynamisch stabilste Isomer (5-OH-TRP) im nachweisbaren Bereich liegt. FLETCHER UND OKADA (1961) bestrahlten wässrige Lösungen von Tyrosin mit unterschiedlichen Gehalten an Glycin. Sie stellten hierbei fest, dass die G-Werte für die Bildung von 3,4-DOPA, dem Hauptradiolyseprodukt von Tyrosin, bei einem 10fachen Glycinüberschuss deutlich absanken. Im Presssaft der Nordseegarnelen stellt TRP nur eine Minoraminosäure dar. Weitere Aminosäuren, insbesondere Glycin, Arginin und Glutamin, kommen in einem 300fachen Überschuss vor.

#### **5.4.4 Eignung von OH-TRP-Isomeren als Bestrahlungsmarker**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die nicht-physiologischen OH-TRP-Isomere aus dem frei vorkommenden TRP als Bestrahlungsmarker für Nordseegarnelen nicht geeignet sind. Andere im Überschuss enthaltene Inhaltsstoffe, wie z.B. freie Aminosäuren, wirken als Radikalfänger und unterdrücken so die Bildung von 4-, 6- und 7-OH-TRP. Auch 5-OH-TRP ist als Bestrahlungsmarker nicht geeignet. Die Substanz kommt ubiquitär in Organismen vor. Außerdem besteht kein linearer Zusammenhang zwischen dem 5-OH-TRP-Gehalt und der Bestrahlungsdosis, so dass eine sichere Unterscheidung bestrahlter und unbestrahlter Proben schwierig ist.

## 6 Screening auf polare Radiolyseprodukte in $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln

Die  $\gamma$ -Bestrahlung von eiweißreichen Lebensmitteln führt zu ungerichteten Radikalreaktionen an Proteinen und Aminosäuren. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass bei der Bestrahlung wässriger Aminosäure- und Proteinlösungen polare Radiolyseprodukte, insbesondere Hydroxylierungsprodukte, entstehen (STADTMAN, 1993; GETOFF, 1992; LIEBSTER und KOPOLDOVA, 1964). Polymerisations- und Desaminierungsreaktionen wurden ebenfalls beobachtet. Allerdings waren die Konzentrationen dieser Reaktionsprodukte selbst in Modelllösungen vernachlässigbar gering (GETOFF, 1992; JOSIMOVIC et al., 1983; GARRISON, 1968; LIEBSTER und KOPOLDOVA, 1964). Die Komplexität der bereits in Modell-Systemen beobachteten Reaktionen macht eine Übertragbarkeit auf komplexe Lebensmittelmatrices schwierig. Die meisten Autoren beschränkten sich daher bei Lebensmitteln auf die Identifizierung der mutmaßlich in höheren Konzentrationen gebildeten Hydroxylierungsprodukte der empfindlichen aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan (HEIN et al., 2000; HUNKOVA et al., 2000; KRACH et al. 1999, 1997; VAN WICKERN, 1997). Um eine geeignete Markersubstanz für  $\gamma$ -bestrahlte eiweißreiche Lebensmittel zu finden, ist diese Vorgehensweise nur bedingt geeignet. Selbst wenn die Substanzen in bestrahlten Lebensmitteln identifiziert werden können, so muss sichergestellt werden, dass sie in ausreichend hohen Konzentrationen vorhanden sind, so dass eine Diskriminierung zwischen unbestrahlten und bestrahlten Lebensmitteln möglich ist. Weiterhin sollte die Bildung der Markersubstanz unabhängig von den Bestrahlungsbedingungen sein. Die Überprüfung von Einzelsubstanzen auf ihre Eignung als Markersubstanzen ist mit einem hohen Analysenaufwand verbunden. Für diese Art von Problemstellung führt ein „Non-Target-Screening“ auf polare Radiolyseprodukte in  $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln schneller zu verwertbaren Resultaten. Anhand von chromatographischen Fingerprint-Analysen werden durch den Vergleich verschieden behandelter Proben potenzielle Bestrahlungsmarker in den Chromatogrammen erkannt, die die festgelegten Kriterien erfüllen. Erst dann erfolgt eine Identifizierung dieser Substanzen.

## 6.1 Methoden

Für das Screening auf neue potenzielle Bestrahlungsmarker in proteinreichen Lebensmitteln bietet sich als Methode der Wahl die RP-HPLC an, da es sich bei den zu erwartenden Aminosäure-Radiolyseprodukten vorwiegend um polare und schwerflüchtige Substanzen handelt. Die RP-HPLC wird schon seit vielen Jahren zur Bestimmung von TRP-Radiolyseprodukten (VAN WICKERN, 1997; KOPOLDOVA et al., 1985) und o-TYR (HEIN et al., 2000; HUNKOVA et al., 2000; CHUAQUI-OFFERMANN und MCDOUGALL, 1991) eingesetzt.

Da aromatische Aminosäuren besonders empfindlich gegenüber  $\gamma$ -Strahlen reagieren, sind UV-aktive oder fluoreszierende Abbauprodukte zu erwarten. Für eine einfache und selektive Detektion eignen sich daher Photo-Dioden-Array- (PDA-) und FL-Detektoren. Aromatische Substrate reagieren vorwiegend mit den bei der  $\gamma$ -Bestrahlung entstehenden Hydroxylradikalen. Hierdurch entstehen Hydroxylierungsprodukte, die aufgrund ihres geringen Redoxpotentials sehr empfindlich und selektiv mit einem EC-Detektor nachweisbar sind. Zur Identifizierung der neuen Bestrahlungsmarker kann weiterhin ein massenselektiver Detektor (MSD) mit Elektrospray-Ionisation (AP-ESI) oder chemischer Ionisation (APCI) eingesetzt werden. Die AP-ESI ist hauptsächlich für höher molekulare, polare Stoffe mit leicht ionisierbaren Gruppen geeignet. Bei der chemischen Ionisation an einer  $^{63}\text{Ni}$ -Corona-Nadel handelt es sich um eine Ionisierungsmethode, die vorwiegend für unpolare, nichtionische Substanzen verwendet wird.

### 6.1.1 Probenaufarbeitung

Für das Screening wurden von den verschiedenen eiweißreichen Lebensmitteln (Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps, Tiefsee Shrimps, Eiklar, Hühnerfleisch) jeweils eine bei Raumtemperatur (RT) mit 10 kGy bestrahlte Probe, eine im gefrorenen Zustand mit 10 kGy bestrahlte Probe und eine unbestrahlte Probe aufgearbeitet. Die Proben wurden zunächst ohne Anreicherung analysiert. Zur Erfassung von Minor-Radiolyseprodukten war es nötig, eine Methode zu entwickeln, mit der eine ausreichende Anreicherung der Analyten bei gleichzeitiger Abtrennung weiterer Matrixbestandteile erreicht werden konnte.

### **6.1.1.1 Isolierung ohne Anreicherung**

Zur Isolierung der Radiolyseprodukte aus den Garnelen wurden die Proben zunächst homogenisiert und unlösliche Matrixbestandteile durch Abpressen entfernt. Der so gewonnene Presssaft wurde nach Proteinfällung mit Perchlorsäure und anschließender Zentrifugation direkt zur HPLC-Analyse eingesetzt. Das Hühnerfleisch wurde mit Wasser unter Zusatz von Perchlorsäure homogenisiert und der nach Zentrifugation erhaltene Extrakt für die HPLC-Analyse verwendet. Das Eiklar wurde ebenfalls mit Perchlorsäure deproteiniert und nach Zentrifugation wurde der wässrige Überstand direkt in die HPLC injiziert (genaue Durchführung s. Anhang 10.8.1.1 und 10.8.3.1).

### **6.1.1.2 Isolierung mit Anreicherung**

Eine Anreicherung der Minor-Radiolyseprodukte um den Faktor 50 konnte durch Flüssig-Flüssig-Extraktion der sauren deproteinierten Probenextrakte mit Diethylether erreicht werden. Die Methodenentwicklung ist im Abschnitt 6.2.1.2 beschrieben (genaue Durchführung für das Screening s. Anhang 10.8.4.1).

## **6.1.2 HPLC-Bedingungen**

Für die HPLC-Trennung wurde eine Nucleosil C18-Säule verwendet, die bereits erfolgreich zur Trennung von OH-TRP-Isomeren und anderen TRP-Abbauprodukten eingesetzt wurde (KLEEBERG et al., 1998; SIMAT, 1997; VAN WICKERN, 1997). Zusätzlich wurde eine C18-Aqua-Säule der Fa. Phenomenex (Aschaffenburg) verwendet, die durch ein spezielles Endcapping mit einem hydrophilen Reagenz besonders für die Retention polarer Substanzen geeignet ist.

Die Elution erfolgte isokratisch mit verschiedenen Mischungen aus 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in bidest. Wasser und 5 bzw. 15% MeCN als Modifier. Weiterhin wurde ein Gradient aus 0,1% TFA und MeCN verwendet, der zur Trennung von Kontaminanten in biotechnologisch hergestelltem TRP entwickelt wurde (KLEEBERG et al., 1998). Der MeCN-Anteil blieb zunächst 5 min konstant bei 5% und wurde dann innerhalb von 35 min auf 35% gesteigert. Es wurde weitere 15 min mit 35% MeCN eluiert. Die TFA dient dabei zum einen als Säure zur Protonierung von Carbonylverbindungen und zum anderen als Ionenpaarreagenz.

**Tabelle 6.1** Für das Screening verwendete chromatographische Systeme

Proben- aufarbeitung	Säule	Elution	Detektion
Isolierung ohne Anreicherung	Nucleosil 120-3 RP18	Isokratisch (0,1% TFA/MeCN 95/5 (v/v))	ECD 1,15V PDA 220 nm FL 270/315 nm
		Isokratisch (0,1% TFA/MeCN 85/15 (v/v))	ECD 1,15 V
		Gradient (siehe Text)	PDA 220 nm FL 270/315 nm
Isolierung mit Anreicherung	Nucleosil 120-3 RP18	Isokratisch (0,1% TFA/MeCN 95/5 (v/v))	ECD 1,15V PDA 220 nm FL 270/315 nm
		Isokratisch (Essigsäure pH 3/MeCN 95/5 (v/v))	MS (AP-ESI positiv, Scan 70-250 m/z) MS (APCI negativ, Scan 70-250 m/z)
	Phenomenex Aqua RP18	Isokratisch (0,1% TFA/MeCN 85/15 (v/v))	ECD 1,15V PDA 220 nm FL 270/315 nm
		Isokratisch (Essigsäure pH 3/MeCN 85/15 (v/v))	MS (AP-ESI positiv, Scan 70-250 m/z) MS (APCI negativ, Scan 70-250 m/z)

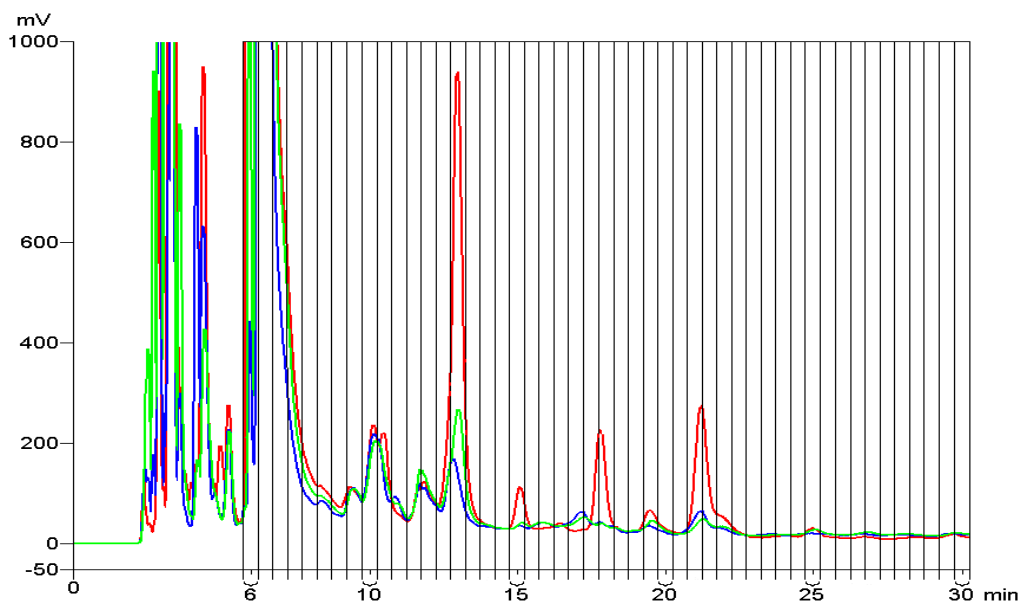
Die Detektion erfolgte mit einem FL- und einem PDA-Detektor, die in Reihe geschaltet waren. Für die UV-Detektion wurde die universelle Wellenlänge von 220 nm eingestellt, bei der die meisten Substanzen ein Absorptionsmaximum aufweisen. Die Wellenlängen für die FL-Detektion wurden durch Ermittlung der Mittelwerte aus den Wellenlängen bekannter Aminosäure-Radiolyseprodukte festgelegt (Ex/Em 270/315 nm). Weiterhin stand ein amperometrischer EC-Detektor mit einer Glassy Carbon-Arbeits Elektrode und einer Ag/AgCl-Referenzelektrode zur Verfügung. Um möglichst viele Radiolyseprodukte beim Screening zu erfassen, wurde bei einem Potenzial von +1,15 V gearbeitet. Beim Einsatz eines EC-Detektors kann kein Gradientensystem verwendet werden, da schon kleinste Veränderungen des Eluenten zu extremen Schwankungen der Basislinie aufgrund der Veränderung des Grundstroms in der Zelle führen. Für die Identifizierung von potenziellen Bestrahlungsmarkern wurde zusätzlich die HPLC-MS eingesetzt. Die Elution erfolgte



hier mit Essigsäure anstelle von TFA, da durch die Ionenpaarfunktion der TFA eine Ionisierung unterdrückt wird und die Radiolyseprodukte somit wesentlich unempfindlicher nachweisbar sind. Die Ionisierung erfolgte zum einen mittels AP-ESI und zum anderen mittels APCI sowohl im positiven als auch im negativen Modus, wodurch möglichst viele Substanzen erfasst werden sollten. Die verwendeten chromatographischen Systeme sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst (genaue Beschreibung der HPLC-Systeme und der chromatographischen Bedingungen (s. Anhang 10.1.2 und 10.2.5).

### 6.1.3 Auswertung

Das Hauptproblem bei der Auswertung dieses Screenings bestand in der korrekten Zuordnung der Peaks in den Chromatogrammen der bestrahlten und unbestrahlten Proben. Dazu wurden die Chromatogramme, die unter den gleichen chromatographischen Bedingungen aufgenommen wurden, übereinandergelagert und in 49 Zeitfenster à 0,5 min unterteilt (s. Abbildung 6.1). Durch Vergleich der Peakmuster und der Response bei der Verwendung unterschiedlicher Detektoren konnte eine Zuordnung der Peaks in den Chromatogrammen der verschiedenen Lebensmittel in Abhängigkeit von der Bestrahlungstemperatur durchgeführt werden. Eine weitere Zuordnung erfolgte durch Vergleich der UV-Spektren.



**Abbildung 6.1** Modell-Chromatogramm für die Screening-Auswertung: Einteilung der übereinandergelagerten Chromatogramme in 49 Zeitfenster (rot: 10 kGy RT, blau: 10 kGy -18 °C, grün: unbestrahlt)

In jedem Zeitfenster wurde jeweils nur der größte Peak ausgewertet. Hierdurch war es möglich, Unterschiede zwischen den bei verschiedenen Temperaturen bestrahlten Proben und der unbestrahlten Vergleichsprobe zu ermitteln. Diese Vorgehensweise war nötig, da aufgrund der Komplexität der erhaltenen Chromatogramme keine geeigneten internen Standards zur Normalisierung der Retentionszeiten gefunden werden konnten.

Um als Bestrahlungsmarker verwendet werden zu können, muss eine Substanz eine Reihe von Anforderungen erfüllen:

- In den unbestrahlten Proben darf kein Signal vorhanden sein.
- Falls Blindsignale vorhanden sind, müssen die Signale in den bestrahlten Proben im Vergleich zu den Blindproben deutlich größer sein (Faktor  $\geq 3$ ).
- Die Größe der Signale in den bestrahlten Proben sollte weitgehend unabhängig von der Bestrahlungstemperatur sein.
- Der Bestrahlungsmarker sollte in möglichst vielen der untersuchten Lebensmittel nachweisbar sein.

In den folgenden Ergebnistabellen werden jeweils die Signal/Rausch-Verhältnisse dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Gehalte an Radiolyseprodukten in den verschiedenen Lebensmitteln wurden unterschiedliche Verdünnungen und Mengen des Probenextraktes injiziert. Für einen direkten Vergleich der Signal/Rausch-Verhältnisse bei den verschiedenen Lebensmitteln mussten diese jeweils auf ein Injektionsvolumen von 20  $\mu\text{L}$  unter Berücksichtigung der Verdünnung umgerechnet werden.

Um eine Aussage über Bildung eines strahleninduzierten Peaks bei verschiedenen Temperaturen machen zu können, wurde der Quotient aus dem Signal-Rausch-Verhältnis der bestrahlten zur unbestrahlten Probe gebildet. Damit ein strahleninduzierter Peak deutlich von der unbestrahlten Probe unterscheidbar ist, wurde festgelegt, dass der berechnete Faktor für den Vergleich bestrahlt/unbestrahlt größer als 3 sein sollte. Ein Faktor  $\geq 3$  gibt somit an, dass die betrachtete Substanz in der bestrahlten Probe in so großen Mengen entsteht, dass ein signifikanter Unterschied zur unbestrahlten Probe angenommen werden kann.

## 6.2 Screening auf polare Radiolyseprodukte in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen

In der Tabelle 6.2 ist die Auswertung für das Screening auf potenzielle Bestrahlungsmarker in Nordseegarnelen für die drei verschiedenen chromatographischen Bedingungen und Detektoren nach dem in Abschnitt 6.1 beschriebenen Schema dargestellt. Zur Vereinfachung sind für die unbestrahlte Probe und die gefroren bzw. bei Raumtemperatur bestrahlten Proben die Signal-Rausch-Verhältnisse in schwarz dargestellt. Um eine Aussage über die Bildung eines strahleninduzierten Peaks in Nordseegarnelen bei den verschiedenen Bestrahlungstemperaturen machen zu können, wurde der Quotient aus dem Signal-Rausch-Verhältnis der bestrahlten zur unbestrahlten Probe gebildet (blau dargestellt). Die Werte sind in der Tabelle zum Teil mit >- bzw. <-Zeichen angegeben, die sich aus der Berechnung der Signal-Rausch-Verhältnisse bzw. Faktoren unter Berücksichtigung verschiedener Probenverdünnungen ergeben. Diese ändern jedoch nichts an der Vergleichbarkeit der jeweiligen absoluten Zahlenwerte.

Damit ein strahleninduzierter Peak deutlich von der unbestrahlten Probe unterscheidbar ist, wurde festgelegt, dass der berechnete Faktor für den Vergleich bestrahlt/unbestrahlt größer als 3 sein sollte. In der Tabelle sind die Faktoren blau dargestellt, die entweder für die gefroren oder die bei Raumtemperatur bestrahlte Probe dieses Kriterium erfüllen. Die Faktoren, die für beide Bestrahlungstemperaturen dieses Kriterium erfüllen, sind rot dargestellt.

Insgesamt waren 11 Peaks in den Chromatogrammen zu erkennen, bei denen das Verhältnis von mindestens einer der beiden bestrahlten Proben zur unbestrahlten Probe  $\geq 3$  ist. Bei den meisten dieser Substanzen sind Blindwerte in der unbestrahlten Probe vorhanden. Lediglich bei den Substanzen mit den Nummern 1, 9 und 11 sind keine Blindwerte nachweisbar. Hier sind jedoch auch keine Unterschiede zu der im gefrorenen Zustand bestrahlten Probe zu erkennen. Grundsätzlich kann festgestellt werden, dass die strahleninduzierten Veränderungen in der bei Raumtemperatur bestrahlten Probe wesentlich größer sind.

Tabelle 6.2 Unbekannte Substanzen in  $\gamma$ -bestrahlten Nordseeegarnelen

Peak Nr.	Chromatographische Bedingungen	Retentionszeit	ECD 1,15 V				FL 270/315 nm				UV 220 nm						
			unbestrahlt <sup>1</sup>	10 KGy -18 °C <sup>1</sup>	10 KGy -18 °C <sup>2</sup>	10 KGy RT <sup>1</sup>	10 KGy RT <sup>2</sup>	unbestrahlt <sup>1</sup>	10 KGy -18 °C <sup>1</sup>	10 KGy -18 °C <sup>2</sup>	10 KGy RT <sup>1</sup>	10 KGy RT <sup>2</sup>	unbestrahlt <sup>1</sup>	10 KGy -18 °C <sup>1</sup>	10 KGy -18 °C <sup>2</sup>	10 KGy RT <sup>1</sup>	10 KGy RT <sup>2</sup>
1	0,1% TFA/MeCN 95/5	10,5	<10	<10	n.n.	450	>45	1,0	1,0	n.n.	190	190	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2	0,1% TFA/MeCN 95/5	13	633	313	0,5	>2051	>3,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
3	0,1% TFA/MeCN 95/5	15	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	15	9,1	0,6	93	6,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
4	0,1% TFA/MeCN 95/5	18	194	209	1,1	>2314	>12	17	22	1,3	234	14	2,6	4,9	1,9	39	15
5	0,1% TFA/MeCN Gradient <sup>3</sup>	16	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	46	53	1,2	411	9,0	12	6,5	0,5	70	5,8
5	0,1% TFA/MeCN 95/5	21	121	231	1,9	1630	13	35	54	1,5	290	8,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	0,1% TFA/MeCN 85/15	10	248	441	1,8	2453	9,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	0,1% TFA/MeCN Gradient <sup>3</sup>	19	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	70	96	1,4	284	4,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
6	0,1% TFA/MeCN 95/5	25,5	147	468	3,2	>2267	>15	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,0	5,6	5,6	31	31
	0,1% TFA/MeCN Gradient <sup>3</sup>	19*	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	24	30	1,3	76	3,2
7	0,1% TFA/MeCN 85/15	11,5	44	83	1,9	286	6,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
8	0,1% TFA/MeCN 85/15	13,5	66	<10	n.n.	378	5,7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
9	0,1% TFA/MeCN 85/15	20	<10	<10	n.n.	58	>5,8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
10	0,1% TFA/MeCN 85/15	22	98	198	2,0	961	9,8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
11	0,1% TFA/MeCN 85/15	24,5	<10	<10	n.n.	135	>14	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

1 Signal/Rausch-Verhältnis (S/N)

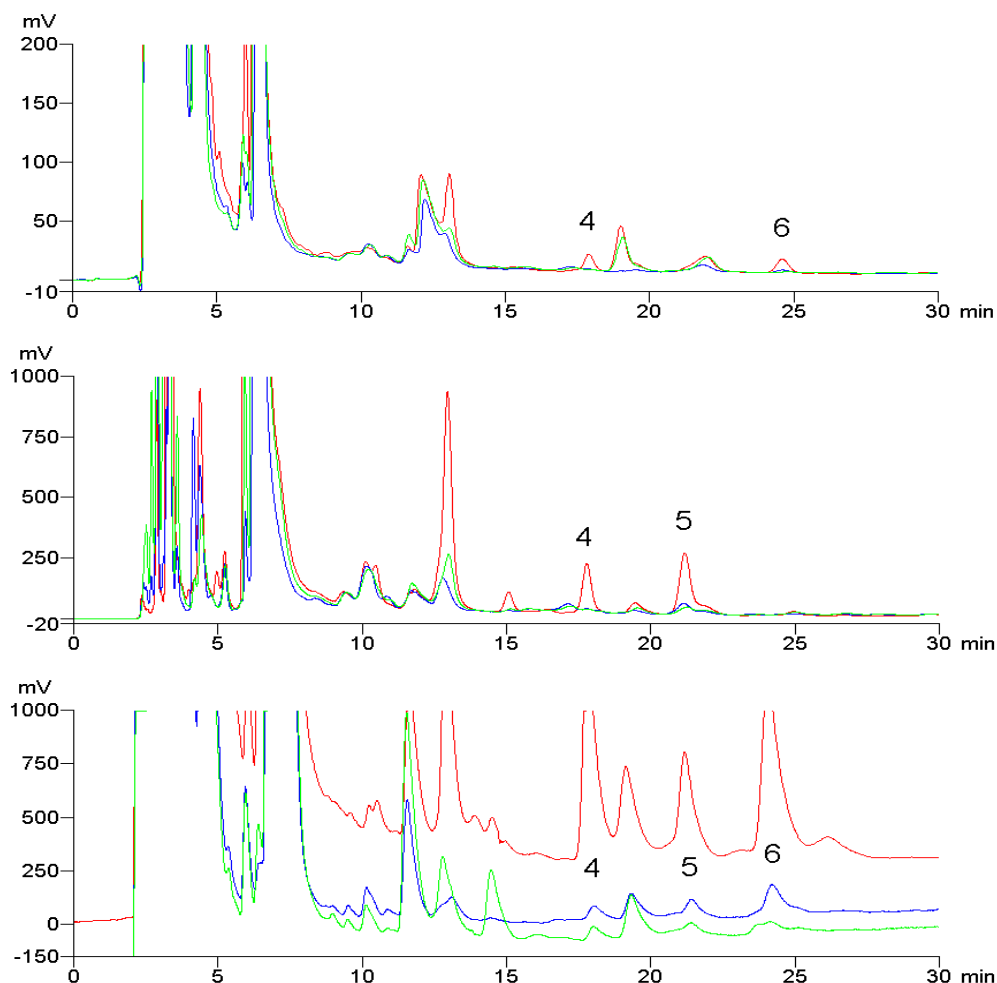
2 Faktor (S/N bestrahlte Probe / S/N unbestrahlte Probe)

3 Gradient s. Abschnitt 6.1.2

n.n. nicht nachweisbar

n.a. nicht analysiert

Besonders interessant sind die Peaks 4 - 6 (grau markiert), da sie unter den verschiedenen chromatographischen Bedingungen und mit mehreren Detektoren nachweisbar sind. Peak 4 lässt sich mit allen drei Detektoren nachweisen, Peak 5 mit FLD und ECD und Peak 6 mit UVD und ECD. Abbildung 6.2 zeigt die übereinandergelegten Chromatogramme der bestrahlten und unbestrahlten Nordseegarnelen nach einer isokratischen Trennung mit 0,1% TFA/MeCN 95/5 (v/v). Nur Peak 6 ist in beiden bestrahlten Proben signifikant größer als in der unbestrahlten Probe. Die unterschiedlichen Faktoren der Peaks 4 und 5 bei den verschiedenen Detektoren deuteten auf Koelutionen hin. Diese Annahme konnte durch Vorversuche (nicht dargestellt) zum Clean-up mittels SPE bewiesen werden. Nach einem optimierten Clean-up könnten demnach auch für die Peaks 4 und 5 zwischen der im gefrorenen Zustand bestrahlten Probe und der unbestrahlten Probe signifikante Unterschiede zu erkennen sein.



**Abbildung 6.2** Unbekannte Radiolyseprodukte in  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen (Peak 4 - 6) (Nucleosil, 0,1% TFA/MeCN 95/5 (v/v), oben: UV 220 nm, mitte: FL 270/315 nm, unten: ECD 1, 15 V); rot: 10 kGy RT, blau: 10 kGy -18 °C, grün: unbestrahlt

### **6.2.1 Isolierung und Anreicherung von polaren Radiolyseprodukten in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen**

Um die drei unbekannt Substanzen 4 - 6 in den bestrahlten Nordseegarnelen zu identifizieren, war eine Isolierung und Anreicherung notwendig. Dazu wurden verschiedene Verfahren wie die Festphasenextraktion, die Flüssig-Flüssig-Extraktion und die Vakuumdestillation angewendet.

#### **6.2.1.1 Isolierung und Anreicherung mittels Festphasenextraktion**

Die drei unbekannt Radiolyseprodukte in den bestrahlten Nordseegarnelen lassen sich sehr gut an einer C18-HPLC-Säule trennen. Folglich sollte auch eine selektive Isolierung mittels C18-Festphasenextraktion aus der Probenmatrix möglich sein. Dazu wurde die C18 ec-Phase der Fa. Varian verwendet, mit der bereits bei der Isolierung von OH-TRP-Isomeren aus Nordseegarnelen gute Erfolge erzielt wurden (s. Abschnitt 5.2.5). Zunächst wurden wässrige Extrakte mit verschiedenen Probeneinwaagen (2 - 4 g/12 mL) hergestellt und mittels Perchlorsäure deproteiniert. Nach Zentrifugation wurden 1 - 3 mL des Zentrifugats auf die SPE-Säulen gegeben. Anschließend wurde mit verschiedenen Wasser/MeOH-Gemischen (10 - 15% MeOH) gewaschen und die Elution erfolgte mit einem Wasser/MeOH-Gemisch 70/30 (v/v). Bei einem weiteren Versuch wurde der wässrige Extrakt vor der Probenaufgabe mit Ammoniak-Lösung neutralisiert. Eine genaue Übersicht über die verschiedenen Versuche und die Ergebnisse ist in Anhang 10.8.1.2 dargestellt.

Bei keinem der durchgeführten Versuche war ein Durchbruch der Analyten bei der Probenaufgabe festzustellen. Beim Waschschrift war jedoch vor allem für die Substanz 4 ein erheblicher Durchbruch zu erkennen, wenn mehr als 1 mL des wässrigen Extraktes auf die SPE-Säule aufgegeben wurde. Weder eine Verringerung des MeOH-Anteils beim Waschen noch eine Neutralisation der Aufgabelösung führten dazu, dass mehr Probenextrakt auf die Säule aufgegeben werden konnte. Mit weniger als 10% MeOH konnte nicht gewaschen werden, da so keine vollständige Abtrennung der Störsubstanzen erreicht wurde. Damit ist die C18-SPE zwar zur Isolierung der unbekannt Substanzen 4 - 6 aus bestrahlten Nordseegarnelen anwendbar, eine Anreicherung ist jedoch nicht möglich.

### **6.2.1.2 Isolierung und Anreicherung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion**

Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung und Anreicherung der Radiolyseprodukte stellt die Flüssig-Flüssig-Extraktion dar. Da es sich bei den unbekanntem Radiolyseprodukten um polare Substanzen handelt, wurden Diethylether, 1-Butanol und Dichlormethan als Extraktionsmittel getestet. Es wurden jeweils Aliquote eines wässrigen Extraktes einer mit 10 kGy bestrahlten Probe mit den verschiedenen Lösungsmitteln ausgeschüttelt und anschließend die Rückstände mittels HPLC untersucht. Als Vergleich wurde ein wässriger Extrakt ohne Flüssig-Flüssig-Extraktion analysiert (Chromatogramme s. Anhang 10.8.1.3).

Im Rückstand der mit Dichlormethan extrahierten Lösung waren noch Reste der Analyten 4 - 6 nachweisbar, während sowohl mit Diethylether als auch mit 1-Butanol eine vollständige Extraktion der Substanzen gelang. Mit Diethylether werden jedoch weniger Störsubstanzen extrahiert als mit 1-Butanol. Zudem lässt sich Diethylether aufgrund seines niedrigen Siedepunktes leichter entfernen und ist damit am besten zur Isolierung und Anreicherung der unbekanntem Substanzen 4 - 6 geeignet. Durch Herstellung eines wässrigen Probenextraktes aus 50 g Nordseegarnelen, Extraktion mit Diethylether, vorsichtiges Entfernen des Diethylethers im Stickstoffstrom und anschließende Aufnahme des Rückstandes in 1 mL Wasser konnte so eine Anreicherung der unbekanntem Substanzen um den Faktor 50 erreicht werden (s. Abschnitt 6.2.2.2).

### **6.2.1.3 Isolierung und Anreicherung von flüchtigen Radiolyseprodukten mittels Vakuumdestillation**

Mit Hilfe der Vakuumdestillation ist es möglich, leichtflüchtige Substanzen selektiv aus einer Probenmatrix zu isolieren und anzureichern. Die bisherigen Versuche deuteten bereits darauf hin, dass es sich bei der Substanz 5 möglicherweise um eine leichtflüchtige Verbindung handeln könnte, da die Gehalte deutlich abnahmen, wenn nach Flüssig-Flüssig-Extraktion das Lösungsmittel bis zur Trockne abgedampft wurde.

Die um den Faktor 8 durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether angereicherte wässrige Probenlösung wurde daher einer Vakuumdestillation unterzogen und das Destillat anschließend mittels HPLC untersucht (genaue Probenaufarbeitung und Chromatogramme der angereicherten Probenlösung und des Destillats s. Anhang

10.8.1.4). Während im Chromatogramm nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether die drei Peaks 4 - 6 zu erkennen sind, ist im Chromatogramm des Destillats nur noch der Peak 5 zu sehen. Durch die Vakuumdestillation war es somit möglich, die Substanz 5 selektiv zu isolieren und anzureichern.

## 6.2.2 Identifizierung von polaren Radiolyseprodukten in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen

### 6.2.2.1 Chromatographisches Verhalten

Zur Identifizierung der unbekannt Substanzen war es wichtig zu wissen, ob es sich um ionische oder nichtionische Verbindungen handelt. Daher wurde das chromatographische Verhalten dieser Substanzen bei Elution mit verschiedenen pH-Werten untersucht. Hierzu wurden bestrahlte Nordseegarnelen (10 kGy, RT) aufgearbeitet (siehe Anhang 10.8.1.4). Die HPLC-Trennung erfolgte an einer C18 Aqua-Säule der Fa. Phenomenex bei den pH-Werten 3, 5 und 8. Als Modifizier diente MeCN (25%). Die Retentionszeiten der unbekannt Substanzen bei den verschiedenen pH-Werten sind in Tabelle 6.3 dargestellt.

**Tabelle 6.3** Chromatographisches Verhalten der unbekannt Substanzen 4 - 6 bei verschiedenen pH-Werten (Phenomenex Aqua, 25% MeCN)

Eluent	Retentionszeit (min)		
	Peak 4	Peak 5	Peak 6
Bidest. Wasser, Essigsäure pH 3	5,5	12	6,5
0,1% TFA in bidest. Wasser pH 3	5,6	12	6,6
Ammoniumformiat-Puffer 5 mMol, pH 5	3,8	12	4,1
Ammoniumacetat-Puffer 5 mMol, pH 8	2,5	12	2,7

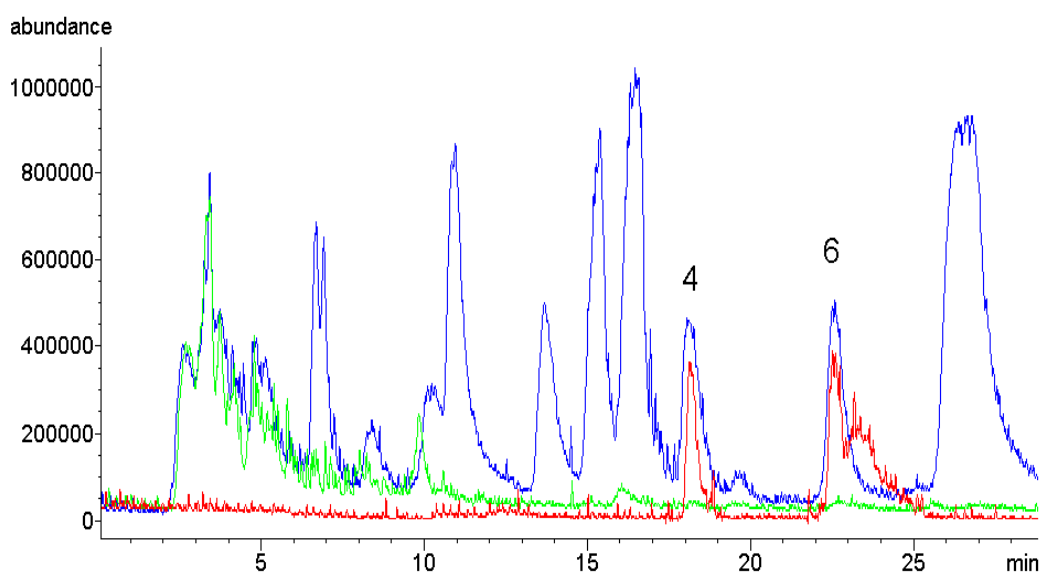
Mit höherem pH-Wert zeigt sich eine Verringerung der Retentionszeit der Substanzen 4 und 6. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei diesen Substanzen um schwache Säuren handelt, die bei pH 3 undissoziiert vorliegen und damit auf der RP-Säule retardiert werden. Bei höheren pH-Werten liegen die Substanzen als Ionen vor und werden kaum auf der Säule zurückgehalten. Die Retentionszeit von Substanz 5 wird dagegen nicht durch den pH-Wert des Eluenten beeinflusst. Es sollte sich daher bei dieser Substanz um eine nichtionische Verbindung handeln.



### 6.2.2.2 Identifizierung mittels HPLC-MS

Die für das Screening verwendeten kommerziell erhältlichen Nordseegarnelen enthalten Benzoesäure zur Konservierung (siehe Abschnitt 4.1.4). Es ist daher möglich, dass es sich bei den unbekannt Substanzen 4 - 6 um Radiolyseprodukte der Benzoesäure (BA) handelt. Aus diesem Grund wurde die HPLC-MS-Methode für die Hauptradiolyseprodukte der Benzoesäure 3- und 4-Hydroxybenzoesäure (3- und 4-OH-BA) optimiert (HPLC-MS-Bedingungen siehe Anhang 10.2.5). Die größte Empfindlichkeit wurde mit einem Eluenten aus Wasser (mit Essigsäure auf pH 3 eingestellt) und MeCN als Modifier im negativen Modus erreicht.

Abbildung 6.3 zeigt die Chromatogramme von unbestrahlten und bestrahlten Nordseegarnelen (10 kGy) und einer bestrahlten BA-Lösung (10 kGy) als Vergleich nach Anreicherung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether (genaue Probenaufarbeitung s. Anhang 10.8.1.5). Sowohl in dem Chromatogramm der bestrahlten Nordseegarnelen als auch der bestrahlten BA-Lösung sind die Peaks 4 und 6 mit den Retentionszeiten 18 bzw. 23 min zu erkennen. Die Massenspektren dieser Substanzen sind in Anhang 10.8.1.5 dargestellt. Zusätzlich sind auch die Massenspektren der Standardsubstanzen 3- und 4-OH-BA dargestellt. Alle Massenspektren zeigen das charakteristische Molekülion  $m/z$  137  $[M-H]^-$ . Damit sind Peak 4 als 4-OH-BA und Peak 6 als 3-OH-BA, die Hauptradiolyseprodukte der Benzoesäure, identifiziert.

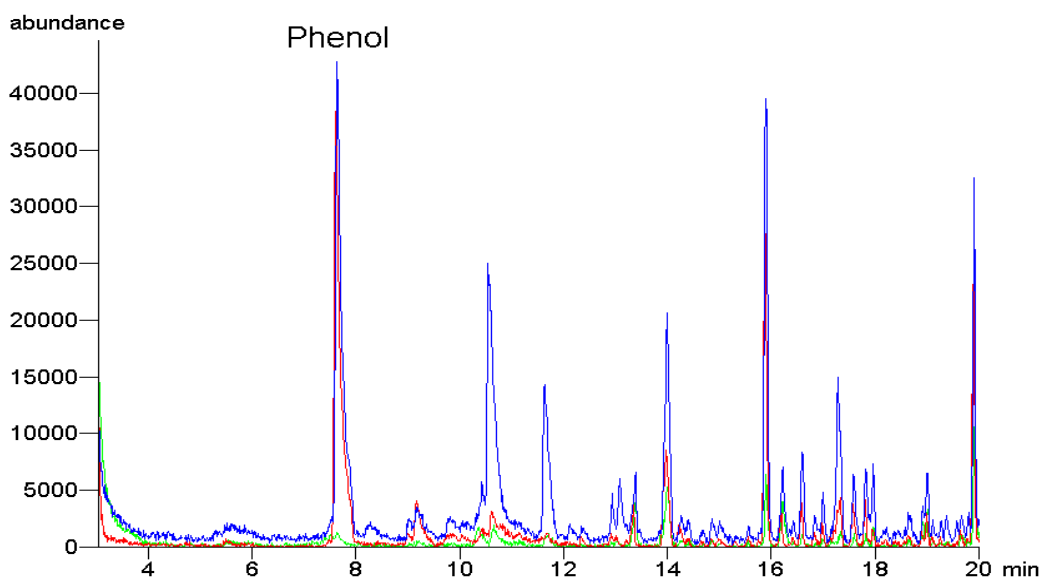


**Abbildung 6.3** HPLC-MS-Chromatogramme (TIC) nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether (APCI negativ, Scan 70-300  $m/z$ ); rot: BA-Lösung 10 kGy, blau: NG 10 kGy, grün: NG unbestrahlt; **4** 4-OH-BA **6** 3-OH-BA

### 6.2.2.3 Identifizierung von flüchtigen Radiolyseprodukten mittels GC-MS

Wie bereits in den Abschnitten 6.2.1.3 und 6.2.2.1 beschrieben, ist die in den bestrahlten Nordseegarnelen enthaltene unbekannte Substanz 5 eine wasserdampf-flüchtige, nichtionische Verbindung, bei der es sich ebenfalls um ein Radiolyseprodukt der zur Konservierung zugesetzten Benzoesäure handeln könnte. Daher wurden sowohl unbestrahlte und bestrahlte Nordseegarnelen (10 kGy) als auch eine mit 10 kGy bestrahlte BA-Lösung nach Anreicherung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether und anschließende Vakuumdestillation (genaue Probenaufarbeitung s. Anhang 10.8.1.6) mittels GC-MS analysiert (GC-MS-Bedingungen s. Anhang 10.3).

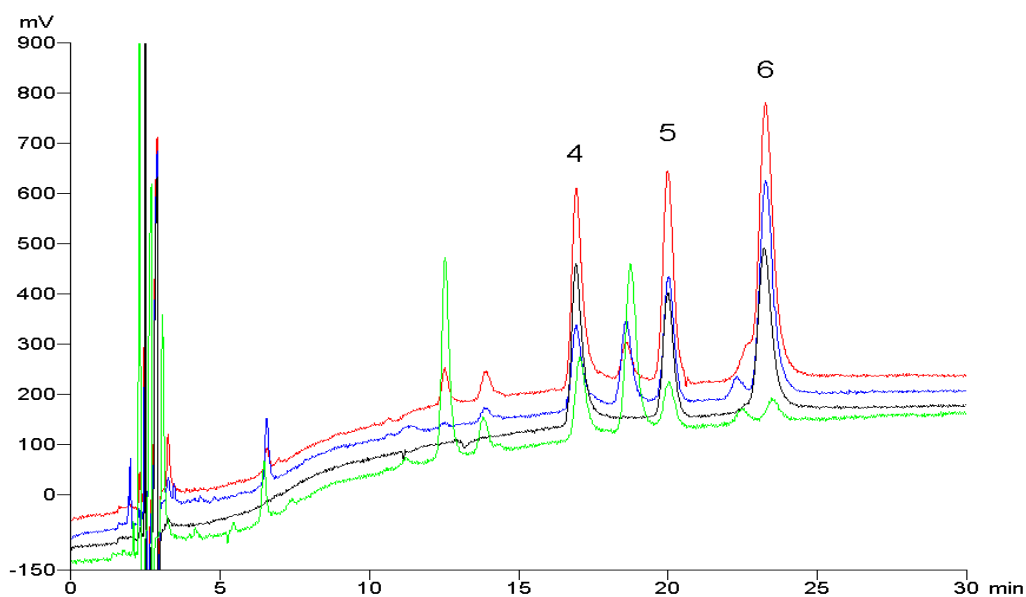
In Abbildung 6.4 sind die Chromatogramme von unbestrahlten und bestrahlten Nordseegarnelen (10 kGy) und der bestrahlten BA-Lösung (10 kGy) als Vergleich dargestellt. Sowohl in dem Chromatogramm der bestrahlten Nordseegarnelen als auch der bestrahlten BA-Lösung ist ein Peak bei 7,6 min zu erkennen, der in dem Chromatogramm der unbestrahlten Nordseegarnelen nur in Spuren nachweisbar ist. Diese Substanz konnte anhand der Spektrenbibliothek als Phenol, ein weiteres Hauptradiolyseprodukt der Benzoesäure, identifiziert werden. Die Massenspektren sind in Anhang 10.8.1.6 dargestellt. Durch eine Dotierung des wässrigen Probenextraktes mit Phenol und anschließende HPLC-Analyse konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um die gesuchte Substanz 5 in den bestrahlten Nordseegarnelen handelt.



**Abbildung 6.4** GC-MS-Chromatogramme (TIC) nach Vakuumdestillation; rot: BA-Lösung 10 kGy, blau: NG 10 kGy, grün: NG unbestrahlt

### 6.2.3 Bestimmung von Benzoesäure-Radiolyseprodukten in konservierten $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen

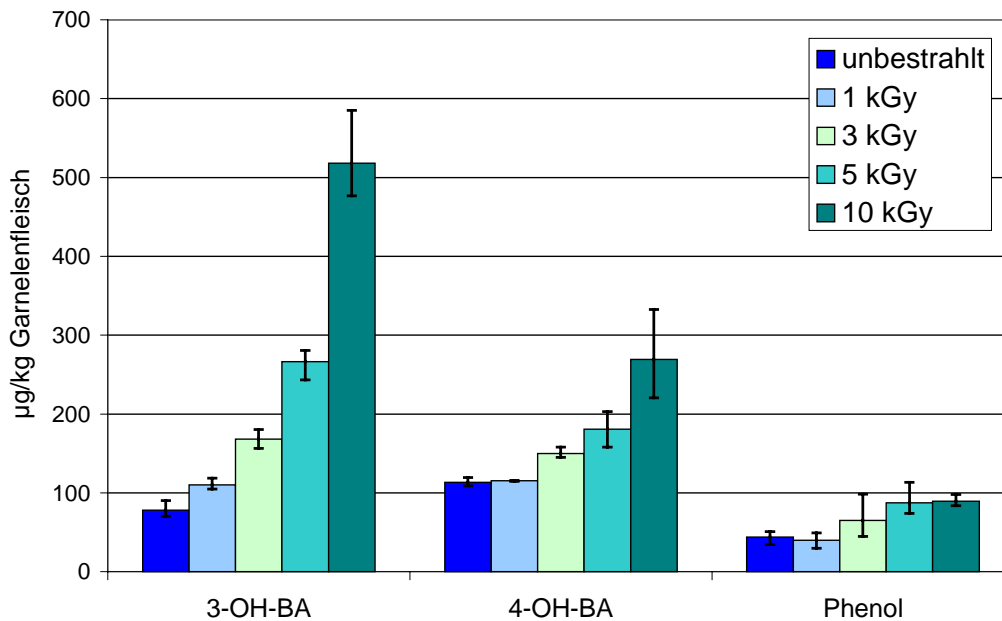
Die Bestimmung der BA-Radiolyseprodukte in bestrahlten konservierten Nordseegarnelen erfolgte nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels HPLC und EC-Detektion (Probenaufarbeitung s. Anhang 10.8.2.1, HPLC-Bedingungen s. Anhang 10.2.6). Abbildung 6.5 zeigt die Chromatogramme von bei Raumtemperatur und im gefrorenen Zustand mit 10 kGy bestrahlten Nordseegarnelen und einer unbestrahlten Kontrollprobe.



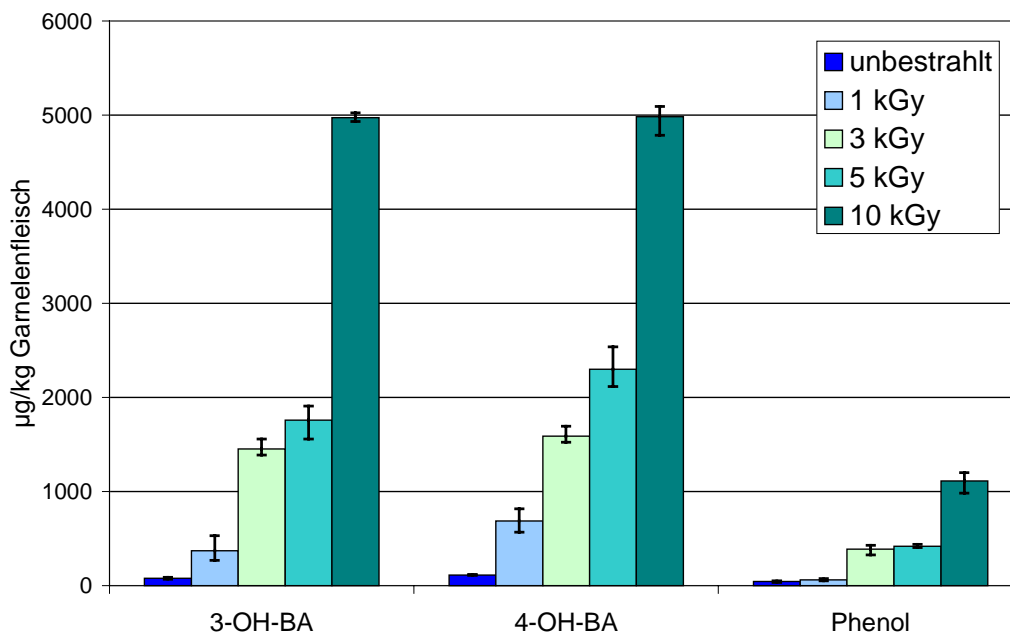
**Abbildung 6.5** Chromatogramme nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether zur Bestimmung der BA-Radiolyseprodukte (Nucleosil, 0,1% TFA/MeCN 95/5 (v/v), ECD 1,15 V); rot: NG 10 kGy RT (1:10 verd.), blau: NG 10 kGy -18 °C (1:4 verd.), grün: NG unbestrahlt (1:3 verd.), schwarz: Std. **4** 4-OH-BA **5** Phenol **6** 3-OH-BA

In den Abbildungen 6.6 und 6.7 sind die Gehalte der drei BA-Radiolyseprodukte 3- und 4-OH-BA und Phenol in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis dargestellt (Einzelergebnisse siehe Anhang 10.8.2.2). Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Spannweite an. Die Gehalte der drei BA-Radiolyseprodukte nehmen sowohl bei den bei Raumtemperatur als auch bei den tiefgefroren bestrahlten Proben mit steigender Bestrahlungsdosis zu. Die Gehalte in den bei Raumtemperatur bestrahlten Nordseegarnelen sind jedoch ca. um den Faktor 10 größer als in den im gefrorenen Zustand bestrahlten Proben. Die OH-BA-Gehalte sind ca. dreimal so hoch wie die Phenolgehalte in den bestrahlten Proben. Sie liegen zwischen 373 und 4985  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in den bei Raumtemperatur bestrahlten und

zwischen 110 und 518  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in den gefroren bestrahlten Proben. Die gemessenen Phenolgehalte betragen 63 bis 1112  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in den bei Raumtemperatur bestrahlten und 40 bis 89  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in den im gefrorenen Zustand bestrahlten Proben. Alle drei Substanzen waren auch in den unbestrahlten Kontrollproben mit Gehalten zwischen 44 und 114  $\mu\text{g}/\text{L}$  nachweisbar.



**Abbildung 6.6** BA-Radiolyseprodukte in gefroren bestrahlten konservierten Nordseegarnelen (Fehlerbalken = Spannweite)



**Abbildung 6.7** BA-Radiolyseprodukte in bei Raumtemperatur bestrahlten konservierten Nordseegarnelen (Fehlerbalken = Spannweite)

---

Signifikante Unterschiede ( $p=0,05$ ) zur unbestrahlten Kontrollprobe sind bei den bei Raumtemperatur bestrahlten Nordseegarnelen für 4-OH-BA und Phenol bereits ab 1 kGy zu beobachten, während sich für 3-OH-BA aufgrund der hohen Standardabweichung signifikante Unterschiede erst ab einer Bestrahlungsdosis von 3 kGy feststellen ließen. Durch die hohen Blindwerte und die niedrigeren Gehalte an Radiolyseprodukten in den gefroren bestrahlten Proben ergaben sich hier erst signifikante Unterschiede ( $p=0,05$ ) ab einer Bestrahlungsdosis von 3 kGy für 4-OH-BA und ab 5 kGy für Phenol. Für 3-OH-BA konnte aufgrund einer sehr geringen Standardabweichung bereits ein signifikanter Unterschied zur unbestrahlten Probe ab 1 kGy festgestellt werden.

### **6.3 Screening auf polare Radiolyseprodukte in $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln**

Da in den bestrahlten konservierten Nordseegarnelen ( $NG_{\text{kons}}$ ) nur die Radiolyseprodukte der Benzoesäure nachweisbar waren, wurden zusätzlich nicht konservierte Nordseegarnelen (NG) für das Screening verwendet. Weiterhin wurden die eiweißreichen Lebensmittel Black Tiger Shrimps (BTS), Tiefsee Shrimps (TS), Hühnerfleisch (HU) und Eiklar (EI) auf ihre Radiolyseprodukte untersucht. Die Probenaufarbeitung der nicht konservierten Nordseegarnelen, Black Tiger und Tiefsee Shrimps und des Eiklars erfolgte analog zur Aufarbeitung der konservierten Nordseegarnelen. Von dem Hühnerfleisch wurde ein wässriger Extrakt hergestellt. Nach Proteinfällung mit Perchlorsäure und anschließender Zentrifugation wurden die Proben mittels HPLC untersucht (genaue Durchführung siehe Anhang 10.8.3.1).

Die Ergebnisse des Screenings sind nach dem in Abschnitt 6.1 beschriebenen Schema für die drei verschiedenen chromatographischen Bedingungen und Detektoren in den Tabellen 6.4 bis 6.6 dargestellt. Um die Ergebnisse direkt vergleichen zu können, sind wiederum die aus den Signal/Rausch-Verhältnissen berechneten Faktoren (bezogen auf ein Injektionsvolumen von 20  $\mu\text{L}$ ) für die bestrahlten Proben im Vergleich zu den unbestrahlten Proben dargestellt. Alle Peaks, bei denen dieser Faktor sowohl für die im gefrorenen Zustand als auch die bei Raumtemperatur bestrahlte Probe  $\geq 3$  ist, sind wieder rot markiert. Bei der isokratischen Trennung mit 0,1% TFA/MeCN 95/5 (v/v) war der vordere Bereich der ECD-Chromatogramme von 5 - 10 min bei den Garnelen aufgrund von Peaküberlagerungen nicht auswertbar.

Bei allen drei gewählten chromatographischen Bedingungen sind Peaks in den Chromatogrammen zu erkennen, bei denen das Verhältnis von mindestens einer der beiden bestrahlten Proben zur unbestrahlten Probe  $\geq 3$  ist. Bei einigen dieser Substanzen sind Blindwerte in den unbestrahlten Proben vorhanden. Signifikante Unterschiede zwischen beiden bestrahlten Proben und der unbestrahlten Probe waren nur für einzelne Lebensmittel bei den verschiedenen chromatographischen Bedingungen festzustellen (Tabellen 6.4 - 6.6).

**Tabelle 6.4** Unbekannte Substanzen in  $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln (ohne Anreicherung, Nucleosil, 0,1% TFA/MeCN 95/5 (v/v))

Retentionszeit	Lebensmittel	ECD 1,15 V				FL 270/315 nm				UV 220 nm						
		unbestrahlt <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>2</sup>	10 kGy RT <sup>1</sup>	10 kGy RT <sup>2</sup>	unbestrahlt <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>2</sup>	10 kGy RT <sup>1</sup>	10 kGy RT <sup>2</sup>	unbestrahlt <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>2</sup>	10 kGy RT <sup>1</sup>	10 kGy RT <sup>2</sup>
6,5	HU	119	95	0,8	>332	>2,8	62	21	0,3	1282	21	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
7	EI	1,0	74	74	11	11	1,0	2,9	2,9	1,0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
7,5	BTS	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,0	1,0	n.n.	21	21	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	TS	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,0	1,0	n.n.	81	81	1,0	1,0	n.n.	8,5	8,5
	EI	1,0	5,9	5,9	47	47	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
9	BTS	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,5	3,4	2,3	6,9	6,9
	EI	1,0	1,0	n.n.	12	12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,0	1,0	n.n.	4,0	4,0
	HU	<3	18	>5,9	85	>28	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,8	1,0	1,0	17	4,4
9,5	BTS	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2,0	11	5,3	20	10	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	TS	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,0	1,0	n.n.	32	32	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
10,5	NG	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,0	n.a.	n.a.	276	276	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	BTS	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,0	1,0	n.n.	64	64	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	TS	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	3,1	3,8	1,2	70	23	1,0	1,0	n.n.	5,1	5,1
	EI	1,0	1,0	n.n.	112	112	1,0	1,0	n.n.	8,9	8,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	HU	21	68	3,2	>725	>34	9,3	15	1,6	53	5,7	1,0	1,0	n.n.	11	11
11,5	EI	3,9	104	27	82	21	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	HU	241	495	2,1	>784	>3,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
12	HU	<3	<3	n.n.	518	>173	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
14	BTS	20	14	0,7	95	4,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	TS	43	28	0,7	222	5,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	EI	12	31	2,5	58	4,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	HU	<3	17	>5,6	67	22	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
16,5	BTS	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,0	1,2	1,2	7,1	7,1	1,6	1,8	1,1	4,7	3,0
	TS	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,0	1,0	n.n.	20	20	1,0	1,0	n.n.	11	11
18	TS	28	19	0,7	106	3,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
19,5	BTS	11	28	2,5	>266	>24	1,0	1,0	n.n.	3,7	3,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	TS	46	62	1,4	328	7,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	HU	106	112	1,1	>1120	>11	1,0	1,0	n.n.	24	24	1,0	1,0	n.n.	9,4	9,4
21	EI	15	8,9	0,6	78	5,1	1,0	3,2	3,2	16	16	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
23,5	TS	9,7	9,6	1,0	>433	>45	1,0	1,0	n.n.	10	10	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	EI	1,0	11	11	27	27	1,0	2,1	2,1	8,7	8,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	HU	<3	<3	n.n.	50	>17	4,0	4,6	1,2	26	6,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

1 Signal/Rausch-Verhältnis (S/N)

2 Faktor (S/N bestrahlte Probe / S/N unbestrahlte Probe)

n.n. nicht nachweisbar

n.a. nicht analysiert

NG Nordseegarnelen (nicht konserviert)

BTS Black Tiger Shrimps

TS Tiefsee Shrimps

EI Eiklar

HU Hühnerfleisch

**Tabelle 6.5** Unbekannte Substanzen in  $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln (ohne Anreicherung, Nucleosil, 0,1% TFA/MeCN 85/15 (v/v))

Retentionszeit	Lebensmittel	ECD 1,15 V				
		unbestrahlt <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>2</sup>	10 kGy RT <sup>1</sup>	10 kGy RT <sup>2</sup>
6,5	BTS	25	27	1,1	119	4,7
	TS	19	21	1,1	137	7,2
	EI	27	52	1,9	115	4,2
	HU	14	19	1,4	166	12
8,0	EI	1,0	9,5	9,5	36	36
9,5	EI	1,0	1,0	n.n.	15	15
11,5	HU	11	24	2,3	152	14
15,5	BTS	1,0	1,0	n.n.	8,6	8,6
	TS	3,5	3,7	1,1	20	5,7
	EI	3,5	8,0	2,3	36	11
16,5	EI	1,0	1,0	n.n.	5,5	5,5
22	EI	1,0	1,0	n.n.	13	13

1 Signal/Rausch-Verhältnis (S/N)  
2 Faktor (S/N bestrahlte Probe / S/N unbestrahlte Probe)  
BTS Black Tiger Shrimps  
TS Tiefsee Shrimps

n.n. nicht nachweisbar  
EI Eiklar  
HU Hühnerfleisch

**Tabelle 6.6** Unbekannte Substanzen in  $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln (ohne Anreicherung, Nucleosil, 0,1% TFA/MeCN Gradient)

Retentionszeit	Lebensmittel	FL 270/315 nm					UV 220 nm				
		unbestrahlt <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>2</sup>	10 kGy RT <sup>1</sup>	10 kGy RT <sup>2</sup>	unbestrahlt <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>2</sup>	10 kGy RT <sup>1</sup>	10 kGy RT <sup>2</sup>
7,5	BTS	1,0	1,0	n.n.	35	35	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	TS	1,0	1,0	n.n.	31	31	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	HU	1,0	1,0	n.n.	63	63	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
7,5*	TS	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,0	1,0	n.n.	9,7	10
9,5	BTS	4,5	20	4,4	31	6,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	TS	2,8	2,7	1,0	36	13	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
10,5	NG	1,0	n.a.	n.a.	140	140	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	BTS	17	23	1,4	119	7,1	2,6	3,1	1,2	8,9	3,4
	TS	4,5	5,5	1,2	72	16	1,0	1,0	n.n.	5,9	5,9
	EI	1,0	1,0	n.n.	4,0	4,0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	HU	19	29	1,5	99	5,3	1,0	2,0	2,0	30	30
17,0	HU	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,0	4,4	4,4	20	20
25,5	HU	56	106	1,9	598	11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

1 Signal/Rausch-Verhältnis (S/N)  
2 Faktor (S/N bestrahlte Probe / S/N unbestrahlte Probe)  
NG Nordseegarnelen (nicht konserviert)  
BTS Black Tiger Shrimps  
TS Tiefsee Shrimps

n.n. nicht nachweisbar  
n.a. nicht analysiert  
EI Eiklar  
HU Hühnerfleisch



Beim Eiklar waren mehrere strahleninduzierte Peaks mit den Retentionszeiten 7, 7,5, 11,5 und 23,5 min bei isokratischer Trennung mit 0,1% TFA/MeCN 95/5 (v/v) und EC-Detektion zu beobachten. Bei FL-Detektion war ein weiterer Peak mit der Retentionszeit 21 min zu erkennen. Weiterhin war bei isokratischer Trennung mit 0,1% TFA/MeCN 85/15 (v/v) und EC-Detektion ein strahleninduzierter Peak bei 8 min nachweisbar. Auch beim Hühnerfleisch traten strahleninduzierte Peaks im isokratischen Lauf mit 0,1% TFA/MeCN 95/5 (v/v) bei 9, 10,5 und 14 min (ECD) und im Gradientenlauf bei 17 min (UVD) auf. Weiterhin war bei den Black Tiger Shrimps ein strahleninduzierter Peak (9,5 min) sowohl bei isokratischer (0,1% TFA/MeCN 95/5 (v/v)) als auch bei Gradientenelution mittels FLD nachweisbar. In den Chromatogrammen der Nordseegarnelen und Tiefsee Shrimps waren keine Peaks zu beobachten, die sich bei beiden Bestrahlungstemperaturen signifikant von der unbestrahlten Probe unterschieden.

Um als potenzieller Bestrahlungsmarker in Betracht zu kommen, sollte die Bildung des strahleninduzierten Peaks möglichst unabhängig von der Bestrahlungstemperatur sein. Das bedeutet, dass die Faktoren für die gefroren und die bei Raumtemperatur bestrahlte Probe innerhalb eines Zeitfensters für den jeweiligen Detektor in der gleichen Größenordnung liegen sollten. Dieses Kriterium wird in der Tabelle lediglich von einem Peak bei 11,5 min im Eiklar bei EC-Detektion erfüllt, der entsprechend durch einen grauen Balken hervorgehoben ist. Von allen anderen Peaks werden die genannten Kriterien nicht erfüllt, da eine deutliche Temperaturabhängigkeit der Bildung anhand der höheren Faktoren bei den bei Raumtemperatur bestrahlten Proben zu erkennen ist. Die einzige Ausnahme bildet der Peak bei 7 min im Eiklar (0,1% TFA/MeCN 95/5 (v/v), ECD). Dieser ist bei der gefroren bestrahlten Probe deutlich höher.

Es hat sich gezeigt, dass lediglich mit ECD deutliche strahleninduzierte Peaks nachweisbar waren, was auf die sehr empfindliche Detektion zurückgeführt werden kann. Innerhalb der meisten Zeitfenster konnten bei der FL- bzw. UV-Detektion keine Peaks nachgewiesen werden. Um auch hier mögliche strahleninduzierte Peaks nachzuweisen, wurde ein Anreicherungsverfahren entwickelt.

## **6.4 Screening auf polare Radiolyseprodukte in $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln nach Probenanreicherung**

In den eiweißreichen Lebensmitteln waren nach einfacher Probenaufarbeitung durch Herstellung des Presssaftes bzw. eines wässrigen Extraktes mit anschließender Proteinfällung keine Radiolyseprodukte nachweisbar, die als Marker für einen Bestahlungsnachweis in Frage kommen. Daher wurde als weitere Aufarbeitung der Proben die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether gewählt, mit der bereits die Isolierung und Anreicherung der Benzoesäure-Radiolyseprodukte aus den konservierten Nordseegarnelen erfolgreich gelang (genaue Probenaufarbeitung s. Anhang 10.8.4.1). Das Screening erfolgte nach dem in Abschnitt 6.1 beschriebenen Schema. Jedoch wurde auf die Darstellung der Gradientenelution verzichtet, da die Chromatogramme aufgrund von überlagerten Peaks nur schwer auswertbar waren.

Die Ergebnisse des Screenings nach Anreicherung der Probenextrakte um den Faktor 50 sind für alle untersuchten Lebensmittel in den Tabellen 6.7 und 6.8 dargestellt. Um die Ergebnisse direkt vergleichen zu können, sind wiederum die aus den Signal/Rausch-Verhältnissen berechneten Faktoren (bezogen auf ein Injektionsvolumen von 20  $\mu$ L angereicherter Extrakt) für die bestrahlten Proben im Vergleich zu den unbestrahlten Proben dargestellt. Alle Peaks, bei denen dieser Faktor sowohl für die im gefrorenen Zustand als auch die bei Raumtemperatur bestrahlte Probe  $\geq 3$  ist, sind wieder rot markiert. Die bereits identifizierten Radiolyseprodukte der Benzoesäure in den bestrahlten konservierten Nordseegarnelen wurden hier nicht berücksichtigt.

Bei beiden chromatographischen Bedingungen (isokratische Trennung mit 0,1% TFA/MeCN 95/5 und 85/15 (v/v)) sind eine Reihe von Peaks in den Chromatogrammen zu erkennen, bei denen das Verhältnis von mindestens einer der beiden bestrahlten Proben zur unbestrahlten Probe  $\geq 3$  ist. Bei den meisten dieser Substanzen sind Blindwerte in der unbestrahlten Probe vorhanden. Es ist auch hier zu erkennen, dass die strahleninduzierten Veränderungen in den bei Raumtemperatur bestrahlten Proben sehr viel größer sind als in den tiefgefroren bestrahlten Proben. Signifikante Unterschiede waren zwischen beiden bestrahlten Proben und der unbestrahlten Probe bei der isokratischen Elution mit 0,1% TFA/MeCN 95/5 (v/v) auch nach Probenanreicherung nur für einzelne Lebensmittel festzustellen (Tabelle 6.7). Beim Hühnerfleisch konnten eine Reihe von

strahleninduzierten Peaks mit den Retentionszeiten 6, 7,5, 11, 13,5 und 16,5 min mit verschiedenen Detektoren nachgewiesen werden. Weiterhin waren in den Chromatogrammen der Black Tiger und Tiefsee Shrimps bei beiden Bestrahlungstemperaturen Peaks mit der Retentionszeit 10,5 min, in den Nordseegarnelen mit der Retentionszeit 15,5 min und im Eiklar mit der Retentionszeit 22 min zu erkennen. Immer war jedoch der Peak im Chromatogramm der bei Raumtemperatur bestrahlten Probe mindestens viermal so groß wie in der gefroren bestrahlten Probe. In den Chromatogrammen der konservierten Nordseegarnelen wurden nach Probenanreicherung weitere strahleninduzierte Peaks mit den Retentionszeiten 6, 10 und 12 min beobachtet, die in den nicht konservierten Nordseegarnelen nicht vorkommen. Hierbei könnte es sich ebenfalls um Radiolyseprodukte der Benzoesäure handeln, die jedoch nicht weiter identifiziert wurden.

In Tabelle 6.8 sind die Ergebnisse des Screenings bei der isokratischen Elution mit 0,1% TFA/MeCN 85/15 (v/v) für die verschiedenen Lebensmittel dargestellt. Hier ist besonders der Peak mit der Retentionszeit von 15,5 min hervorzuheben (grau markiert). Diese unbekannte Substanz ist in allen untersuchten Lebensmitteln außer im Eiklar bei Bestrahlung sowohl im gefrorenen Zustand als auch bei Raumtemperatur mit allen drei Detektoren nachweisbar. Die FL-Detektion zeigte die größte Empfindlichkeit. In allen Proben sind zwar geringe Blindwerte nachweisbar, die aus den Signal/Rausch-Verhältnissen der beiden bestrahlten und der unbestrahlten Probe berechneten Faktoren liegen jedoch für alle Lebensmittel  $\geq 3$ , so dass signifikante Unterschiede unter beiden Bestrahlungsbedingungen vorliegen sollten. Lediglich bei den Tiefsee Shrimps sind höhere Blindwerte vorhanden, wodurch sich ein niedrigerer Faktor ergibt. Weiterhin ist hervorzuheben, dass diese Substanz in den bei verschiedenen Temperaturen bestrahlten Proben im Gegensatz zu den bisher beobachteten strahleninduzierten Peaks in annähernd gleichen Konzentrationen entsteht. Diese Substanz könnte sich daher als Bestrahlungsmarker für Garnelen und Hühnerfleisch eignen. Die übereinandergelegten Chromatogramme (FLD) der bestrahlten und unbestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger und Tiefsee Shrimps und Hühnerfleisch sind in den Abbildungen 6.8 - 6.12 dargestellt.

**Tabelle 6.7** Unbekannte Substanzen in  $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln (nach Anreicherung, Nucleosil, 0,1% TFA/MeCN 95/5 (v/v))

Retentionszeit	Lebensmittel	ECD 1,15 V				FL 270/315 nm					UV 220 nm					
		unbestrahlt <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>2</sup>	10 kGy RT <sup>1</sup>	10 kGy RT <sup>2</sup>	unbestrahlt <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>2</sup>	10 kGy RT <sup>1</sup>	10 kGy RT <sup>2</sup>	unbestrahlt <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>2</sup>	10 kGy RT <sup>1</sup>	10 kGy RT <sup>2</sup>
6	NG <sub>kons</sub>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	7,7	6,5	0,8	953	125	<2	<2	n.n.	33	>17
	HU	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,0	12	12	57	57	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
7,5	NG	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	11	n.a.	n.a.	105	9,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	BTS	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,8	8,0	1,7	50	10	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	TS	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	7,6	11	1,5	108	14	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	HU	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,4	10	3,0	147	43	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
10	NG <sub>kons</sub>	<50	<50	n.n.	1267	>25	20	11	0,6	769	38	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
10,5	NG <sub>kons</sub>	209	221	1,1	2567	12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	9,2	12	1,3	147	16
	NG	<20	n.a.	n.a.	2387	>119	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,5	n.a.	n.a.	109	44
	BTS	<20	62	>3,1	657	>33	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,0	5,5	5,5	74	74
	TS	<20	47	>2,4	272	>14	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,0	5,3	5,3	21	21
	HU	<20	43	>2,2	601	>30	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,2	6,5	2,0	32	10
11	HU	<20	704	>35	>5854	>293	7,8	94	12	1791	228	26	33	1,3	103	4,0
12	NG <sub>kons</sub>	719	486	0,7	>10372	>14	46	39	0,9	6417	140	12	13	1,1	1682	143
13,5	NG <sub>kons</sub>	649	434	0,7	9407	15	106	87	0,8	1832	17	4,8	4,1	0,9	61	13
	BTS	95	90	0,9	439	4,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	TS	60	77	1,3	1263	21	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	HU	<20	333	>17	>5879	>294	2,1	81	39	1342	641	1,0	3,8	3,8	49	49
15,5	NG	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,0	7,2	7,2	28	28
	HU	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,4	n.a.	n.a.	25	7,3
16,5	NG	287	n.a.	n.a.	1602	5,6	23	n.a.	n.a.	130	5,7	5,9	n.a.	n.a.	24	4,2
	BTS	<20	44	>2,2	1295	>65	2,0	4,7	2,4	109	55	2,1	2,0	0,9	25	12
	TS	114	125	1,1	639	5,6	7,8	8,1	1,0	46	5,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	HU	<20	141	>7,1	1429	>72	1,4	11	8,2	100	72	1,0	5,2	5,2	27	27
17,5	NG <sub>kons</sub>	7202	5634	0,8	>10438	>1,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	51	43	0,8	638	13
	NG	1554	n.a.	n.a.	7715	5,0	51	n.a.	n.a.	247	4,8	20	n.a.	n.a.	98	4,8
	BTS	312	532	1,7	>7573	>24	3,9	3,2	0,8	99	25	2,0	1,7	0,9	54	28
	TS	1251	1491	1,2	5152	4,1	13	13	1,0	52	4,0	7,0	7,8	1,1	29	4,2
	HU	1577	4121	2,6	>5926	>3,8	18	52	2,9	346	19	10	30	2,9	197	19
19,5	EI	531	1134	2,1	>6978	>13	35	72	2,0	409	12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
21,5	NG	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	11	n.a.	n.a.	61	5,7
	BTS	140	165	1,2	825	5,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	5,7	7,1	1,2	40	7,0
	TS	385	322	0,8	2913	7,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	18	15	0,8	169	9,3
22	EI	119	417	3,5	2295	19	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,4	10	3,0	39	11
	HU	67	141	2,1	706	11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,0	4,5	2,3	23	12

1 Signal/Rausch-Verhältnis (S/N)

2 Faktor (S/N bestrahlte Probe / S/N unbestrahlte Probe)

n.n. nicht nachweisbar

n.a. nicht analysiert

NG Nordseegarnelen (nicht konserviert)

NG<sub>kons</sub> Nordseegarnelen (konserviert)

BTS Black Tiger Shrimps

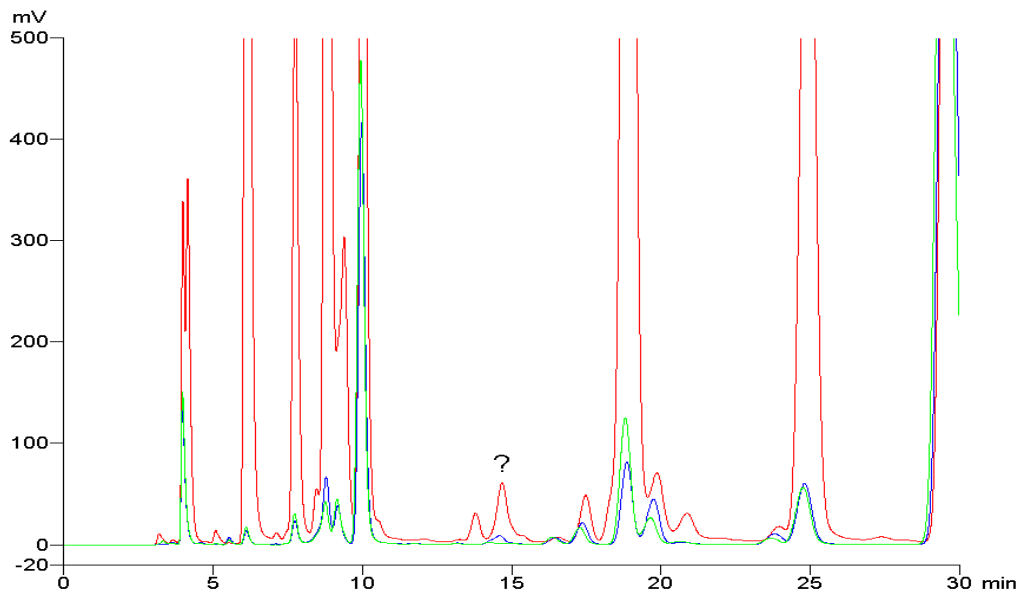
TS Tiefsee Shrimps

EI Eiklar

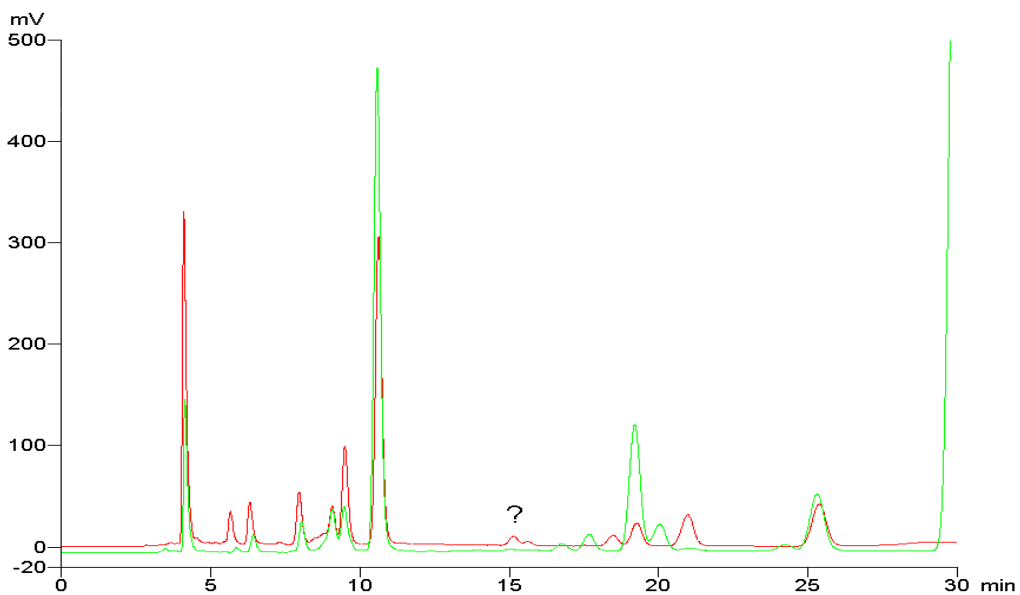
HU Hühnerfleisch

**Tabelle 6.8** Unbekannte Substanzen in  $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln (mit Anreicherung, Phenomenex Aqua, 0,1% TFA/MeCN 85/15 (v/v))

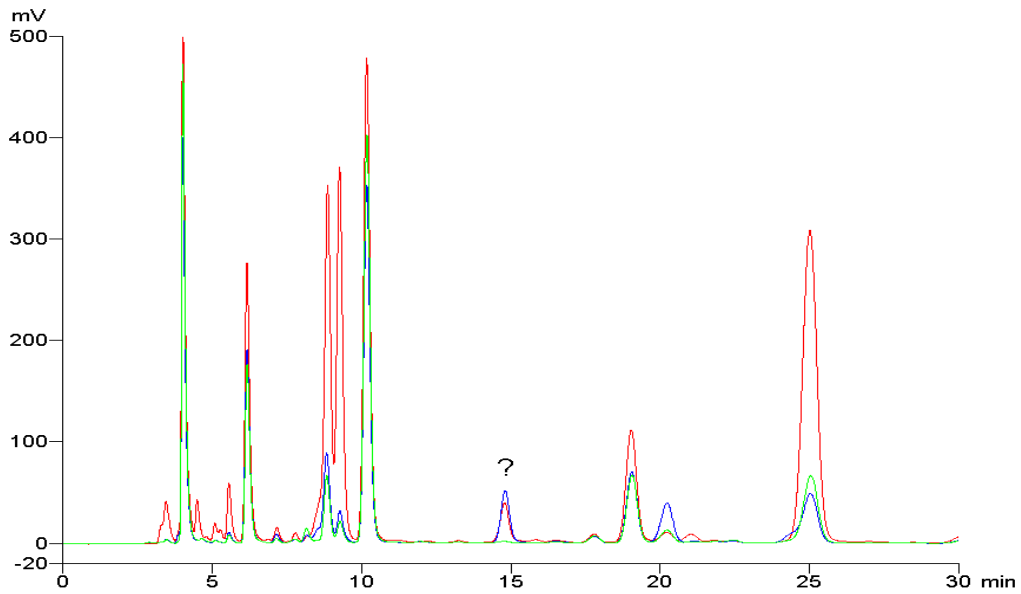
Retentionszeit	Lebensmittel	ECD 1,15 V				FL 270/315 nm				UV 220 nm						
		unbestrahlt <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>2</sup>	10 kGy RT <sup>1</sup>	10 kGy RT <sup>2</sup>	unbestrahlt <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>2</sup>	10 kGy RT <sup>1</sup>	10 kGy RT <sup>2</sup>	unbestrahlt <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>1</sup>	10 kGy -18 °C <sup>2</sup>	10 kGy RT <sup>1</sup>	10 kGy RT <sup>2</sup>
6,5	NG <sub>kons</sub>	2391	1837	0,8	>14777	>6,2	98	80	0,8	10504	108	66	59	0,9	3527	53
7	NG <sub>kons</sub>	563	427	0,8	4382	7,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	BTS	128	211	1,6	819	6,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	HU	216	259	1,2	1083	5,0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
7,5	HU	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,4	12	3,5	54	16
8	NG <sub>kons</sub>	1266	1062	0,8	>14495	>11	176	134	0,8	3346	19	8,3	11	1,3	141	17
	HU	122	784	6,4	>6426	>53	3,0	123	41	2039	689	4,7	6,5	1,4	75	16
8,5	HU	<20	610	>31	>6406	>320	20	92	4,6	1900	94	4,2	6,6	1,5	103	24
9	NG <sub>kons</sub>	5187	7671	1,5	>14469	>2,8	242	381	1,6	10624	44	42	65	1,5	1949	46
	BTS	324	569	1,8	>6708	>21	76	101	1,3	399	5,3	4,2	7,6	1,8	108	26
	TS	697	687	1,0	3259	4,7	29	44	1,5	149	5,1	3,9	7,4	1,9	30	7,7
	HU	124	852	6,9	>6402	>52	5,3	85	16	1784	339	1,3	9,0	7,2	120	96
9,5	NG <sub>kons</sub>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	256	217	0,8	1713	6,7	110	91	0,8	428	3,9
	BTS	897	1615	1,8	>6718	>7,5	24	35	1,5	420	18	10	14	1,4	181	18
	HU	3780	>6733	>1,8	>6388	>1,7	50	139	2,8	1013	20	22	60	2,7	412	18
11	EI	208	601	2,9	1591	7,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
11,5	NG <sub>kons</sub>	4784	>15504	>3,2	>14224	>3,0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	28	126	4,5	1755	62
13,5	BTS	940	1227	1,3	4478	4,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	13	19	1,4	71	5,5
	TS	2498	2337	0,9	>6209	>2,5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	33	38	1,1	259	7,8
	EI	329	1075	3,3	>3196	>9,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	6,1	17	2,8	63	10
	HU	143	588	4,1	2624	18	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,9	6,4	3,3	39	20
14	NG <sub>kons</sub>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<2	<2	n.n.	161	>80	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	HU	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,0	1,0	n.n.	8,9	8,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
15,5	NG <sub>kons</sub>	<50	500	>10	3849	>77	6,7	49	7,2	334	49	<2	5,5	>2,7	38	>19
	NG	<50	n.a.	n.a.	471	>9,4	6,7	n.a.	n.a.	53	7,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	BTS	<20	611	>31	408	>20	1,5	59	40	44	30	1,0	7,4	7,4	5,9	5,9
	TS	71	284	4,0	335	4,7	8,4	28	3,4	19	2,2	1,0	3,1	3,1	3,7	3,7
	HU	<20	807	>40	920	>46	1,6	77	48	83	52	1,0	10	10	11	11
18	HU	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	20	34	1,7	231	12	1,0	1,5	1,5	22	22
18,5	NG <sub>kons</sub>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<2	<2	n.n.	1316	>658
19	EI	729	1146	1,6	>3241	>4,4	38	72	1,9	410	11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
21	NG <sub>kons</sub>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	15	10	0,7	158	11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	NG	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	15	n.a.	n.a.	176	12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	BTS	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,0	1,0	n.n.	7,8	7,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	TS	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,6	2,9	0,8	39	11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	HU	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,5	33	9,5	15	4,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
25	NG <sub>kons</sub>	1,0	1,0	1,0	>309	>309	320	342	1,1	4908	15	14	15	1,1	1971	139
	BTS	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	76	56	0,7	351	4,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	TS	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	93	36	0,4	536	5,8	4,6	2,3	0,5	19	4,2
	HU	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	147	482	3,3	800	5,5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
1	Signal/Rausch-Verhältnis (S/N)										n.n.	nicht nachweisbar				
2	Faktor (S/N bestrahlte Probe / S/N unbestrahlte Probe)										n.a.	nicht analysiert				
NG	Nordseegarnelen (nicht konserviert)										TS	Tiefsee Shrimps				
NG <sub>kons</sub>	Nordseegarnelen (konserviert)										EI	Eiklar				
BTS	Black Tiger Shrimps										HU	Hühnerfleisch				



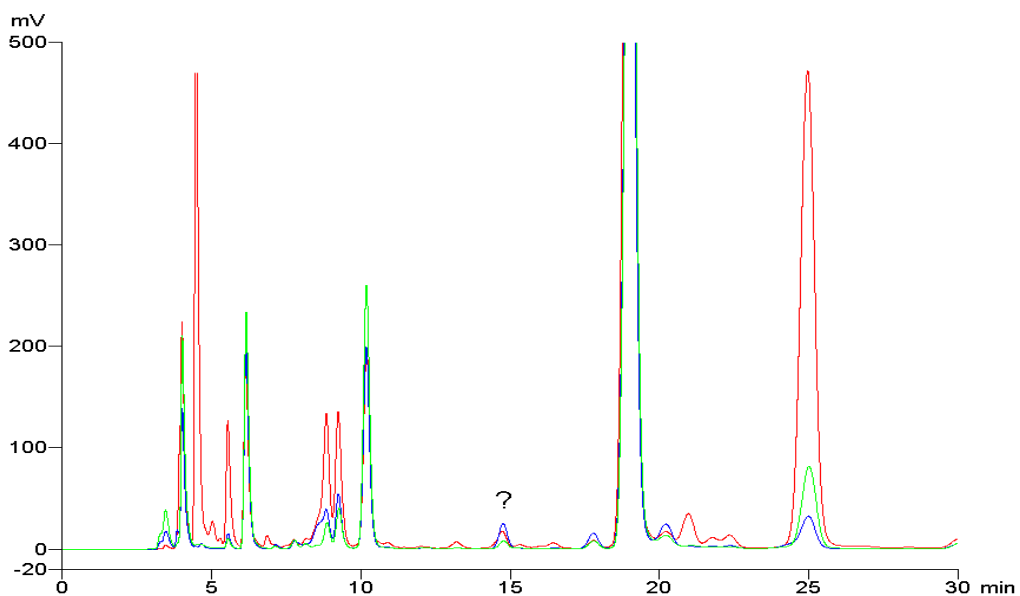
**Abbildung 6.8** Chromatogramme von konservierten Nordseegarnelen (Phenomenex Aqua, 0,1% TFA/MeCN 85/15 (v/v), FL 270/315 nm); rot: 10 kGy RT, blau: 10 kGy -18 °C, grün: unbestrahlt



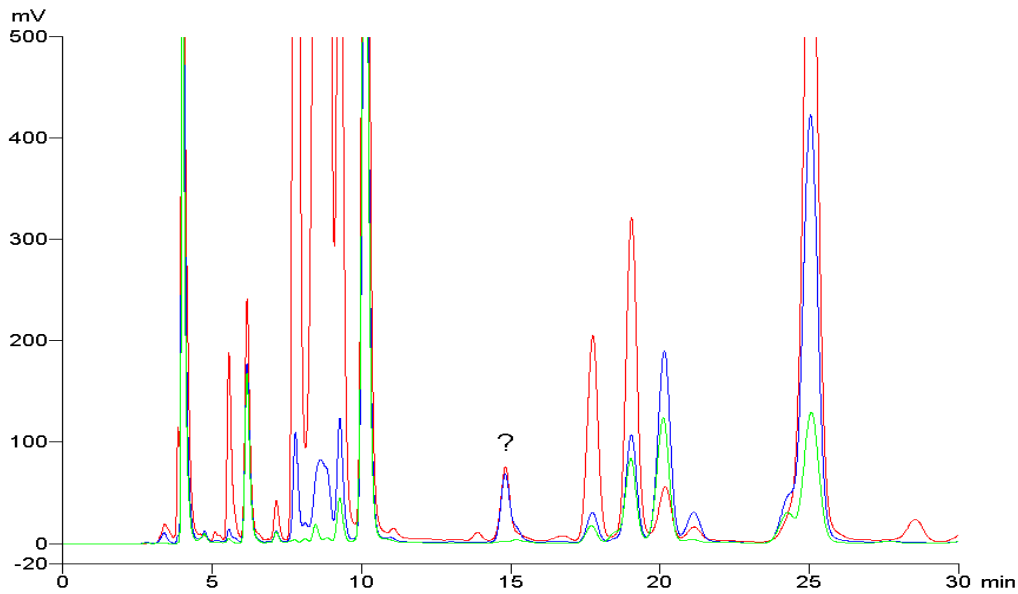
**Abbildung 6.9** Chromatogramme von Nordseegarnelen (Phenomenex Aqua, 0,1% TFA/MeCN 85/15 (v/v), FL 270/315 nm); rot: 10 kGy RT, grün: unbestrahlt



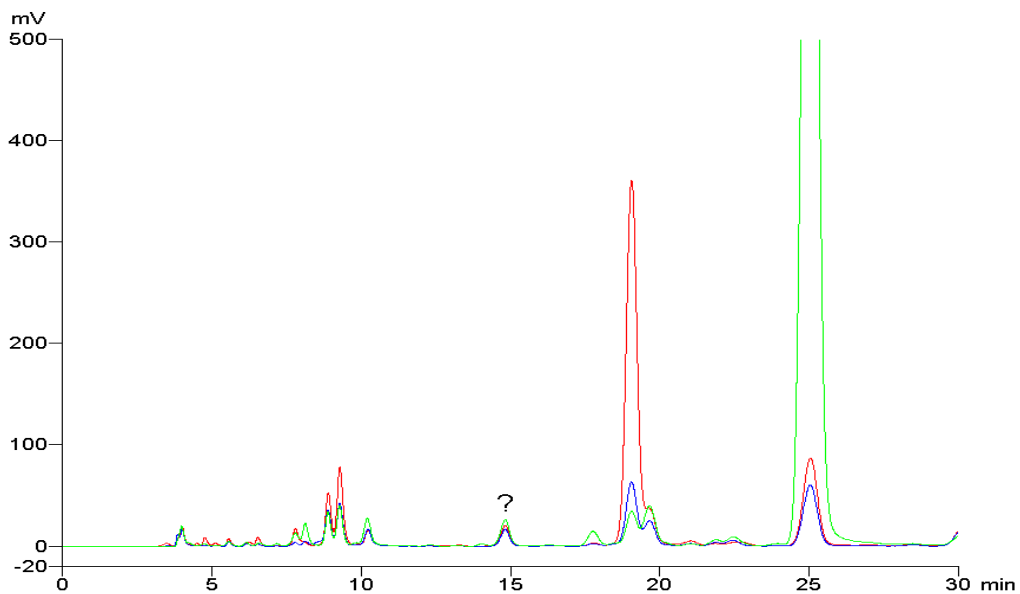
**Abbildung 6.10** Chromatogramme von *Black Tiger Shrimps* (Phenomenex Aqua, 0,1% TFA/MeCN 85/15 (v/v), FL 270/315 nm); rot: 10 kGy RT, blau: 10 kGy -18 °C, grün: unbestrahlt



**Abbildung 6.11** Chromatogramme von *Tiefsee Shrimps* (Phenomenex Aqua, 0,1% TFA/MeCN 85/15 (v/v), FL 270/315 nm); rot: 10 kGy RT, blau: 10 kGy -18 °C, grün: unbestrahlt



**Abbildung 6.12** Chromatogramme von Hühnerfleisch (Phenomenex Aqua, 0,1% TFA/MeCN 85/15 (v/v), FL 270/315 nm); rot: 10 kGy RT, blau: 10 kGy -18 °C, grün: unbestrahlt



**Abbildung 6.13** Chromatogramme von Eiklar (Phenomenex Aqua, 0,1% TFA/MeCN 85/15 (v/v), FL 270/315 nm); rot: 10 kGy RT, blau: 10 kGy -18 °C, grün: unbestrahlt

Im Eiklar war unter den gleichen chromatographischen Bedingungen ebenfalls ein Peak mit der Retentionszeit 15,5 min nachweisbar, die Blindwerte waren hier jedoch sehr hoch und es war keine Zunahme bei Bestrahlung feststellbar (Abbildung 6.13). Weitere strahleninduzierte Peaks waren bei der isokratischen Elution mit 0,1% TFA/MeCN 85/15 (v/v) nur beim Hühnerfleisch mit den Retentionszeiten 7,5, 8, 9, 13,5, 21 und 25 min, beim Eiklar mit der Retentionszeit 13,5 min und bei den konservierten Nordseegarnelen mit der Retentionszeit 11,5 zu erkennen. Hier waren



jedoch wieder die Peaks in den bei Raumtemperatur bestrahlten Proben wesentlich größer als in den tiefgefroren bestrahlten Proben.

### **6.4.1 Identifizierung**

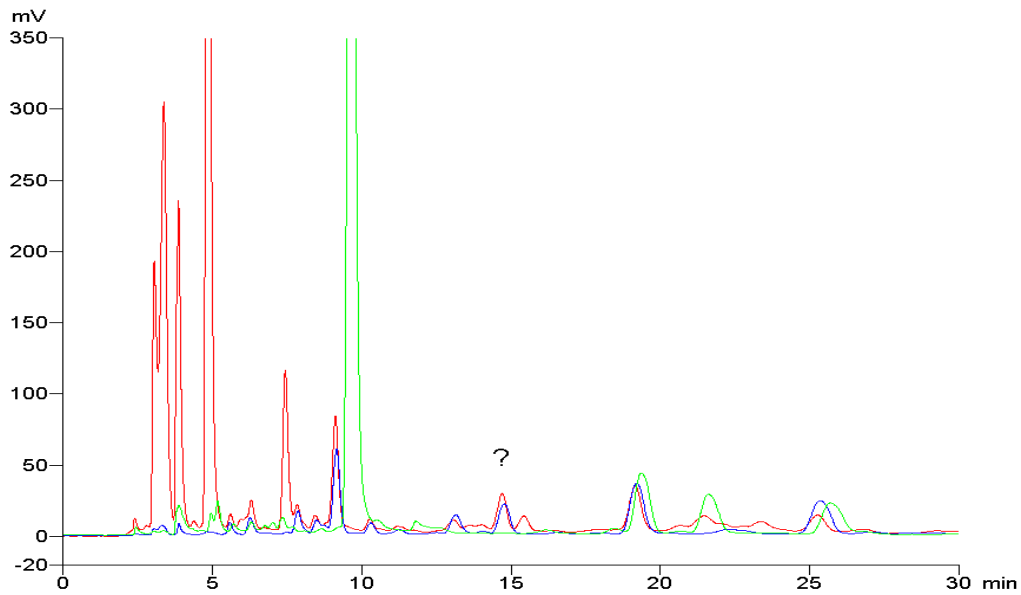
Um zu überprüfen, ob es sich bei der unbekannt Substanz mit der Retentionszeit 15,5 min in den bestrahlten Lebensmitteln um ein Aminosäure-Radiolyseprodukt handelt, wurden verschiedene Modell-Versuche durchgeführt. Zunächst wurden die bestrahlten Aminosäure-Modell-Lösungen (siehe Abschnitt 4.1.4) auf die unbekannte Substanz hin untersucht. Um den Precursor zu ermitteln, wurden verschiedene Aminosäure-Gemische mit dem Fenton-System (siehe Abschnitt 6.4.1.1) zur Simulation der  $\gamma$ -Bestrahlung behandelt. Weiterhin wurde das chromatographische Verhalten der Substanz bei Elution mit verschiedenen pH-Werten untersucht. Die Identifizierung der Substanz erfolgte mittels HPLC-MS.

#### **6.4.1.1 Modell-Versuche**

##### **Aminosäure-Modell-Lösung**

Es wurden die mit 10 kGy bestrahlten Aminosäure-Modell-Lösungen mit und ohne TRP-Zusatz und zusätzlich eine bestrahlte TRP-Lösung (5 kGy) (Abschnitt 4.1.4) einmal direkt und nach Anreicherung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether um den Faktor 20 auf die unbekannte Substanz mit der Retentionszeit 15,5 min (Phenomenex Aqua, isokratische Trennung mit 0,1% TFA/MeCN 85/15 (v/v)) untersucht (genaue Probenaufarbeitung s. Anhang 10.8.4.2).

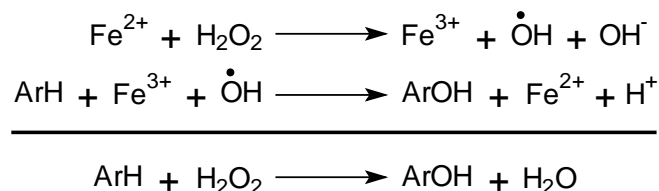
In den Chromatogrammen der direkt in die HPLC injizierten Modell-Lösungen war der Peak bei 15,5 min nicht nachweisbar. Die Chromatogramme der angereicherten Modell-Lösungen (s. Abbildung 6.14) zeigen jedoch ein anderes Bild. Sowohl im Chromatogramm der Aminosäure-Modell-Lösung mit TRP- als auch in der Aminosäure-Modell-Lösung ohne TRP-Zusatz war ein Peak mit der Retentionszeit von 15,5 min zu erkennen, der jedoch im Chromatogramm der bestrahlten TRP-Lösung nicht auftrat. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei der unbekannt Substanz um ein Aminosäure-Radiolyseprodukt handelt, das nicht aus der Aminosäure TRP entsteht.



**Abbildung 6.14** Chromatogramme von  $\gamma$ -bestrahlten Aminosäure-Modell-Lösungen (Phenomenex Aqua, Wasser/Essigsäure pH 3/MeCN 85/15 (v/v), FL 270/315 nm); rot: Aminosäure-Modell-Lösung + TRP (10 kGy), blau: Aminosäure-Modell-Lösung ohne TRP (10 kGy), grün: TRP-Lösung (5 kGy)

### Fenton-System

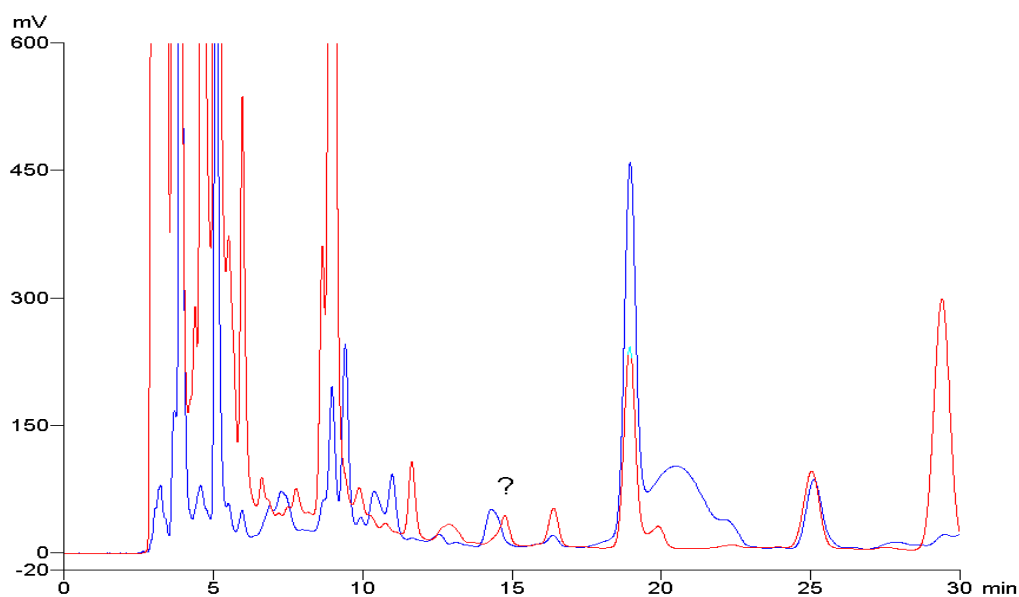
Das Fenton-Reagenz ist ein Gemisch aus Wasserstoffperoxid und Eisen(II)-Ionen, das in wässriger Lösung ein wirksames Oxidationsmittel für viele organische Substrate darstellt. Die Reaktion wurde von FENTON (1894) am Beispiel Weinsäure erstmals beobachtet. Nach WALLING (1975) und TZEDAKIS et al. (1989) kommt es bei der Fenton-Reaktion zur Bildung von Hydroxylradikalen, die bevorzugt mit aromatischen Substraten (Ar) reagieren (s. Abbildung 6.15). Untersuchungen von STADTMAN und BERLETT (1991) und MASKOS et al. (1992b) zeigten, dass aromatische Aminosäuren mit dem Fenton-Reagenz und bei  $\gamma$ -Bestrahlung zu den gleichen Oxidationsprodukten reagieren.



**Abbildung 6.15** Mechanismus der Fenton-Reaktion (TZEDAKIS et al., 1989; WALLING, 1975)

Da es sich bei der unbekannt Substanz mit der Retentionszeit 15,5 min (Phenomenex Aqua, isokratische Trennung mit 0,1% TFA/MeCN 85/15 (v/v)) um

eine stark fluoreszierende Substanz handelt, kommen als Precursor-Aminosäuren ebenfalls nur fluoreszierende oder zumindest UV-aktive Verbindungen in Betracht, wobei TRP ja bereits ausgeschlossen werden konnte. Es wurden daher verschiedene Gemische der aromatischen und besonders empfindlich auf  $\gamma$ -Strahlen reagierenden Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin, Histidin, Arginin und Methionin mit dem Fenton-System zur Simulation der Bestrahlung behandelt, durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether angereichert und anschließend mittels HPLC und FL-Detektion auf die unbekannte Substanz mit der Retentionszeit 15,5 min untersucht (genaue Probenaufarbeitung s. Anhang 10.8.4.2).



**Abbildung 6.16** Chromatogramme von Aminosäure-Lösungen, behandelt mit dem Fenton-System (Phenomenex Aqua, Wasser/Essigsäure pH 3/MeCN 85/15 (v/v), FL 270/315 nm); rot: TYR-Lösung, blau: PHE-Lösung

In allen Chromatogrammen der angereicherten Fenton-Systeme, die Tyrosin (TYR) und/oder Phenylalanin (PHE) enthielten, war ein Peak mit einer Retentionszeit von 15,5 min zu erkennen. In Abbildung 6.16 sind die Chromatogramme von TYR und PHE nach Behandlung mit dem Fenton-System dargestellt. Bei der unbekannt Substanz muss es sich folglich um ein Radiolyseprodukt handeln, das sowohl aus PHE als auch aus TYR entstehen kann.

### 6.4.1.2 Chromatographisches Verhalten

Das chromatographische Verhalten bei Elution mit verschiedenen pH-Werten gibt Auskunft darüber, ob es sich bei dem unbekanntem Radiolyseprodukt von TYR bzw. PHE um eine saure, basische, zwitterionische oder nichtionische Verbindung handelt. Entsprechend wurden alle Lebensmittel nach Bestrahlung im gefrorenen Zustand (10 kGy) aufgearbeitet (siehe Anhang 10.8.4.1). Die HPLC-Trennung erfolgte an einer C18 Aqua-Säule der Fa. Phenomenex bei den pH-Werten 3, 5 und 8. Als Modifier diente MeCN (15%).

Die Retentionszeiten der unbekanntem Substanz bei den verschiedenen pH-Werten sind in Tabelle 6.9 dargestellt. Mit höherem pH-Wert zeigt sich eine Verringerung der Retentionszeit. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der unbekanntem Verbindung um eine schwache Säure handelt, die bei pH 3 undissoziiert vorliegt und damit gut auf der RP-Säule retardiert wird. Bei höheren pH-Werten liegt die Substanz als Ion vor und wird auf der Säule schlechter zurückgehalten.

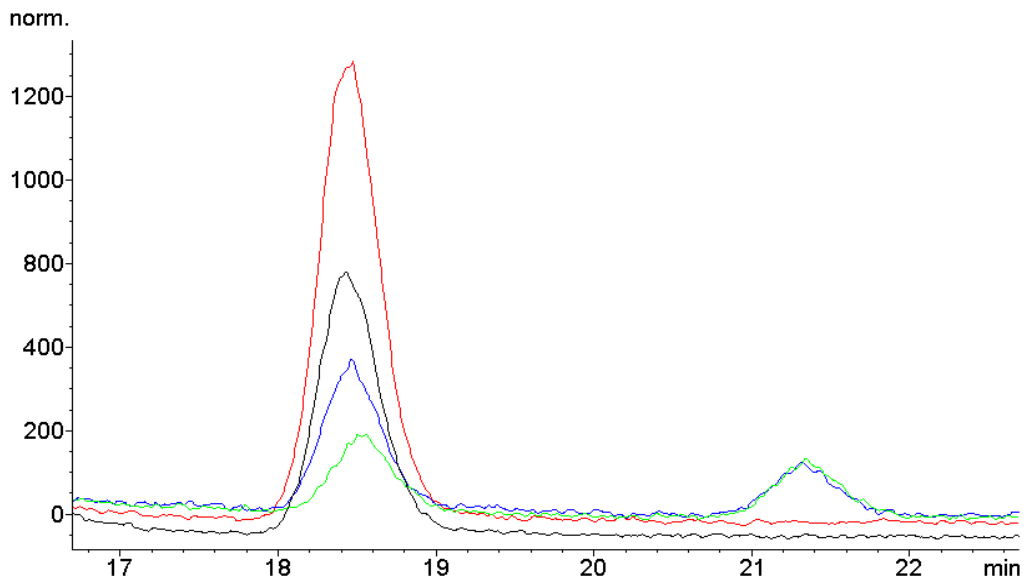
**Tabelle 6.9** Chromatographisches Verhalten der unbekanntem Substanz bei verschiedenen pH-Werten (Phenomenex Aqua, 15% MeCN)

Eluent	Retentionszeit (min)
Wasser, Essigsäure pH 3	15,5
0,1% TFA pH 3	15,5
Ammoniumformiat-Puffer 5 mMol, pH 5	9,5
Ammoniumacetat-Puffer 5 mMol, pH 8	6,0

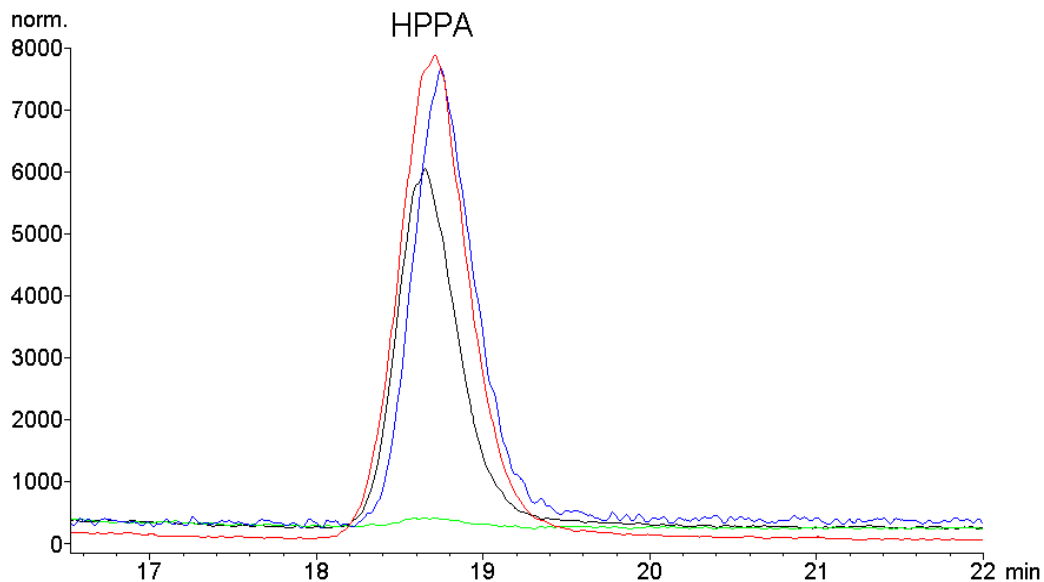
### 6.4.1.3 Identifizierung mittels HPLC-MS

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, dass die gesuchte Substanz ein Radiolyseprodukt der Aminosäuren TYR und PHE ist. Anhand des chromatographischen Verhaltens bei Elution mit verschiedenen pH-Werten konnte festgestellt werden, dass es sich bei der unbekanntem Verbindung um eine Säure handelt. Aufgrund dieser Erkenntnisse kommt als gesuchte Substanz das Desaminierungsprodukt von Tyrosin, 3-(4-Hydroxyphenyl-) propionsäure (HPPA) in Betracht. Die Identifizierung erfolgte mittels HPLC-MS nach Optimierung der Methode anhand eines HPPA-Standards (HPLC-MS-Bedingungen siehe Anhang 10.2.7). Die größte Empfindlichkeit wurde wie bei der Bestimmung der BA-Radiolyseprodukte mit einem Eluenten aus Wasser (mit Essigsäure auf pH 3 eingestellt) und Acetonitril als Modifier mit negativer Ionisierung erreicht. Das

Massenspektrum von HPPA bei einer Fragmentorspannung von 70 V ist in Anhang 10.8.4.3, Abbildung 10.5 dargestellt. Es ist nur das charakteristische Molekölion  $m/z$  165  $[M-H]^-$  zu erkennen. Eine Fragmentierung tritt nicht auf.



**Abbildung 6.17** Chromatogramme von Modell-Lösungen (Multospher C18, Wasser/Essigsäure pH 3/MeCN 87,5/12,5 (v/v), HPLC-MS, APCI negativ,  $m/z$  165  $[M-H]^-$ ); rot: AS-Modell-Lösung 10 kGy, blau: TYR-Lösung, behandelt mit dem Fenton-System, grün: PHE-Lösung, behandelt mit dem Fenton-System, schwarz: HPPA-Standard



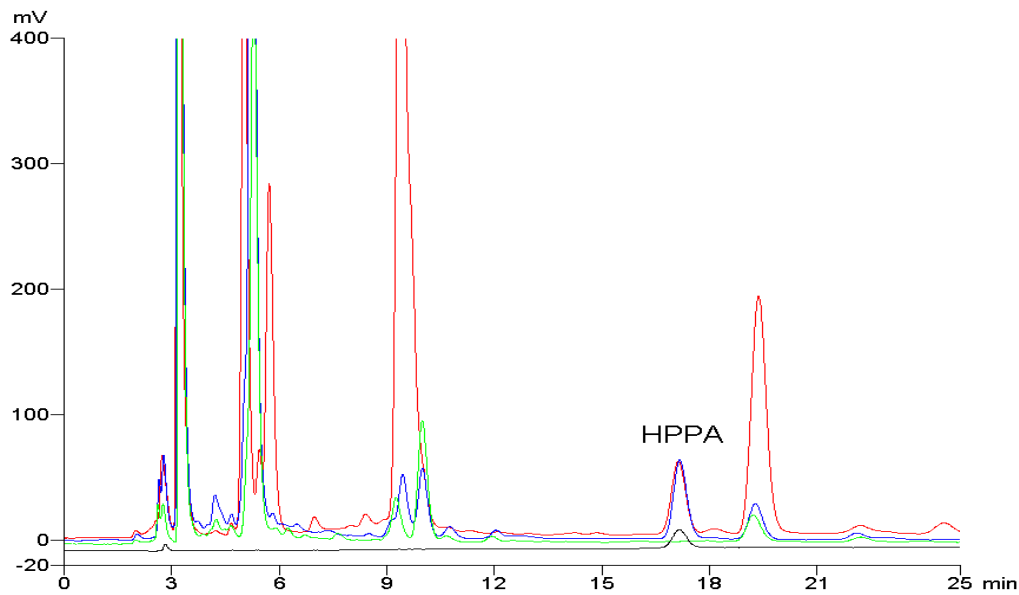
**Abbildung 6.18** Chromatogramme von Black Tiger Shrimps (Multospher C18, Wasser/Essigsäure pH 3/MeCN 87,5/12,5 (v/v), HPLC-MS, APCI negativ,  $m/z$  165  $[M-H]^-$ ); rot: BTS 10 kGy RT, blau: BTS 10 kGy -18 °C, grün: BTS unbestrahlt, schwarz: HPPA-Standard

Abbildung 6.17 zeigt die HPLC-MS-Chromatogramme der bestrahlten Aminosäure-Modell-Lösung (10 kGy) und der mit dem Fenton-System behandelten TYR- und PHE-Lösungen. Als Vergleich diente ein HPPA-Standard. In allen Modell-Lösungen war HPPA nachweisbar. Auch in allen angereicherten Probenextrakten war HPPA enthalten. Als Beispiele sind hier die HPLC-MS-Chromatogramme von mit 10 kGy bestrahlten und unbestrahlten Black Tiger Shrimps dargestellt (s. Abbildung 6.18). Alle angereicherten Probenextrakte von bei Raumtemperatur und im gefrorenen Zustand bestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger und Tiefsee Shrimps und Hühnerfleisch (s. Anhang 10.8.4.1) und alle Modell-Lösungen (s. Anhang 10.8.4.2) wurden mittels der optimierten HPLC-MS-Methode zur Bestimmung von HPPA (SIM-Modus  $m/z$  165  $[M-H]^-$ ) analysiert (HPLC-MS-Bedingungen s. Anhang 10.2.7).

#### **6.4.2 Bestimmung von HPPA in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen, Tiefsee Shrimps, Black Tiger Shrimps und Hühnerfleisch**

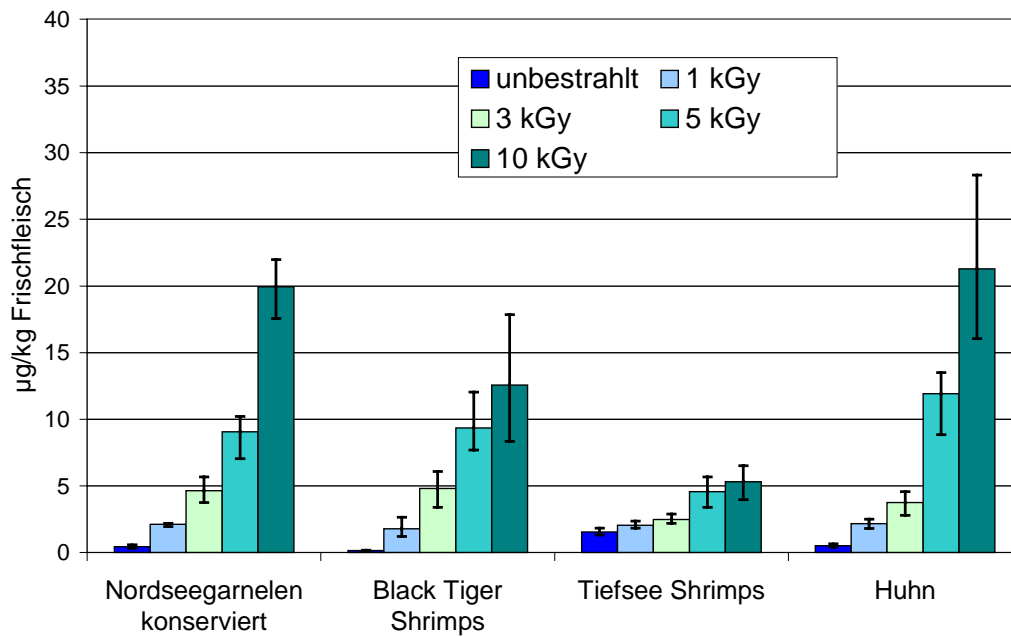
Zur Bestimmung von HPPA in unbestrahlten und bei Raumtemperatur oder im gefrorenen Zustand mit den Dosen 1, 3, 5 und 10 kGy bestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps, Tiefsee Shrimps und Hühnerfleisch wurde die HPLC-FL-Methode optimiert (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 10.2.7). Die Probenanreicherung um den Faktor 50 erfolgte mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether (genaue Probenaufarbeitung siehe Anhang 10.8.5.1). Als Beispiel sind in Abbildung 6.19 die Chromatogramme von bei Raumtemperatur und im gefrorenen Zustand mit 10 kGy bestrahlten Black Tiger Shrimps und einer unbestrahlten Kontrollprobe bei FL-Detektion (Ex/Em 276/310 nm) dargestellt. Die Wiederfindungsrate für HPPA wurde anhand von dotierten Black Tiger Shrimps bestimmt. Sie betrug ca. 59% bei einer Standardabweichung von ca. 4% (Einzelergebnisse siehe Anhang 10.8.5.1). Zur Absicherung der Ergebnisse erfolgte zusätzlich eine Abschätzung der Gehalte mittels HPLC-MS.

In den Abbildungen 6.20 - 6.23 sind die HPPA-Gehalte in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis dargestellt (Einzelergebnisse siehe Anhang 10.8.5.2). Bei den gefroren bestrahlten Proben wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt, während bei den bei Raumtemperatur bestrahlten Proben nur die konservierten Nordseegarnelen dreifach bestimmt wurden. Die Fehlerbalken geben die Spannweite an. Alle anderen bei Raumtemperatur bestrahlten Proben wurden nur einfach bestimmt.

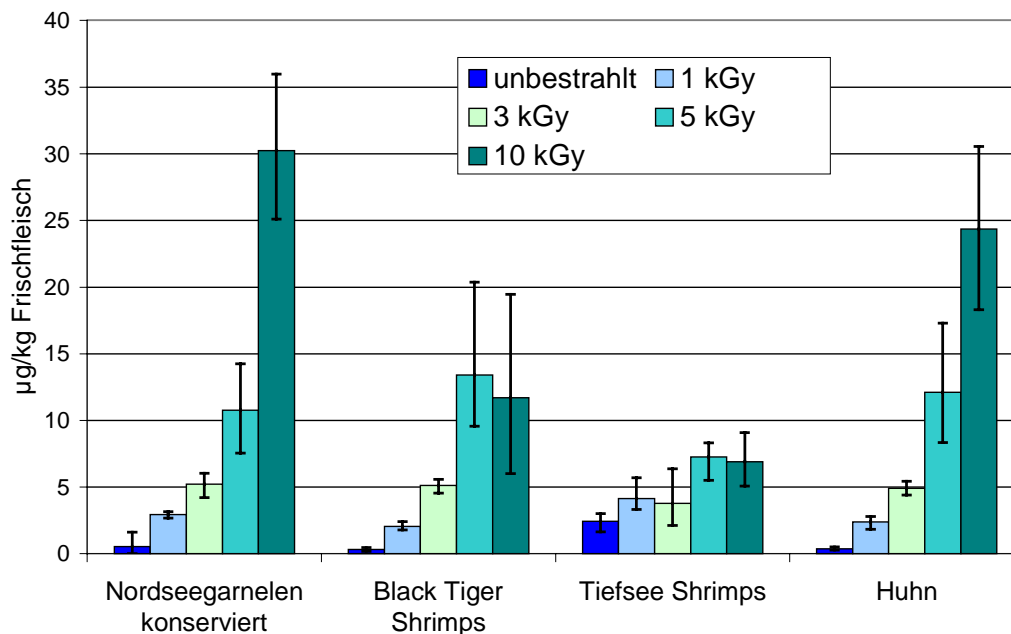


**Abbildung 6.19** Chromatogramme von Black Tiger Shrimps zur Bestimmung von HPPA (Multospher C18, Wasser/Essigsäure pH 3/MeCN 87,5/12,5 (v/v), FL 276/310 nm); rot: BTS 10 kGy RT, blau: BTS 10 kGy -18 °C, grün: BTS unbestrahlt, schwarz: HPPA-Standard

Ein Vergleich der Ergebnisse nach FL- und MS-Detektion zeigt annähernd gleich große Werte für alle untersuchten Lebensmittel bei beiden Bestrahlungstemperaturen. Die mittels MS-Detektion ermittelten Gehalte schwanken jedoch sehr viel stärker. Im Folgenden werden daher nur die Ergebnisse der FL-Detektion beschrieben. Die HPPA-Gehalte nehmen bei allen Lebensmitteln sowohl bei den bei Raumtemperatur als auch bei den gefroren bestrahlten Proben mit steigender Bestrahlungsdosis annähernd linear zu. Ungefähr gleich große Gehalte wurden in den im gefrorenen Zustand bestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps und im Hühnerfleisch bestimmt. Sie liegen zwischen 1,7 und 21,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Frischgewicht. Die in den gefroren bestrahlten Tiefsee Shrimps gemessenen HPPA-Gehalte sind dagegen mit 2,1 - 5,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Frischgewicht sehr viel niedriger. HPPA war auch in den unbestrahlten Kontrollproben mit Gehalten zwischen 0,1 und 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Frischgewicht in Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps und Hühnerfleisch nachweisbar. Höhere Blindwerte wurden mit 1,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Frischgewicht in den Tiefsee Shrimps nachgewiesen. In den bei Raumtemperatur bestrahlten Black Tiger und Tiefsee Shrimps und im Hühnerfleisch wurden annähernd gleich große HPPA-Gehalte wie in den gefroren bestrahlten Proben gemessen.

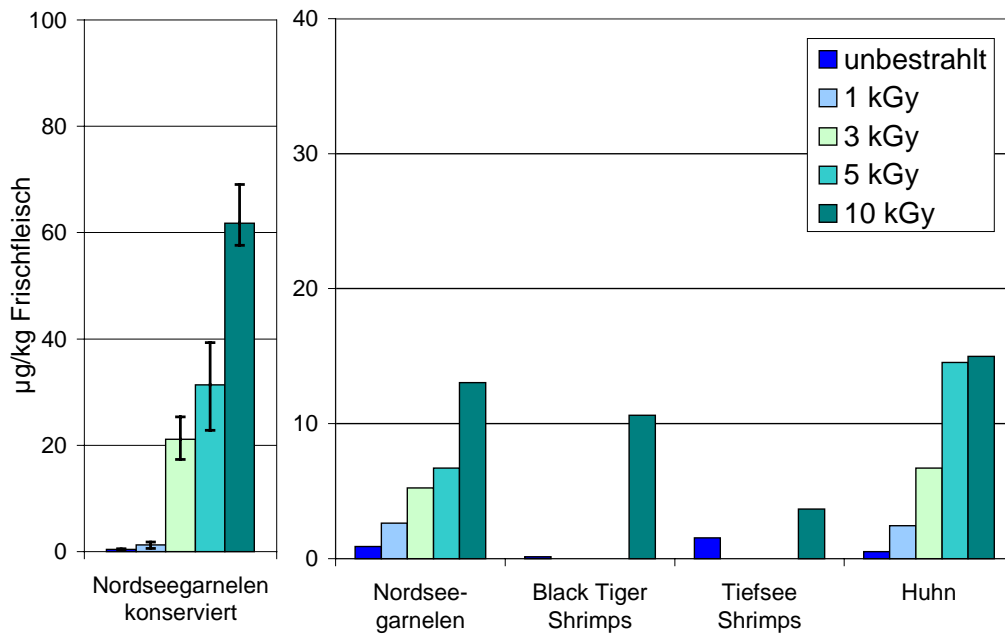


**Abbildung 6.20** HPPA-Gehalte in gefroren  $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln (FL-Detektion 276/310 nm) (Fehlerbalken = Spannweite)

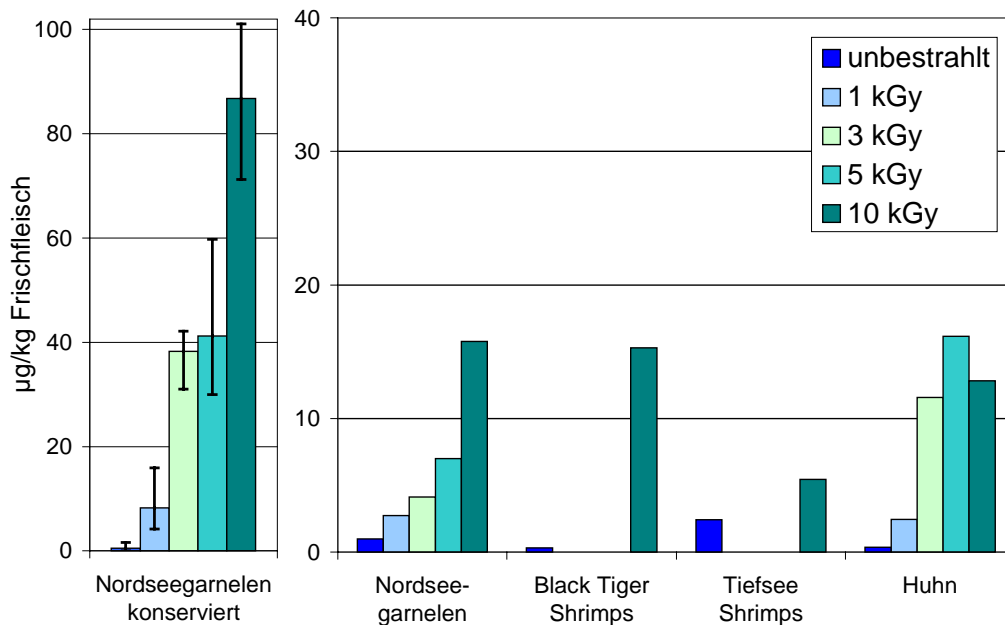


**Abbildung 6.21** HPPA-Gehalte in gefroren  $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln (MS-Detektion, APCI negativ,  $m/z$  165  $[M-H]^+$ ) (Fehlerbalken = Spannweite)





**Abbildung 6.22** HPPA-Gehalte in bei Raumtemperatur  $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln (FL-Detektion 276/310 nm) (Fehlerbalken = Spannweite)



**Abbildung 6.23** HPPA-Gehalte in bei Raumtemperatur  $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln (MS-Detektion, APCI negativ,  $m/z$  165  $[M-H]^-$ ) (Fehlerbalken = Spannweite)

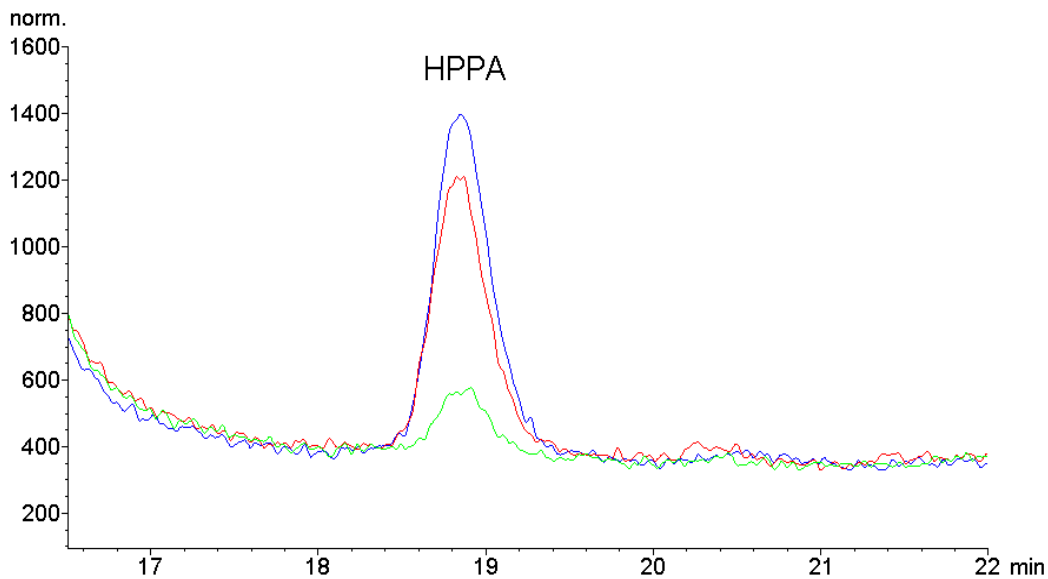
Eine Ausnahme bilden die konservierten Nordseegarnelen. Hier sind die HPPA-Gehalte in den bei Raumtemperatur bestrahlten Proben mit 1,6 - 61,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Frischgewicht ca. um den Faktor 3 größer als in den gefroren bestrahlten Proben. Dieser Effekt ist jedoch nicht für die nicht konservierten Nordseegarnelen festzustellen. Hier entsprechen die in bei Raumtemperatur bestrahlten Proben gemessenen HPPA-Gehalte mit 2,6 - 13,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Frischgewicht annähernd den HPPA-Gehalten der im gefrorenen Zustand bestrahlten konservierten Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps und des Hühnerfleisches. Eine Ursache hierfür könnte eine Peaküberlagerung mit Radiolyseprodukten der Benzoesäure sein, die nicht bei Bestrahlung im gefrorenen Zustand entstehen, sondern nur bei höheren Bestrahlungstemperaturen.

Signifikante Unterschiede ( $p=0,05$ ) zur unbestrahlten Kontrollprobe sind bei den gefroren bestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps und beim Hühnerfleisch bereits ab einer Bestrahlungsdosis von 1 kGy zu beobachten, während sich für die Tiefsee Shrimps aufgrund der hohen Blindwerte und der geringeren HPPA-Gehalte in den bestrahlten Proben signifikante Unterschiede erst ab einer Bestrahlungsdosis von 5 kGy feststellen ließen.

Für die bei Raumtemperatur bestrahlten Nordseegarnelen waren signifikante Unterschiede ( $p=0,05$ ) zur unbestrahlten Kontrollprobe auch bereits ab einer Bestrahlungsdosis von 1 kGy nachweisbar. Ein Einsatz von HPPA als Bestrahlungsmarker ist demnach für Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps und Hühnerfleisch möglich.

#### **6.4.3 HPPA in $\gamma$ -bestrahltem Eiklar**

Auf die Bestimmung von HPPA im Eiklar wurde verzichtet, da unter den optimierten HPLC-Bedingungen mit FL-Detektion (s. Anhang 10.2.7) bei der Retentionszeit von HPPA auch in den unbestrahlten Eiklar-Proben ein Peak eluierte, der ca. die Größe des HPPA-Peaks in den mit 10 kGy bestrahlten Black Tiger Shrimps aufwies und der sich bei Bestrahlung nicht veränderte. Bei der Analyse mittels HPLC-MS konnte jedoch festgestellt werden, dass es sich bei diesem Peak nicht um den HPPA-Blindwert im unbestrahlten Eiklar handelt (Abbildung 6.24). Es ist in der unbestrahlten Probe zwar ein geringer HPPA-Blindwert nachweisbar, die Konzentrationen in den bestrahlten Proben sind jedoch deutlich größer.



**Abbildung 6.24** Chromatogramme von Eiklar (Multospher C18, Wasser/Essigsäure pH 3/MeCN 87,5/12,5 (v/v), HPLC-MS, APCI negativ,  $m/z$  165  $[M-H]^-$ ); grün: unbestrahlt, blau: 10 kGy -18 °C, rot: 10 kGy RT

Die abgeschätzten HPPA-Gehalte sind in Tabelle 6.10 dargestellt. Der Blindwert liegt mit 0,53  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Eiklar in der Größenordnung der Blindwerte der anderen untersuchten Lebensmittel. Die in den mit 10 kGy bestrahlten Eiklar-Proben gemessenen HPPA-Gehalte sind mit 2,5 und 3,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Eiklar deutlich niedriger als die Gehalte in den anderen Lebensmitteln. Sie sind jedoch ca. um den Faktor 5 bis 7 größer als der Blindwert. Damit könnte auch für das Eiklar ein Bestrahlungsnachweis über HPPA als Markersubstanz möglich sein.

**Tabelle 6.10** Abschätzung des HPPA-Gehaltes in  $\gamma$ -bestrahltem Flüssig-Eiklar (HPLC-MS)

Probe	HPPA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Eiklar unbestrahlt	0,53
Eiklar 10 kGy -18 °C	2,53
Eiklar 10 kGy RT	3,94

## 6.5 Diskussion

### 6.5.1 Screening

Bei der Bestrahlung von proteinreichen Lebensmitteln, die insbesondere hohe Gehalte an freien Aminosäuren enthalten, werden als Hauptradiolyseprodukte polare, schwerflüchtige Abbauprodukte erwartet. Für die Analyse dieser Radiolyseprodukte stellte die HPLC das Analysenverfahren der Wahl dar. Um möglichst viele Radiolyseprodukte zu erfassen, musste zum einen bei der Elution ein großer Polaritätsbereich abgedeckt und zum anderen eine Vielzahl verschiedener Detektoren (UV, FL, ECD) verwendet werden. Durch den Chromatogramm-Vergleich von verschiedenen bestrahlten und unbestrahlten Proben sollten neue potenzielle Bestrahlungsmarker gefunden werden, die sowohl bei Bestrahlung im gefrorenen Zustand als auch bei Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis gebildet werden. Die Zuordnung der Substanzpeaks erfolgte durch Mustervergleich, wobei zur Unterstützung die Chromatogramme in Zeitfenster eingeteilt wurden. Innerhalb jedes Zeitfensters wurden nur die Peaks betrachtet, die im Vergleich zu einer unbestrahlten Probe ein mindestens um den Faktor 3 größeres Signal/Rausch-Verhältnis erkennen ließen. Dieses Verfahren zur Datenreduktion hat sich bei der Analyse verschiedener Herstellerchargen im Pharmaziebereich bewährt (WELSH et al., 1996).

Zunächst erfolgte das Screening auf polare Bestrahlungsmarker in Nordseegarnelen, Black Tiger und Tiefsee Shrimps, Hühnerfleisch und Eiklar. Es zeigte sich, dass es bei der Bestrahlung im gefrorenen Zustand kaum zu Veränderungen der Peakmuster kommt. Die Veränderungen der Peakhöhen waren zu gering, als dass Substanzen zu erkennen gewesen wären, die sich als potenzielle Marker eignen. Die Bestrahlung bei Raumtemperatur führte zu wesentlich größeren Veränderungen (Faktor 5 - 10). Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse von KRAJNIK et al. (1995), GARRISON (1981) und TAUB et al. (1978), die ebenfalls festgestellt haben, dass bei der Bestrahlung im gefrorenen Zustand aufgrund der eingeschränkten Mobilität der entstandenen Radikale kaum Reaktionen mit anderen Inhaltsstoffen auftreten.

Nur in den bei Raumtemperatur bestrahlten Nordseegarnelen konnten größere Mengen an polaren Radiolyseprodukten festgestellt werden. Die Identifizierung dieser Peaks mittels HPLC-MS und GC-MS konnte zeigen, dass es sich um 3- und

4-Hydroxybenzoesäure sowie um Phenol handelte, die bei der Radiolyse des zugesetzten Konservierungsstoffes Benzoesäure entstehen. Kommerziell erhältliche Nordseegarnelen werden direkt nach dem Fang zur Konservierung unter Zusatz von Natriumchlorid und Benzoesäure gekocht (HOVART et al., 1972). In bisherigen Untersuchungen konnten in bestrahlten Benzoesäurelösungen 2-, 3- und 4-Hydroxybenzoesäure, Phenol, Resorcin und Hydrochinon nachgewiesen werden (GROOTVELD und JAIN, 1989; ACHESON und HAZELWOOD, 1960). 2-Hydroxybenzoesäure (Salicylsäure) konnte ebenfalls mittels HPLC-MS identifiziert werden. Unter den gewählten chromatographischen Bedingungen eluiert die Salicylsäure jedoch erst nach 40 min und wurde daher nicht berücksichtigt. Resorcin und Hydrochinon waren unter den gewählten Bedingungen in den bestrahlten Nordseegarnelen nicht nachweisbar.

Weitere strahlungsinduzierte Peaks, die als Bestrahlungsmarker in Frage kommen, waren in den Chromatogrammen nicht zu erkennen. Die Radiolyseprodukte der Proteine und freien Aminosäuren entstehen in den im gefrorenen Zustand bestrahlten Produkten in so geringen Mengen, dass die angewendete Methode zur Erfassung nicht ausreichte. Daher musste zur Identifizierung weiterer Radiolyseprodukte ein Verfahren entwickelt werden, um eine selektive und schonende Anreicherung der Radiolyseprodukte zu erreichen. Als Methode der Wahl hat sich die Extraktion des sauren Extraktes mit Diethylether bewährt. Sie bietet den Vorteil, dass zwar Aminosäure-Radiolyseprodukte erfasst werden, aber nicht die Aminosäuren selbst. Diethylether lässt sich nach der Extraktion aufgrund des niedrigen Siedepunktes leicht entfernen, wodurch eine hohe Anreicherung der Radiolyseprodukte erfolgt (Faktor 50).

Das Screening auf potenzielle Bestrahlungsmarker in den gefroren und bei Raumtemperatur bestrahlten Produkten zeigte einen Peak, der in allen Proben identifiziert werden konnte. Mittels HPLC-MS konnte die Substanz als 3-(4-Hydroxyphenyl-)propionsäure (HPPA) identifiziert werden.

### **6.5.2 Bestimmung der BA-Radiolyseprodukte**

Zur Abschätzung der Bildungsraten wurden die Gehalte an 3- und 4-OH-BA sowie von Phenol mittels HPLC-ECD (1,15 V) bestimmt. Die Gehalte in gefroren bestrahlten Nordseegarnelen lagen im Vergleich zu bei Raumtemperatur bestrahlten

um etwa den Faktor 10 niedriger (s. Abschnitt 6.5.1). In allen unbestrahlten Proben waren Blindwerte vorhanden. In den gefroren bestrahlten Proben konnte für 3- und 4-Hydroxybenzoesäure ein signifikanter Unterschied zur unbestrahlten Probe ab einer Dosis von 1 bzw. 3 kGy festgestellt werden, für Phenol erst ab 5 kGy. In den bei Raumtemperatur bestrahlten Proben konnte für 4-OH-BA ein signifikanter Unterschied zur Blindprobe ab einer Dosis von 1 kGy ermittelt werden, für 3-OH-BA und Phenol erst ab 3 kGy. In den unbestrahlten Nordseegarnelen wurde der Precursor Benzoesäure mit einem Gehalt von 0,25% bestimmt. Daraus ergibt sich für bei Raumtemperatur bestrahlte Nordseegarnelen eine Bildungsrate für die Hydroxybenzoesäure von ca. 0,2%, für Phenol von ca. 0,04%. Für die gefroren bestrahlten Proben liegen diese Bildungsraten entsprechend um den Faktor 10 niedriger. Hohe Gehalte an Benzoesäure tragen ebenso wie die hohen Gehalte an freien Aminosäuren dazu bei, dass Minoraminosäuren wie TRP vor Oxidation geschützt werden und die Bildungsraten von deren Radiolyseprodukten entsprechend sinken.

Nordseegarnelen sind mikrobiell stark durch Verderbniserreger belastet. Ein Kochen direkt nach dem Fang auf dem Kutter ist somit zur Konservierung und weiterhin zur Farbgebung erforderlich. Unter den Bedingungen an Bord des Schiffes ist eine totale Entkeimung nicht gewährleistet. Zudem kommt es leicht zur Rekontamination mit Verderbniserregern durch Lagerung und Transport. Die Nordseegarnelen werden meistens in Billiglohnländern wie Polen oder Marokko geschält, bevor sie zur Weiterverarbeitung nach Deutschland gebracht werden. Dieser aufwendige Transport ist zur Zeit nur möglich, da die Nordseegarnelen zusätzlich zum Kochen mit Salz und Benzoesäure auf dem Schiff konserviert werden. Die Anwendung der Lebensmittelbestrahlung als alternatives Konservierungsverfahren verbietet aber eine vorherige chemische Konservierung. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Bestrahlung nach dem Schälen wesentlich effektiver ist, um pathogene Keime und Verderbniserreger zu minimieren (EHLERMANN und MÜNZNER, 1976). Ohne chemische Konservierung wären die bisherigen Transportwege nur unter kostenintensiver Kühlung möglich und ein vorzeitiger Verderb könnte nicht ausgeschlossen werden.

Derzeit ist die Bestrahlung von Nordseegarnelen noch nicht einheitlich in Europa geregelt. Eine chemische Konservierung darf aber generell nicht in Verbindung mit der Bestrahlung angewendet werden. Die entwickelte Methode zur Bestimmung der

Benzoessäure-Radiolyseprodukte ermöglicht die Überwachung dieser gesetzlichen Vorgaben, da mit Benzoessäure konservierte und anschließend bestrahlte Nordseegarnelen anhand der Gehalte an BA-Radiolyseprodukten ab einer Bestrahlungsdosis von 3 kGy identifiziert werden können.

### 6.5.3 Identifizierung von HPPA

Die Identifizierung von HPPA gelang mittels verschiedener Modellversuche. Zunächst wurden die bestrahlten Aminosäure-Lösungen mit und ohne TRP-Zusatz und auch eine bestrahlte TRP-Lösung untersucht. Durch diese Versuche konnte TRP als Precursor ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde das Fenton-System auf verschiedene Gemische von aromatischen und besonders empfindlich gegenüber  $\gamma$ -Strahlen reagierenden Aminosäuren angewendet (s. Abschnitt 6.4.1.1). Hierbei zeigte sich, dass HPPA sowohl aus PHE als auch aus TYR bei Bestrahlung gebildet wird. Die letzte Identifizierung von HPPA gelang mittels HPLC-MS im negativen Modus über das Molekülion (chemische Ionisation, SIM 165 m/z [M-H]<sup>-</sup>).

STADTMAN (1993) erklärte die Bildung der Carbonsäure mit der gleichen Anzahl an C-Atomen wie die entsprechende Aminosäure anhand der reduktiven Desaminierung durch das bei der Radiolyse des Wassers entstehende solvatisierte Elektron. Diese Reaktion tritt vorwiegend bei einfachen aliphatischen Aminosäuren auf und ist bei aromatischen Aminosäuren zu vernachlässigen (GARRISON, 1968). STULIK et al. (1986) konnten jedoch 3-Indolpropionsäure, das entsprechende Desaminierungsprodukt von TRP, in mit 20 - 60 kGy bestrahlten TRP-Lösungen nachweisen. Wenn die HPPA-Bildung nur über die reduktive Desaminierung ablaufen würde, müsste sich eine deutliche Temperaturabhängigkeit der Bildungsrate zeigen, da der G-Wert des solvatisierten Elektrons ebenso wie der G-Wert des Hydroxylradikals bei Temperaturniedrigung stark absinkt (s. Tabelle 6.11). Die eigenen Untersuchungen haben aber gezeigt, dass die HPPA-Gehalte in den gefroren und bei Raumtemperatur bestrahlten Proben annähernd gleich waren. Daher ist es möglich, dass noch andere Reaktionsmechanismen zur Bildung von HPPA beitragen. Das Wasserstoffatom weist keine temperaturabhängigen G-Werte auf, da es aufgrund seiner geringeren Größe durch die erhöhte Viskosität im Eis in seiner Mobilität nicht behindert wird (TAUB et al., 1978).

Die Ergebnisse des Versuchs mit dem Fenton-Reagenz deuten ebenfalls darauf hin, dass bei der Bildung von HPPA auch noch andere Mechanismen als die Reaktion mit

dem solvatisierten Elektron eine Rolle spielen. Als eigentlich reagierendes Agens in dem Fenton-System wird das Hydroxylradikal angenommen, das durch Reaktion von Eisen(II)-Ionen mit Wasserstoffperoxid entsteht (KAUR und HALLIWELL, 1994; TZEDAKIS et al., 1989; WALLING, 1975). Außerdem werden Eisenoxoverbindungen als reagierende Spezies diskutiert (WINK et al., 1994). HPPA konnte jedoch auch aus PHE und TYR über das Fenton-System gebildet werden. Von anderen Arbeitsgruppen (KAUR und HALLIWELL, 1994; STADTMAN und BERLETT, 1991), die das Fenton-System einsetzten, um die Oxidation von Aminosäuren zu untersuchen, wurde über diese Art von Desaminierungsreaktionen nicht berichtet. Sowohl der bei der Bildung von HPPA durch  $\gamma$ -Bestrahlung als auch der bei der Fentonreaktion ablaufende Mechanismus wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

**Tabelle 6.11** G-Werte der primären Radikale in wässrigen Systemen (TAUB et al., 1978)

System		$e^-_{aq}$	H•	HO•
Flüssiges Wasser (20°C)		2,7	0,6	2,7
Kristallines Eis (0°C)		0,3	0,7	1,0

#### 6.5.4 Bestimmung von HPPA

Die Anreicherungsmethode zur Identifizierung von HPPA wurde für die Bestimmung beibehalten. Die Extraktion von HPPA im Säuren mit Diethylether ist auch von anderen Autoren zur Extraktion von HPPA aus Mikroorganismenkulturen beschrieben worden (LAMBERT und MOSS, 1980; ELSDEN et al., 1976). Die Bestimmung erfolgte mittels HPLC-FL und HPLC-MS. Es stellte sich heraus, dass die HPLC-FL-Methode reproduzierbarere Ergebnisse erzielen konnte, da bei der HPLC-MS-Methode mit chemischer Ionisation eine starke day-to-day-Varianz auftrat. HPPA zeigt eine sehr gute Fluoreszenz und wurde daher auch als Substrat für fluorimetrische Immunoassays verwendet (TUUMINEN et al., 1991). Die Bestimmung konnte daher sehr empfindlich mittels FL-Detektion durchgeführt werden. Aufgrund der sehr aufwendigen Extraktion wurde lediglich eine Wiederfindungsrate von 60% erreicht. Die Werte waren jedoch sehr gut reproduzierbar, was an der geringen Standardabweichung von 3,8% zu erkennen ist. Es konnte mittels FL-Detektion eine Nachweisgrenze von 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Frischfleisch erreicht werden. Die Nachweisgrenze mit MS-Detektion war nur geringfügig schlechter und betrug 0,25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Frischfleisch.



Die HPPA-Gehalte in den bestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps sowie im bestrahlten Hühnerfleisch lagen sowohl in den bei Raumtemperatur als auch in den gefroren bestrahlten Proben zwischen 2 und 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Dabei waren die Gehalte in den bei Raumtemperatur bestrahlten Proben geringfügig niedriger. Eine Ausnahme bildeten die bei Raumtemperatur bestrahlten konservierten Nordseegarnelen, bei denen die HPPA-Gehalte zwischen 2 und 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$  lagen. Diese Gehalte konnten mittels HPLC-MS bestätigt werden. Da diese hohen Gehalte bei bestrahlten nicht-konservierten Nordseegarnelen nicht auftraten, kann man vermuten, dass es sich hierbei um eine Koelution mit einem Radiolyseprodukt der Benzoesäure handelt. Diese Möglichkeit muss auch deshalb in Betracht gezogen werden, da bei der HPLC-MS-Methode nur das Molekölion von HPPA erfasst werden konnte. Dieses Massenfragment ( $m/z$  165) war vor allem in den bestrahlten konservierten Nordseegarnelen auch in anderen Bereichen der Chromatogramme nachweisbar.

In den Tiefsee Shrimps wurden sehr viel geringere HPPA-Gehalte zwischen 2 und 5,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  gefunden. In allen Proben wurden auch Blindwerte zwischen 0,2 und 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nachgewiesen. Lediglich für die Tiefsee Shrimps wurden höhere Werte von 1,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in unbestrahlten Proben nachgewiesen. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Proben für Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps und Hühnerfleisch bereits ab einer Bestrahlungsdosis von 1 kGy, während für die Tiefsee Shrimps signifikante Unterschiede zu unbestrahlten Proben erst ab einer Dosis von 5 kGy feststellbar waren.

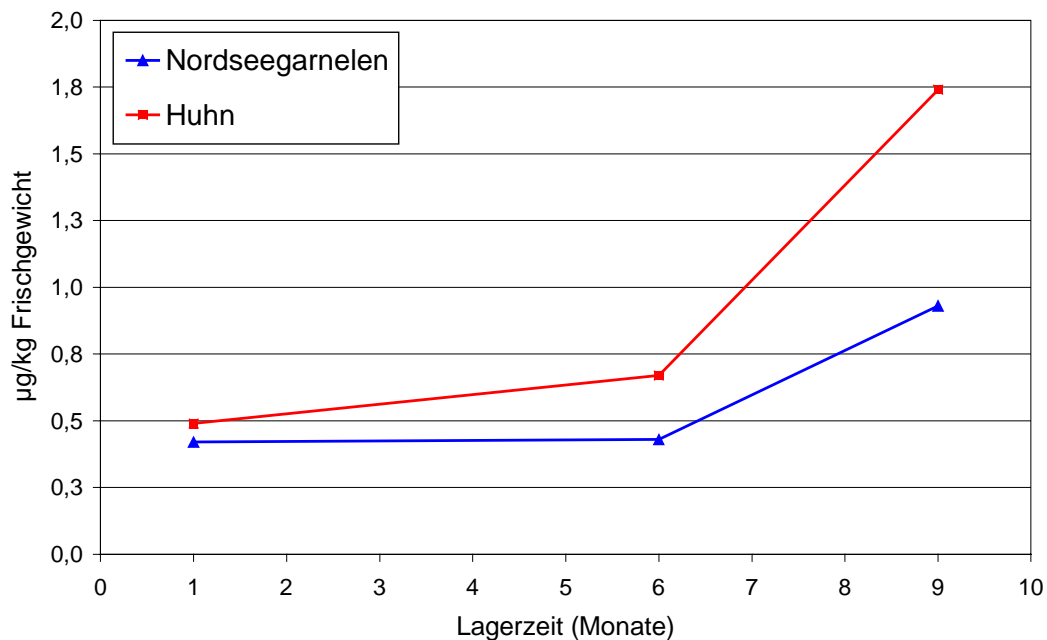
Für das Eiklar wurden die Gehalte nur über die HPLC-MS-Methode abgeschätzt, da bei der FL-Detektion eine Koelution auftrat. Auch hier traten in unbestrahlten Proben geringe Blindwerte im Bereich von 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  auf. In gefroren und bei Raumtemperatur mit einer Dosis von 10 kGy bestrahlten Eiklar-Proben konnten HPPA-Gehalte von 2,5 bzw. 3,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nachgewiesen werden. Diese Gehalte sind damit ebenfalls deutlich geringer als in Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps und Hühnerfleisch.

### **6.5.5 Eignung von HPPA als Bestrahlungsmarker**

Ein Verfahren, das routinemäßig als Bestrahlungsnachweis in eiweißreichen Lebensmitteln eingesetzt werden soll, muss eine Reihe von Anforderungen erfüllen (DELINCEE, 1993).

Die strahleninduzierten Veränderungen dürfen im unbestrahlten Lebensmittel nicht vorhanden sein bzw. müssen ausreichend verschieden vom unbestrahlten sein. Wie oben beschrieben konnte HPPA in allen unbestrahlten Proben in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. HPPA ist ein natürliches Metabolisierungsprodukt verschiedener Mikroorganismen, die auch in Garnelen vorkommen wie z.B. *Proteus vulgaris*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium* spp. und *Mycobacterium* spp. (LAMBERT und MOSS, 1980; ELSDEN et al., 1976; TANAKA, 1968; TOMODA und TANAKA, 1968), und wurde ebenfalls im menschlichen Urin nachgewiesen (GOODWIN et al., 1994; CURTIUS und METTLER, 1976). Insbesondere *Proteus vulgaris* gehört zu den Verderbniserregern, die bei Garnelen auftreten (IAEA, 2000). Durch die Bestrahlung kommt es zu einem Anstieg der HPPA-Gehalte, so dass trotz der geringen Blindwerte bereits ab einer Dosis von 1 kGy eine signifikante Unterscheidung vom Blindwert möglich ist.

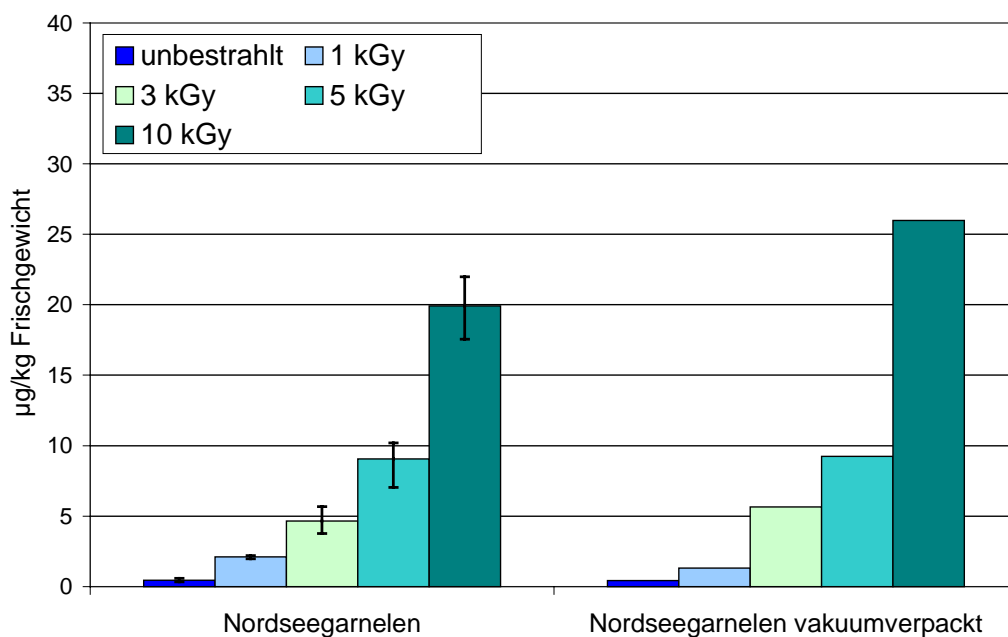
Die strahleninduzierten Veränderungen dürfen nicht ebenfalls bei der Lebensmittelverarbeitung und Lagerung entstehen bzw. abgebaut werden. In der Abbildung 6.25 sind die HPPA-Gehalte in unbestrahlten Nordseegarnelen und Hühnerfleisch in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer dargestellt.



**Abbildung 6.25** Veränderung der HPPA-Gehalte in unbestrahlten Proben während der Lagerung

Es ist zu erkennen, dass es erst ab einer Lagerungsdauer von 6 Monaten zu einem deutlichen Anstieg der HPPA-Gehalte kommt. Dieser Anstieg ist jedoch nicht relevant, da diese Proben bereits deutliche Anzeichen von Verderb aufwiesen. Bei kommerziell erworbenen Black Tiger und Tiefsee Shrimps war über die gesamte Haltbarkeitsdauer keine Veränderung der ursprünglichen HPPA-Gehalte feststellbar.

Die Messgröße soll unempfindlich oder genau vorhersehbar bei unterschiedlichen Bedingungen reagieren. Diese Bedingungen können z.B. die Bestrahlungstemperatur, die Dosisrate oder die Verpackungsatmosphäre sein. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten nur geringe Unterschiede der HPPA-Gehalte bei gefroren oder bei Raumtemperatur bestrahlten Proben. Bezüglich des Einflusses der Verpackungsatmosphäre wurden nur Versuche an vakuumverpackten Nordseegarnelen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.26 dargestellt. Es zeigen sich annähernd die gleichen Gehalte, so dass ein signifikanter Einfluss der Verpackungsatmosphäre auf den HPPA-Gehalt unwahrscheinlich ist.



**Abbildung 6.26** HPPA-Gehalt in gefroren bestrahlten Nordseegarnelen in Abhängigkeit von der Verpackungsatmosphäre (Fehlerbalken = Spannweite)

Die strahleninduzierten Veränderungen müssen über den gesamten Dosisbereich und in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis messbar sein. Die Bestrahlung von Garnelen und Hühnerfleisch ist in vielen Ländern mit Dosen von 2 - 7 kGy zugelassen (IAEA, 2000; WHO, 1998). Für diese Produkte konnte ein linearer

Anstieg des HPPA-Gehaltes bis zu einer Bestrahlungsdosis von 10 kGy festgestellt werden.

#### **6.5.6 Ausblick**

HPPA leitet sich ebenso vom PHE ab wie das o-TYR, das in der Literatur als potenzieller Bestrahlungsmarker für eiweißreiche Lebensmittel diskutiert wird. Obwohl die o-TYR-Gehalte in bei Raumtemperatur bestrahlten Nordseegarnelen etwa 200fach höher liegen als die HPPA-Gehalte und somit besser für einen Nachweis geeignet wären, ist die Bildung stark von der Bestrahlungstemperatur abhängig (HUNKOVA et al., 2000; KRAJNIK et al., 1995). Da HPPA unabhängig von der Bestrahlungstemperatur gebildet wird, ist ein Bestrahlungsnachweis auch bei gefroren bestrahlten Lebensmitteln möglich. Um die HPPA-Methode routinemäßig einsetzen zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig. Damit ein von identischen Vergleichsproben unabhängiges Nachweisverfahren validiert werden kann, ist eine Warenkorbuntersuchung nötig, die die Grundgehalte an HPPA in verschiedenen eiweißreichen Lebensmitteln unter Berücksichtigung natürlicher Schwankungen erfasst. Die Einflussfaktoren Bestrahlungstemperatur, Verpackungsatmosphäre und Dosisrate sollten an weiteren Lebensmitteln näher untersucht werden. Um eine Erhöhung der Wiederfindungsraten zu erreichen, sollte das Extraktionsverfahren optimiert werden.

## 7 Sensorische und physikalische Untersuchungen an $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen

Ebenso wie bei anderen Konservierungsverfahren wie z.B. Erhitzen, Trocknen oder Salzen kommt es bei der  $\gamma$ -Bestrahlung zu Veränderungen im Lebensmittel, die sich in der sensorischen Qualität des Produktes bemerkbar machen. Die bisherigen Untersuchungen beschränkten sich häufig auf die Feststellung von Fehlgerüchen (Off-flavour) von bestrahlten Lebensmitteln (DIEHL, 1995; ITO et al., 1993; EHLERMANN und MÜNZNER, 1976; SUDARMADJI und URBAIN, 1972). Insbesondere für Nordseegarnelen ist die Art des auftretenden Fehlgeruchs bisher noch nicht ausreichend beschrieben worden. Die eigenen Bestrahlungsversuche haben gezeigt, dass sowohl Nordseegarnelen und andere Shrimps-Arten als auch Hühnerfleisch und Eiklar nach der Bestrahlung deutliche Aroma- und Farbabweichungen zeigten. Um die sensorischen Veränderungen in  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen zu untersuchen, wurde zunächst ein Versuchsplan unter folgenden Gesichtspunkten erstellt:

- Kann ein ungeschulter Verbraucher bestrahlte Nordseegarnelen von unbestrahlten anhand des Aussehens, des Geruchs, des Geschmacks sowie der Textur unterscheiden?
- Lassen sich diese Parameter im Rahmen einer Profilprüfung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis beschreiben und quantifizieren?

Diese Untersuchungen sollten neue Erkenntnisse zur Beurteilung der Verbraucherakzeptanz für  $\gamma$ -bestrahlte Lebensmittel liefern. Weiterhin ergab sich die Möglichkeit, durch die Anwendung physikalischer Messverfahren einfache Parameter zur Qualitätskontrolle und Qualitätssicherung festzulegen und mit den Ergebnissen der sensorischen Beurteilung durch ein geschultes Panel zu vergleichen. In bisherigen Publikationen haben sich die instrumentelle Texturprofilanalyse (TPA) und Farbmessung zur Beschreibung der Qualität von Fisch und Fischerzeugnissen als geeignet erwiesen (SCHUBRING, 2000, 1998). Diese physikalischen Methoden wurden bereits zur Untersuchung von bestrahltem Rind- und Schweinefleisch eingesetzt (GIROUX et al., 2001; MONTGOMERY et al., 2000). Garnelen wurden mit diesen Methoden bisher nicht untersucht.

## 7.1 Methoden

### 7.1.1 Sensorische Methoden

#### **Erweiterte Dreiecksprüfung (DIN ISO 4120)**

Die Dreiecksprüfung ist ein Verfahren, mit dem geringe Unterschiede zwischen zwei Proben festgestellt werden können. Sie eignet sich daher zur Anwendung für den „Verbraucher-Test“ mit einem ungeschulten Panel, durch den untersucht werden soll, ob Verbraucher sensorische Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Nordseegarnelen erkennen können. Im Gegensatz zur Einfachen Dreiecksprüfung erfolgt bei der Erweiterten Dreiecksprüfung neben der objektiven Feststellung des Unterschieds zwischen zwei Prüfmustern auch eine subjektive Entscheidung. Den Prüfern liegen jeweils Probensätze mit drei verschlüsselten Proben vor, von denen immer zwei Proben identisch („Doppelprobe“) und eine abweichend („Einzelprobe“) ist. Zuerst erfolgt die Ermittlung der abweichenden Probe, im nächsten Schritt wird nach der Art der Unterschiede und nach der Bevorzugung gefragt.

Für den „Verbraucher-Test“ wurden den Probanden insgesamt sechs Probensätze mit verschiedenen Kombinationen von bestrahlten und unbestrahlten Proben (s. Abschnitt 7.2.1 Tabelle 7.1) dargereicht. Für die Versuche wurden nur gefrorene Nordseegarnelen verwendet. Der Einsatz als Einzel- oder Doppelprobe erfolgte willkürlich. Die Proben (jeweils ca. 5 Nordseegarnelen) wurden in mit drei Zufallszahlen beschrifteten weißen Kunststoffschalen dargereicht. Als Neutralisationsmittel standen Wasser und Knäckebrot zur Verfügung. Im ersten Schritt sollte anhand von Aussehen/Farbe, Geruch, Geschmack und Textur die abweichende Probe bestimmt werden. Anschließend sollte eine Beschreibung und Begründung für die Bevorzugung von Einzel- oder Doppelprobe erfolgen. Dazu lagen den Probanden Prüfformulare vor. An den Untersuchungen nahmen 12 Testpersonen teil.

#### **Profilprüfung (E-DIN 10967-1; ISO 11035)**

Die Profilprüfung dient zur Identifizierung, Beschreibung und Quantifizierung von sensorischen Eigenschaften eines Lebensmittels und eignet sich daher zur Untersuchung der sensorischen Veränderungen hinsichtlich Aussehen/Farbe,

Geruch, Geschmack und Textur in  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen. Für die Durchführung von Profilprüfungen ist eine intensive Schulung des Panels notwendig. Um statistisch auswertbare Ergebnisse zu erzielen, müssen die Prüfer mit den Attributen für das zu untersuchende Lebensmittel vertraut werden und in der Lage sein, diese zu quantifizieren. Für die Beschreibung der Intensität der Attribute wird eine Skale von 0 (Merkmal nicht erkennbar) über 1 (Merkmal gerade eben erkennbar), 2 (Merkmal schwach erkennbar), 3 (Merkmal gut erkennbar), 4 (Merkmal stark erkennbar) bis 5 (Merkmal dominierend) verwendet.

An der Profilprüfung nahmen 12 Prüfpersonen teil. Die Vorbereitung umfasste die Sammlung von sensorischen Begriffen, mit denen Nordseegarnelen charakterisiert werden können und die anschließende Reduzierung auf die Hauptattribute. Dazu wurden frische, gefrorene und bestrahlte Proben verkostet. Die Beschreibung der Intensität dieser Merkmale wurde anhand von bekannten Proben (unbestrahlte gefrorene Nordseegarnelen, mit 5 kGy bestrahlte gefrorene Nordseegarnelen) geschult. Anschließend erfolgte die Profilprüfung an unbestrahlten und gefroren oder bei Raumtemperatur mit 1 - 10 kGy bestrahlten Nordseegarnelen. Die Proben (jeweils ca. 5 Nordseegarnelen) wurden den Prüfern einzeln in mit drei Zufallszahlen beschrifteten weißen Kunststoffschalen in willkürlicher Reihenfolge dargereicht. Als Neutralisationsmittel standen Wasser und Knäckebrot zu Verfügung. Für die Bestimmung der Intensitäten der festgelegten Parameter für Aussehen/Farbe, Geruch, Geschmack und Textur anhand der Skale von 0 - 5 lagen den Prüfern entsprechende Prüfformulare vor.

### **7.1.2 Texturprofilanalyse und Bestimmung der Warner-Bratzler-Scherkraft**

Die instrumentelle Texturprofilanalyse (TPA) sowie die Messung der Warner-Bratzler-Scherkraft stellen physikalisch-instrumentelle Messverfahren dar, um die Kompressions- und Scherkräfte nachzuahmen, denen ein Lebensmittel beim Kauen im Mund unterworfen ist. Beide Messungen wurden an dem Texturanalyser TA.XT 2/25 (Fa. Stable Micro Systems, Godalming, UK) durchgeführt.

Bei der TPA erfolgt die Kompression einer definierten Probe mit Hilfe eines Stempels. Dieser ist von seinen Dimensionen so ausgelegt, dass Scherkräfte bei der Kompression vermieden werden. Die benötigte Kraft N wird grafisch gegen die

Messzeit  $t$  aufgetragen. Eine spezielle Software des Geräteherstellers berechnet aus dem erhaltenen Diagramm verschiedene Parameter wie Härte, Elastizität, Kohäsion, Kaubarkeit, Adhäsion. Bei Einhaltung der identischen Versuchsbedingungen lassen sich so Aussagen zur Textur verschiedener Lebensmittel ableiten. Die TPA lässt jedoch keine absoluten Aussagen zu. Letztlich ist es nötig, die Messparameter der TPA für ein zu prüfendes Lebensmittel individuell so festzulegen, dass die resultierenden Messwerte eine größtmögliche Korrelation mit den Resultaten einer sensorischen Profilprüfung mit einem geschulten Panel liefern.

Während bei der TPA durch die Wahl eines großflächigen Stempels Scherkräfte vermieden werden sollten, wird zur Messung der Warner-Bratzler-Scherkraft ein Stempel mit einer geringen, aber stumpfen Oberfläche gewählt. Die stumpfe Oberfläche dient der Vermeidung von Schneidvorgängen an der Probe während der Messung. Die Probe wird längs in das Gerät eingespannt und das Gerät misst die Kraft, die zur Zerteilung der Probe nötig ist. Analog zur TPA wird aus dem Kraft-Zeit-Diagramm rechnerisch ein Wert für die Warner-Bratzler-Scherkraft ermittelt.

### 7.1.3 Farbmessung

Das CIE- $L^*a^*b^*$ -System (DIN 5033, DIN 6174) ist ein dem subjektiven Farbempfinden angepasstes dreidimensionales Farbsystem (Abbildung 7.1).

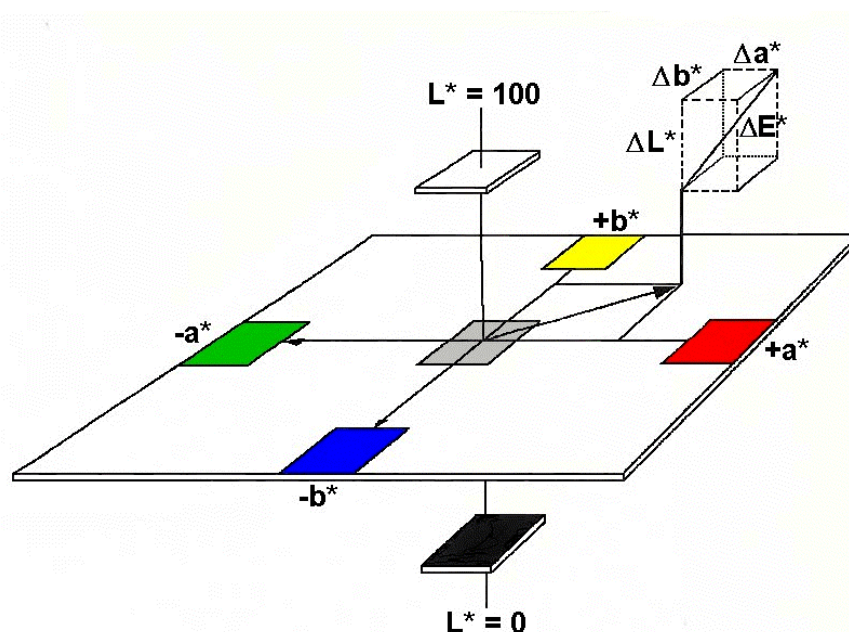


Abbildung 7.1 CIE- $L^*a^*b^*$ -System



---

Die  $L^*$ -Achse gibt die Helligkeit einer Farbe an. Die  $L^*$ -Werte sind grundsätzlich positiv und liegen zwischen 0 für schwarz und 100 für weiß. Die  $a^*$ -Achse gibt den rot-grün-Anteil und die  $b^*$ -Achse den gelb-blau-Anteil einer Farbe an. Rote Farbtöne besitzen positive  $a^*$ -Werte, grüne Farbtöne entsprechend negative  $a^*$ -Werte. Gelbe Farbtöne weisen positive  $b^*$ -Werte und blaue Farbtöne negative  $b^*$ -Werte auf. Die instrumentelle Bestimmung der CIE- $L^*a^*b^*$ -Werte erfolgte mit einem Chroma-Meter CR 300 (Fa. Minolta).

## 7.2 Ergebnisse

### 7.2.1 Verbraucher-Test (Erweiterter Dreiecks-Test)

Die Ergebnisse der Dreiecksprüfungen sind in Tabelle 7.1 dargestellt. Beim Vergleich der unbestrahlten zu einer mit 1 kGy bestrahlten Probe konnten 7 von 12 Probanden die abweichende Probe richtig erkennen. Um einen signifikanten Unterschied zwischen den Proben zu belegen, hätten mindestens 8 Probanden die abweichende Probe erkennen müssen. Es liegt daher nahe, dass mit einem größeren Panel ein signifikanter Unterschied zwischen einer unbestrahlten und einer mit 1 kGy bestrahlten Probe hätte nachgewiesen werden können. Gleiches gilt für den Vergleich der unbestrahlten Probe mit der nächst höheren Bestrahlungsstufe (3 kGy). Auch hier haben 7 von 12 Probanden die abweichende Probe richtig erkannt. Erst bei einer Bestrahlungsdosis von 5 kGy ist ein signifikanter Unterschied zur unbestrahlten Probe nachweisbar. Dieser Unterschied ist bei der mit 10 kGy bestrahlten Probe sogar sehr hoch signifikant (11 von 12 richtig erkannte abweichende Proben). Unterschiede zwischen den verschiedenen Bestrahlungsstufen (1 und 3 kGy bzw. 3 und 5 kGy) konnten von dem Panel nicht festgestellt werden. Hier erkannten nur jeweils 5 Probanden die abweichende Probe.

Bei der Frage nach der Bevorzugung ergibt sich ein anderes Bild. Erst im Vergleich der unbestrahlten zu einer mit 10 kGy bestrahlten Probe konnte eine signifikante Bevorzugung der unbestrahlten Probe festgestellt werden. Bei den anderen Bestrahlungsstufen wurde die jeweils unbestrahlte Probe nicht signifikant bevorzugt. Allerdings hat ein Großteil der Probanden, der die abweichende Probe im Dreieckstest richtig erkannte, auch die unbestrahlte Probe bevorzugt. Beim Vergleich der unbestrahlten zur 3 kGy bestrahlten Probe bevorzugten alle 7 Probanden die unbestrahlte Probe. Beim Vergleich unbestrahlt/5 kGy bevorzugten 6 von 8 Probanden die unbestrahlte Probe. Ein anderes Ergebnis zeigte der Vergleich der unbestrahlten zur 1 kGy bestrahlten Probe. Obwohl 7 von 12 Probanden die abweichende Probe richtig erkannten, wurde die bestrahlte Probe von 6 Testpersonen bevorzugt.

**Tabelle 7.1** Ergebnisse des Verbraucher-Tests (Erweiterter Dreiecks-Test)

Einzelprobe	Doppelprobe	Einzelprobe erkannt		Bevorzugung			
		Anzahl	Sign.	Anzahl	Sign.	Anzahl	Sign.
unbestrahlt	1 kGy	7		1		6	
1 kGy	3 kGy	5		4		1	
3 kGy	unbestrahlt	7		0		7	
3 kGy	5 kGy	5		4		1	
unbestrahlt	5 kGy	8	*	6		2	
10 kGy	unbestrahlt	11	***	0		11	*

\* = signifikant (p=95%), \*\*\* = sehr hoch signifikant (p=99,9%)

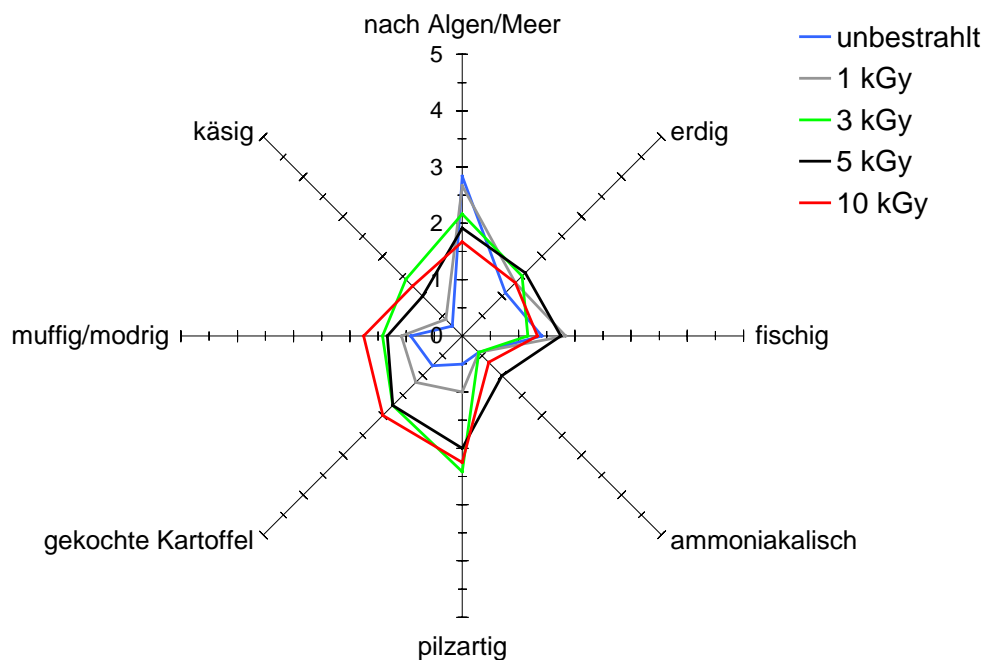
## 7.2.2 Profilprüfung

### 7.2.2.1 Profilprüfung Geruch

In Abbildung 7.2 sind die Geruchsprofile von unbestrahlten und im gefrorenen Zustand mit den Dosen 1, 3, 5 und 10 kGy bestrahlten Nordseegarnelen dargestellt (Einzelergebnisse siehe Anhang 10.9.1). Es ist zunächst festzustellen, dass die ermittelten Geruchseindrücke nicht besonders stark ausgeprägt sind. Auf einer Skale von 0 (nicht erkennbar) bis 5 (dominant) liegen alle Mittelwerte zwischen 0 und 3 (gut erkennbar). Anhand der Spiderweb-Diagramme der verschiedenen Bestrahlungsstufen können auch geringe Veränderungen im Aromaprofil erkannt werden.

Die Panelteilnehmer haben bei der Profilprüfung der unbestrahlten Nordseegarnelen festgestellt, dass der Geruch „nach Algen/Meer“ gut erkennbar ist. Die Attribute „erdig“, „fischig“ und „muffig/modrig“ sind gerade eben erkennbar. Andere Merkmale sind bei den unbestrahlten Nordseegarnelen nicht wahrzunehmen. Bei den mit 1 kGy bestrahlten Nordseegarnelen zeigt sich ein sehr ähnliches Aromaprofil im Vergleich zur unbestrahlten Probe. Bei den Geruchseindrücken „nach Algen/Meer“, „erdig“, „fischig“ und „muffig/modrig“ sind kaum Unterschiede feststellbar. Im Vergleich zur unbestrahlten Probe sind hier aber zusätzlich die Merkmale „pilzartig“ und „gekochte Kartoffel“ gerade eben erkennbar. Die mit den Bestrahlungsdosen 3, 5 und 10 kGy bestrahlten Nordseegarnelen weisen sehr ähnliche Geruchsprofile auf, die sich deutlich von den Geruchsprofilen der unbestrahlten und der mit 1 kGy bestrahlten Probe unterscheiden. Vor allem die Attribute „pilzartig“ und „gekochte Kartoffel“

nehmen stark zu, während der Geruchseindruck „nach Algen/Meer“ deutlich mit steigender Bestrahlungsdosis abnimmt. Weiterhin ist eine Zunahme der Merkmale „muffig/modrig“ und „käsig“ festzustellen. Bei den mit 5 und 10 kGy bestrahlten Nordseegarnelen ist zusätzlich ein Geruch nach Ammoniak erkennbar. Die Attribute „erdig“ und „fischig“ verändern sich nicht mit der Bestrahlungsdosis.

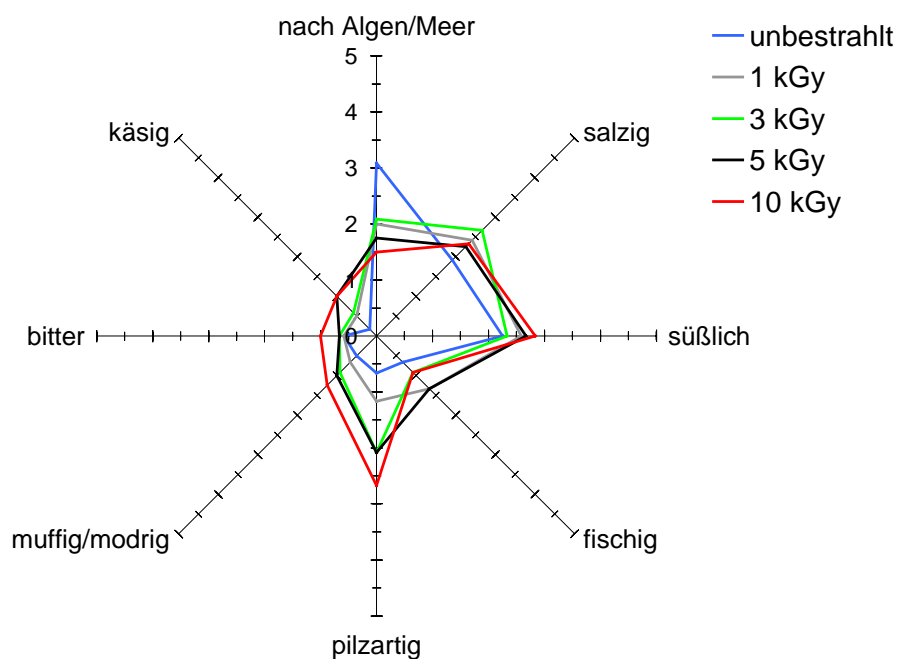


**Abbildung 7.2** Geruchsprofile der im gefrorenen Zustand bestrahlten Nordseegarnelen

### 7.2.2.2 Profilprüfung Geschmack

Abbildung 7.3 zeigt die Geschmacksprofile von unbestrahlten und im gefrorenen Zustand mit den Dosen 1, 3, 5 und 10 kGy bestrahlten Nordseegarnelen (Einzelergebnisse siehe Anhang 10.9.1). Neben den Geschmacksattributen „salzig“, „süßlich“ und „bitter“ wurden zur Beschreibung des Geschmacksprofils auch die Attribute „nach Algen/Meer“, „fischig“, „pilzartig“, „muffig/modrig“ und „käsig“ ausgesucht. Letztere wurden bereits zur Beschreibung des Geruchsprofils verwendet und entsprechen der retronasalen Wahrnehmung beim Verzehr der Nordseegarnelen. Die ermittelten Geschmackseindrücke sind ebenfalls nicht besonders stark ausgeprägt. Wie bei den Geruchsprofilen liegen alle Mittelwerte auf einer Skale von 0 (nicht erkennbar) bis 5 (dominant) zwischen 0 und 3 (gut erkennbar). Das Geruchsprofil der unbestrahlten Probe wird hauptsächlich durch den Geschmack „nach Algen/Meer“ (gut erkennbar) bestimmt. Die Attribute „salzig“ und „süßlich“ sind schwach erkennbar. Andere Merkmale wurden von den Prüfpersonen

bei den unbestrahlten Nordseegarnelen nicht festgestellt. Anders als bei den Geruchseindrücken wurden hier schon ab einer Bestrahlungsdosis von 1 kGy deutliche Unterschiede im Geschmacksprofil zur unbestrahlten Probe erkannt. Dies zeigt sich vor allem bei dem in der unbestrahlten Probe gut erkennbaren Geschmack „nach Algen/Meer“, der bereits in der mit 1 kGy bestrahlten Probe nur noch schwach erkennbar ist. Dadurch erscheinen die Attribute „salzig“ und „süßlich“ in der bestrahlten Probe etwas stärker ausgeprägt. Zusätzlich sind ab 1 kGy die Merkmale „pilzartig“ und „fischig“ gerade eben erkennbar. Mit steigender Bestrahlungsdosis nimmt wie bereits bei den Geruchsprofilen beschrieben der Geschmackseindruck „pilzartig“ stark zu (gut erkennbar bei einer Bestrahlungsdosis von 10 kGy). Weiterhin sind bei den mit 3 - 10 kGy bestrahlten Proben die Merkmale „muffig/modrig“, „fischig“ und „käsig“ gerade eben erkennbar. Bei der mit 10 kGy bestrahlten Probe wurde von den Prüfpersonen auch das Attribut „bitter“ wahrgenommen.

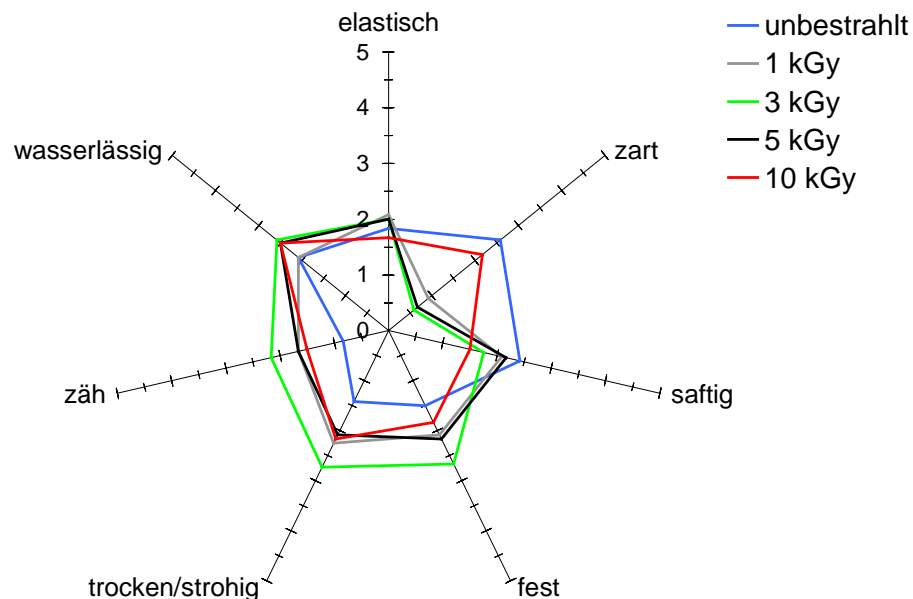


**Abbildung 7.3** Geschmacksprofile der im gefrorenen Zustand bestrahlten Nordseegarnelen

### 7.2.2.3 Profilprüfung Textur

Die Texturprofile der unbestrahlten und im gefrorenen Zustand mit 1 - 10 kGy bestrahlten Nordseegarnelen sind in Abbildung 7.4 dargestellt (Einzelergebnisse siehe Anhang 10.9.1). Bereits bei einer Bestrahlungsdosis von 1 kGy kommt es zu deutlichen Texturveränderungen. Während die unbestrahlten Nordseegarnelen eine gut erkennbare Zartheit und Saftigkeit aufwiesen, zeichneten sich die bestrahlten

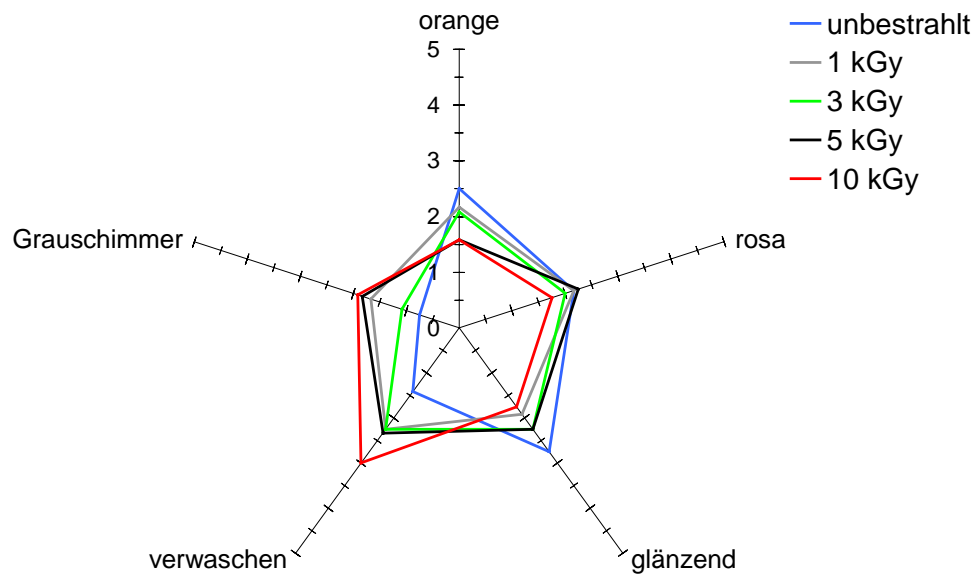
Proben durch eine Zunahme der Merkmale „fest“, „zäh“ und „trocken/strohig“ aus. Auffällig ist, dass bis zu einer Dosis von 5 kGy die Zartheit stark abnimmt, bei der mit 10 kGy bestrahlten Probe aber wieder ein deutlicher Anstieg der Zartheit feststellbar ist. Diese erneute Zunahme kann durch die starken Strukturzerstörungen bei hohen Bestrahlungsdosen erklärt werden. Die Attribute „elastisch“ und „wasserlässig“ zeigen nur minimale Veränderungen bei den bestrahlten Proben.



**Abbildung 7.4** Texturprofile der im gefrorenen Zustand bestrahlten Nordseegarnelen

#### 7.2.2.4 Profilprüfung Aussehen/Farbe

Abbildung 7.5 zeigt die Veränderungen des Aussehens und der Farbe der Nordseegarnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis (Einzelergebnisse siehe Anhang 10.9.1). Die typische Farbe unbestrahlter Nordseegarnelen kann durch die Attribute „orange“ und „rosa“ beschrieben werden. Mit zunehmender Bestrahlungsdosis ist eine Abnahme der Farbintensität für beide Attribute feststellbar, wobei diese Abnahme für das Merkmal „orange“ stärker ausgeprägt ist. Die unbestrahlten Proben zeichneten sich durch eine glänzende Oberfläche aus. Durch die Bestrahlung kommt es zu einer Veränderung des Aussehens, die durch eine Zunahme der Attribute „Grauschimmer“ und „verwaschen“ gekennzeichnet ist.



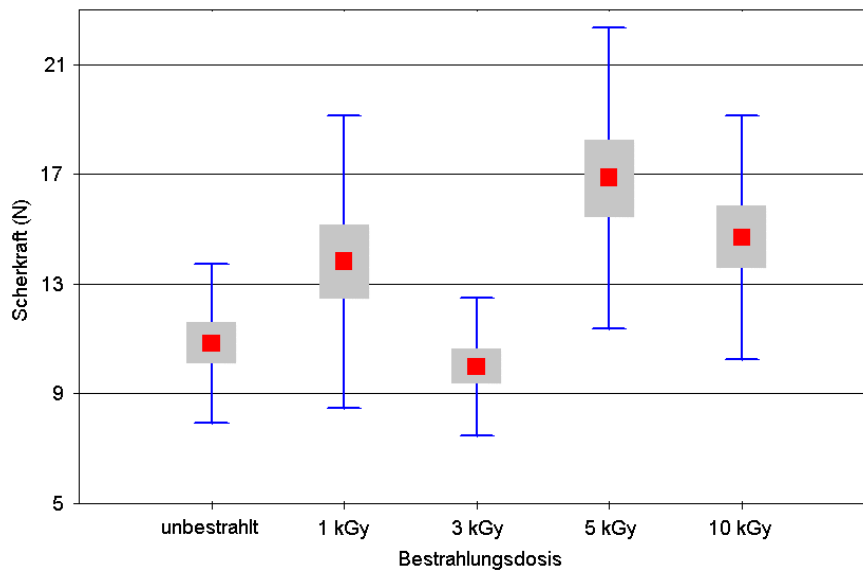
**Abbildung 7.5** Aussehen und Farbe der im gefrorenen Zustand bestrahlten Nordseegarnelen

### 7.2.3 Texturprofilanalyse und Bestimmung der Warner-Bratzler-Scherkraft

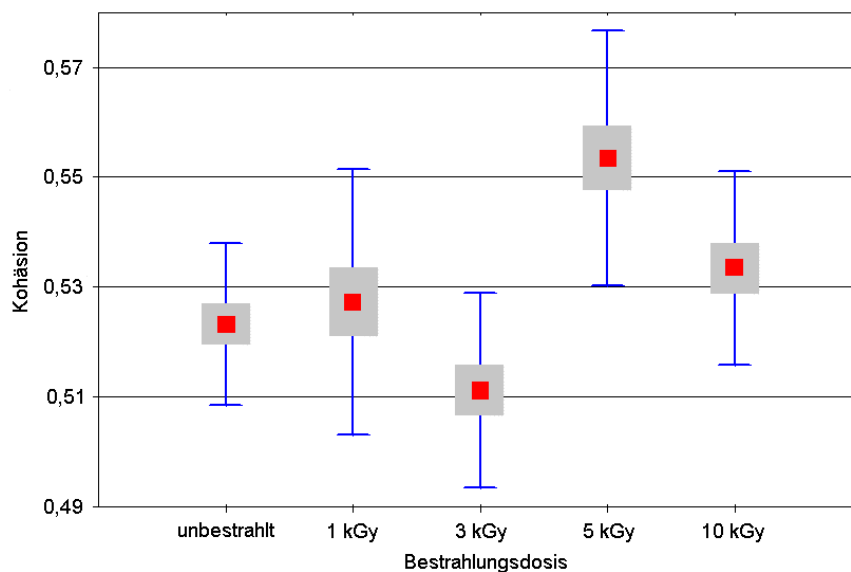
Abbildung 7.6 zeigt die Scherfestigkeit (Warner-Bratzler-Scherkraft) der Nordseegarnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Für die einzelnen Bestrahlungsstufen sind jeweils der Mittelwert, der Median und der Range dargestellt ( $n=15$ ). Aufgrund der hohen Standardabweichungen lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Bestrahlungsstufen feststellen. Tendenziell lässt sich aus der Grafik erkennen, dass bis zu einer Bestrahlungsstufe von 5 kGy die Kraft, die zum Scheren der Proben nötig ist, zunimmt (Ausnahme Bestrahlungsstufe 3 kGy). Bei der Bestrahlungsdosis 10 kGy kommt es wiederum zu einem leichten Abfall der aufzuwendenden Kraft. Dieser Verlauf korreliert mit der sensorisch festgestellten Abnahme der Zartheit bis zu einer Dosis von 5 kGy und der erneuten Zunahme bei 10 kGy.

Abbildung 7.7 zeigt die Ergebnisse der Kohäsionsmessung im Rahmen der durchgeführten TPA. Die Messungen lieferten analoge Ergebnisse im Vergleich zur Bestimmung der Warner-Bratzler-Scherkraft, obwohl es sich um zwei unterschiedliche Messmethoden handelt. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Bestrahlungsdosen festgestellt werden. Die

Messwerte zeigen ebenfalls eine gewisse Korrelation mit den Ergebnissen der sensorischen Prüfung der Zartheit.



**Abbildung 7.6** Scherfestigkeit von Nordseegarnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis



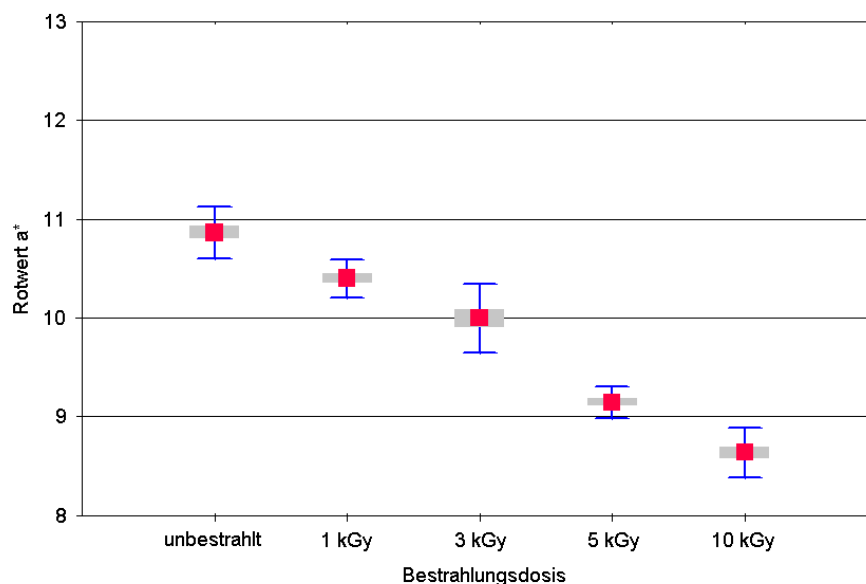
**Abbildung 7.7** Kohäsion von Nordseegarnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Die anderen mit der TPA bestimmten Parameter Härte, Kaubarkeit, Elastizität und Spannkraft lassen dagegen unabhängig von der Bestrahlungsdosis keine Texturbeeinflussung erkennen. Auf eine Darstellung der Ergebnisse wird daher verzichtet.



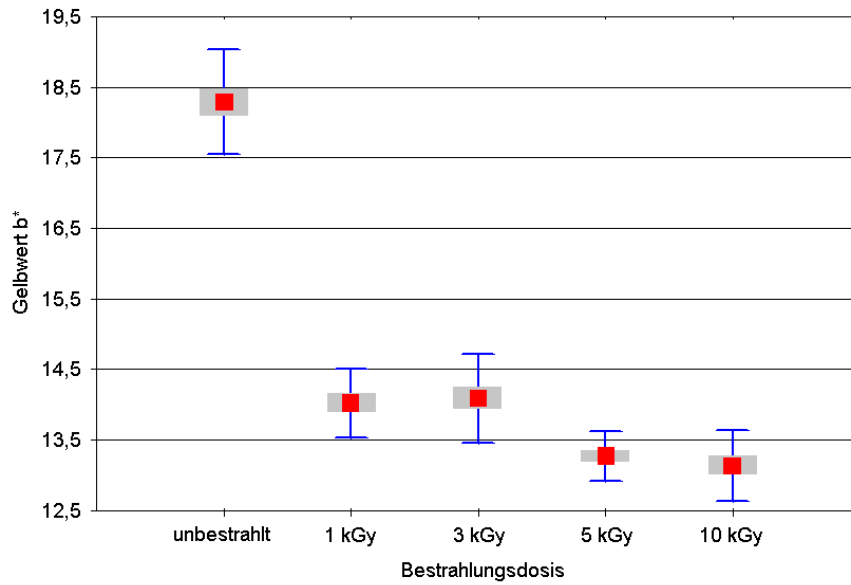
### 7.2.4 Farbmessung

Abbildung 7.8 zeigt die Ergebnisse der Messung des Rotwertes  $a^*$  von Nordseegarnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Für die verschiedenen Bestrahlungsstufen sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung dargestellt ( $n=10$ ). Es zeigt sich eine lineare Abnahme des Rotwertes in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Die statistische Auswertung dieser Ergebnisse zeigt signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Bestrahlungsstufen ( $p=0,95$ ). Dieses Ergebnis korreliert mit den Resultaten der Profilprüfung für die Parameter „rosa“ und „orange“.



**Abbildung 7.8** Rotwerte  $a^*$  von Nordseegarnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Abbildung 7.9 zeigt die Ergebnisse der Messung des Gelbwertes  $b^*$  von Nordseegarnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Im Gegensatz zum Rotwert zeigen sich hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bestrahlungsstufen 1, 3, 5 und 10 kGy. Lediglich zur unbestrahlten Probe zeigt sich ein hoch signifikanter Unterschied, der jedoch in einer Messung mit bei Raumtemperatur bestrahlten Nordseegarnelen nicht reproduziert werden konnte. Es handelt sich vermutlich um eine zufällige Abweichung dieser vermessenen unbestrahlten Charge. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bestrahlung den Gelbwert nicht signifikant beeinflusst.



**Abbildung 7.9** Gelbwert  $b^*$  von Nordseegarnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

## **7.3 Diskussion**

Die  $\gamma$ -Bestrahlung von Lebensmitteln hat zum Ziel, die Haltbarkeit dieser Produkte zu verlängern sowie das mikrobielle Risiko zu minimieren. Gleichzeitig darf die Behandlung aber nicht zu starken sensorischen Veränderungen des Produktes führen, die die Akzeptanz beim Verbraucher verringern. Der Verbraucher entscheidet sich für den Kauf eines Produktes aufgrund dessen sensorischer Eigenschaften Aussehen, Geruch, Geschmack und Textur. Inwiefern sich die Lebensmittelbestrahlung als alternatives Konservierungsverfahren durchsetzen kann, ist vor allem davon abhängig, ob der Verbraucher sensorische Veränderungen an einem bestrahlten Produkt feststellen kann, die seine Kaufentscheidung unter Umständen negativ beeinflussen.

Die in der Literatur beschriebenen sensorischen Untersuchungen an bestrahlten Produkten wurden unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen durchgeführt. Die Bestrahlungstemperatur stellt einen wesentlichen Einflussfaktor dar. Darüber hinaus beeinflussen weitere Faktoren wie z.B. Art und Vorbehandlung des Probenmaterials (Kochen, chemische Konservierung), die Verpackungsatmosphäre (Luft, Schutzgas, Vakuum) sowie die Qualität und Größe des Sensorikpanels die erzielten Resultate (GIROUX et al., 2001; JO et al., 2001; MONTGOMERY et al., 2000; POOLE et al., 1994; EHLERMANN und MÜNZNER, 1976). Für die Durchführung der sensorischen Untersuchungen wurden handelsübliche, ungeschälte Nordseegarnelen verwendet, die nach dem Schälen in PE-Beuteln verpackt und bei -18 °C tiefgefroren wurden. Während der Bestrahlung wurden die Proben mit Eis gekühlt. Hierdurch konnte gewährleistet werden, dass die Proben während der Bestrahlung gefroren blieben. Für die sensorische Untersuchung wurde ein Panel verwendet, das aus 12 Teilnehmern bestand.

### **7.3.1 Verbrauchertest**

Im Rahmen eines Verbrauchertests sollte zunächst untersucht werden, ob ein ungeschulter Verbraucher Unterschiede zwischen im gefrorenen Zustand bestrahlten und unbestrahlten Nordseegarnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis feststellen kann und welche Probe bevorzugt wird. Für die Prüfung wurde ein Erweiterter Dreieckstest nach DIN ISO 4120 durchgeführt.

Ein signifikanter Unterschied zwischen gefroren bestrahlten und unbestrahlten Nordseegarnelen wurde von den Testpersonen ab einer Bestrahlungsdosis von 5 kGy festgestellt. In der Literatur werden verschiedene sensorische Untersuchungen an gefroren, gekühlt oder bei Raumtemperatur bestrahlten Shrimps beschrieben. Im gekühlten Zustand oder bei Raumtemperatur bestrahlte Proben zeigen schon bei niedrigen Dosen sensorische Abweichungen im Vergleich zu gefroren bestrahlten Proben. ITO et al. (1993) führten sensorische Untersuchungen an 12 verschiedenen Shrimps-Arten durch (6 Panelteilnehmer). Sie beschränkten sich auf die Feststellung eines auftretenden Fehlgeruchs, ohne diesen genauer zu beschreiben. Bei den gefroren bestrahlten Shrimps waren signifikante Veränderungen ab einer Dosis von 5 kGy feststellbar. Wurden die Shrimps bei Raumtemperatur bestrahlt, zeigte sich bereits ab einer Dosis von 2,5 kGy ein signifikanter Unterschied. Analoge Ergebnisse erzielten POOLE et al. (1994), SUDARMADJI und URBAIN (1972) und KUMTA et al. (1970) bei der Bestrahlung von Shrimps (*Penaeus* spp.) im gekühlten Zustand. Die bestrahlten Proben wiesen ab einer Bestrahlungsdosis von 2,5 kGy einen signifikanten Off-flavour auf. EHLERMANN und MÜNZNER (1976) haben Nordseegarnelen im gekühlten Zustand mit einer Dosis von 1 - 2 kGy bestrahlt. Die sensorische Untersuchung zeigte, dass direkt nach der Bestrahlung die unbestrahlten Proben (konserviert mit Benzoesäure) auf einer hedonischen Skale höher bewertet wurden. Nach einer dreiwöchigen Lagerung unter Kühlung nahm die Qualität der unbestrahlten Nordseegarnelen stark ab, während die bestrahlten Proben nahezu den gleichen Wert wie zu Beginn des Lagerversuches erreichten. Die Sensorik-Panel bestanden bei diesen Untersuchungen aus zuvor geschulten Teilnehmern, die auch geringe Abweichungen reproduzierbar feststellen können. Der eigene Versuch wurde aber bewusst mit ungeschulten Probanden durchgeführt, um zu ermitteln, ob ein sensorisch ungeschulter Verbraucher signifikante Unterschiede zwischen unbestrahlten und bestrahlten Nordseegarnelen feststellen kann. Bei diesen Untersuchungen hat die Panelgröße einen entscheidenden Einfluss auf die Signifikanz des Ergebnisses. Bei einer Panelgröße von 12 Personen müssen 8 von 12 (66,67%) der Probanden die abweichende Probe richtig erkennen. Beim Vergleich der unbestrahlten Probe mit den mit 1 und 3 kGy bestrahlten Proben haben jeweils 7 von 12 (58,3%) Personen die abweichende Probe erkannt. Erst bei einer Bestrahlungsdosis von 5 kGy wurde ein signifikanter Unterschied zur unbestrahlten Probe festgestellt (8 von 12 Personen). Ein Großteil der ungeschulten Probanden

konnte demnach bereits zwischen der unbestrahlten und der mit 1 kGy bestrahlten Probe einen Unterschied wahrnehmen. Bei einer Panelgröße von 20 Personen wäre dieser Anteil von 58,3% richtig erkannter Proben bereits signifikant. Im Gegensatz hierzu konnten die Probanden zwischen den verschiedenen Bestrahlungsstufen keine signifikanten Unterschiede feststellen, wobei lediglich 5 von 12 Probanden (41,7%) die abweichende Probe richtig erkannten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass bereits niedrige Bestrahlungsdosen zu wahrnehmbaren Aromaveränderungen führen, die aber erst ab einer Dosis von 5 kGy zu statistisch signifikanten Ergebnissen führen.

Im Rahmen der Erweiterten Dreiecksprüfung wurde nicht nur auf Unterschiede zwischen unbestrahlten und bestrahlten Proben geprüft, sondern auch nach der Bevorzugung gefragt. Es hat sich gezeigt, dass erst bei der Bestrahlungsstufe von 10 kGy die unbestrahlte Probe signifikant bevorzugt worden ist. Bei dieser Bestrahlungsdosis kommt es zu so starken sensorischen Veränderungen, dass ein ungeschulter Verbraucher diese Probe ablehnt. Die Ergebnisse des Versuchs lassen jedoch nicht den Schluss zu, dass es mit steigender Bestrahlungsdosis zu einer linear stärkeren Ablehnung des bestrahlten Produktes kommt. Bei der Bestrahlungsstufe von 1 kGy haben 6 von 7 Probanden, die die abweichende Probe richtig erkannt haben, sogar die bestrahlte Probe bevorzugt. Auch wenn dieses Ergebnis nicht signifikant ist, so könnten weitere Untersuchungen zeigen, dass es durch eine Bestrahlung bis maximal 1 kGy nicht unbedingt zu einer sensorischen Qualitätsverschlechterung kommen muss (KILCAST, 1991). Allerdings zeigen die Ergebnisse auch, dass sich der Trend bereits bei einer Bestrahlungsdosis von 3 kGy umkehrt, da hier die Anzahl der Probanden, die die unbestrahlte Probe bevorzugen, deutlich zunimmt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten bisheriger Untersuchungen (POOLE et al., 1994; ITO et al., 1993; EHLERMANN und MÜNZNER, 1976; SUDARMADJI und URBAIN, 1972). Die alleinige Feststellung, dass die Bestrahlung von gefrorenen Nordseegarnelen bis zu einer Dosis von 1 kGy nur zu geringen sensorischen Veränderungen führt, reicht zudem nicht aus, um die Bestrahlung als alternatives Konservierungsverfahren zu etablieren. Letzlich muss der Konservierungseffekt im Vordergrund stehen, wobei aber zwischen einer Reduzierung der Gesamtkeimzahl sowie der Abtötung pathogener Mikroorganismen unterschieden werden muss. Untersuchungen haben gezeigt, dass der Großteil der

Verderbniserreger (*Pseudomonas*, *Achromobacter* und *Proteus*) bereits durch niedrige Dosen bis 3 kGy um bis zu drei Zehnerpotenzen reduziert wird (NERKAR und BANDEKAR, 1990; VAN CLEEMPUT et al., 1980). Allerdings werden pathogene Mikroorganismen (z.B. *Salmonella*, *Listeria*) sowie Sporen erst bei Dosen über 4 kGy abgetötet (RADOMYSKI et al., 1994; NERKAR und BANDEKAR, 1990; VAN CLEEMPUT et al., 1980). Es ist daher anzunehmen, dass die Lebensmittelbestrahlung von Garnelen aufgrund der auftretenden sensorischen Veränderungen lediglich auf eine Keimreduzierung bei niedrigen Bestrahlungsdosen (bis zu 3 kGy) begrenzt ist.

Weitergehende Aussagen bezüglich der Verbraucherakzeptanz für bestrahlte Nordseegarnelen lassen die gewonnenen Resultate nicht zu. Es lässt sich feststellen, dass es bei der Bestrahlung von Garnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungstemperatur zu sensorischen Veränderungen kommt. Um welche Art von Veränderungen es sich dabei handelt, ist bisher nur unzureichend beschrieben.

### **7.3.2 Profilprüfung**

Die bisherigen sensorischen Untersuchungen an bestrahlten Shrimps beschränken sich auf eine einfache hedonische Prüfung mit einer Skale von 1 („missfällt außerordentlich“) bis 9 („gefällt außerordentlich“) ohne die auftretenden Fehlgerüche näher zu beschreiben. POOLE et al. (1994) beschrieben das Aroma von mit einer Dosis von 5 kGy bestrahlten King Prawns mit „strong dirty“, „off“ und „unclean“, wobei es sich bei diesen Deskriptoren um rein subjektive handelt, die mit keinem bestimmten Aromaeindruck in Verbindung gebracht werden können. Im Rahmen einer Profilprüfung sollte das Aroma, Aussehen und die Textur von unbestrahlten und mit verschiedenen Dosen bestrahlten Nordseegarnelen beschrieben werden. Die Veränderung einzelner Deskriptoren sollte Hinweise auf Veränderungen bestimmter Substanzklassen geben, wobei eine genaue Aromastoffanalyse im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

Der typische Nordseegarnelengeruch wurde vom geschulten Panel durch die Deskriptoren „nach Algen/Meer“, „erdig“ und „fischig“ beschrieben. Beim Geschmack kamen die Deskriptoren „süßlich“ und „salzig“ hinzu. Das gleichzeitige Auftreten der Geruchsdeskriptoren beim Geschmack erklärt sich daraus, dass beim Geschmack ebenfalls der retronasale Geruchseindruck miterfasst worden ist. Es werden daher im

Folgenden Geruch und Geschmack gemeinsam betrachtet. Der typische Garnelengeruch und -geschmack nach Algen/Meer nahm deutlich ab, während eine Zunahme von vor allem pilzigen, käsigen, kartoffelartigen und muffig/modrigen Geruchs- und Geschmackseindrücken zu verzeichnen war. Aufgrund der hohen Standardabweichungen konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Anhand der auftretenden Aromaveränderungen, der zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen bei der Bestrahlung sowie der Matrixzusammensetzung von Garnelen können mögliche Substanzklassen abgeleitet werden, die für das Auftreten der Aromaveränderungen verantwortlich sind. Bei Garnelen handelt es sich um proteinreiche Lebensmittel mit einem hohen Anteil an freien Aminosäuren und nur einem geringen Fettgehalt. KILCAST (1991) und KUMTA et al. (1970) stellten fest, dass Aromaveränderungen bei der Bestrahlung durch den Abbau von Proteinen und Aminosäuren sowie Veränderungen der Lipide durch Lipidperoxidation zurückzuführen sind. Dabei handelt es sich vor allem um die Freisetzung von Abbauprodukten schwefelhaltiger Proteine und Aminosäuren, z.B. Schwefelwasserstoff, Thiole (MARTIN et al., 1962). Die bei den Nordseegarnelen feststellbare Zunahme der „pilzigen“, „käsigen“, „kartoffelartigen“ und „muffig/modrigen“ Geruchs- und Geschmackseindrücke ist unter Umständen auf Produkte der Lipidperoxidation zurückzuführen. Substanzen wie 1-Octen-3-on („pilzig“), kurzkettige Fettsäuren („käsig“) oder längerkettige ungesättigte Aldehyde und Ketone („muffig/modrig“) konnten mit dem Auftreten dieser Geruchs- und Geschmackseindrücke in Verbindung gebracht werden. Trotz des geringen Lipidanteils von Nordseegarnelen können diese Verbindungsklassen aufgrund ihrer geringen Geruchsschwellenwerte einen erheblichen Einfluss auf das Aromaprofil aufweisen. Ebenso kann es vorkommen, dass ein Fehlroma, z.B. 1-Octen-3-on, erst beim Verzehr stärker wahrgenommen wird, wenn der retronasale Schwellenwert unter dem der nasalen Wahrnehmung liegt.

Die Profilprüfung hat gezeigt, dass bei einer Bestrahlungsdosis von 1 kGy die sensorischen Veränderungen sehr gering sind. Lediglich der Deskriptor „nach Algen/Meer“ nimmt bereits bei dieser Dosis ab. Die Abnahme dieses eigentlich arteigenen Aromas korreliert mit dem im Verbrauchertest ermittelten Trend zur Bevorzugung der bestrahlten Probe. Da es sich um ein ungeschultes Panel handelte, kann es sein, dass Nordseegarnelen eher mit einem fischigen, muffig/modrigen Aroma assoziiert worden sind. Die Abnahme des „fremden“, arteigenen Aromas

fürte so möglicherweise zur erhöhten Bevorzugung der bestrahlten Probe. In Analogie zum Verbrauchertest zeigte sich aber auch bei der Profilprüfung ein starker Anstieg der negativen Aromaeindrücke ab einer Bestrahlungsdosis von 3 kGy. Die quantitative Beschreibung der Deskriptoren „gekochte Kartoffel“ und „pilzig“ liefert zwischen den Bestrahlungsstufen 3, 5 und 10 kGy sehr ähnliche Werte. Das lässt darauf schließen, dass die Schwellenenergiedosis zur Erzeugung dieses Off-flavour bei etwa 3 kGy für gefroren bestrahlte Nordseegarnelen liegt. Eine Erhöhung der Dosis führt nicht zu einer linearen Verschlechterung des sensorischen Eindruckes, was unter Umständen auf die Zerstörung entstandener Radiolyseprodukte zurückgeführt werden kann, wie es z.B. für das 5-OH-TRP ebenfalls beobachtet werden konnte. Technologisch ergibt sich aus diesen Resultaten folgendes Problem. Die Anwendung der Lebensmittelbestrahlung ist auf geringe Dosen von maximal 2 - 3 kGy begrenzt, um deutliche sensorische Abweichungen zu unterdrücken, so dass eine Abtötung pathogener Keime und Sporen nicht zu erreichen ist. Auch wenn bei niedrigen Dosen keine sofortigen sensorischen Veränderungen festzustellen sind, ist bisher nicht bekannt, wie sich bestrahlte Nordseegarnelen in weiterverarbeiteten Produkten verhalten, die eine deutlich längere Haltbarkeit im Vergleich zu frischen Produkten aufweisen sollen. Die Induktion der Lipidperoxidation sowie Protein- und Aminosäureabbaureaktionen führen unter Umständen zu Fehlparomen, die sich erst nach geringer Lagerzeit in den Endprodukten bemerkbar machen.

### **7.3.3 Sensorische und physikalische Farbmessung**

Farbe und Aussehen stellen wichtige Qualitätsparameter dar. Um die Veränderungen der Farbe der Nordseegarnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis zu beschreiben, wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Im Rahmen der Profilprüfung wurden zur Beschreibung der Farbe die Deskriptoren „orange“ und „rosa“ verwendet. Zusätzlich wurde eine physikalische Farbmessung durchgeführt, die auf der Messung eines Gelb- und eines Rotwertes basiert. Bei der Profilprüfung konnte festgestellt werden, dass es mit zunehmender Bestrahlungsdosis zu einer deutlichen Abnahme beider Farbmerkmale kam, die aber aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant war. Bei der physikalischen Messung der Farbe zeigte sich ein differenzierteres Bild. Bei der Messung des Gelbwertes ließen sich zwischen den verschiedenen Bestrahlungsstufen keine Veränderungen



feststellen. Die bestrahlten Proben zeigten jedoch im Vergleich zur unbestrahlten Probe einen signifikant niedrigeren Gelbwert. Dieser hohe Gelbwert der unbestrahlten Probe konnte aber in Vergleichsmessungen an anderen Chargen nicht reproduziert werden und ist auf natürliche Schwankungen zurückzuführen. Der Rotwert zeigte eine signifikante lineare Abnahme mit steigender Bestrahlungsdosis. SNAUWAERT et al. (1973) führten Untersuchungen zur Carotenoidstabilität an Nordseegarnelen durch. Sie quantifizierten photometrisch unpolare Pigmentanteile aus Garnelen und stellten fest, dass es bei Bestrahlungsdosen von 0,5 bis 3 kGy zu keinen Veränderungen der gelb-orangen Farbanteile gekommen ist. Allerdings konnten sie saisonale Unterschiede zwischen verschiedenen Garnelenchargen ermitteln. Diese Ergebnisse entsprechen den eigenen Resultaten bezüglich des Gelbwertes. Weitere Untersuchungen wurden von KUMTA et al. (1970) und LUKTEN und MACKINNEY (1956) an tropischen Shrimps (*Penaeus* spp.) durchgeführt. Beide kamen zu dem Ergebnis, dass die roten Farbpigmente durch  $\gamma$ -Bestrahlung zerstört werden. Aufgrund der Anfälligkeit natürlicher Farbpigmente gegen Oxidation wird die Beurteilung der Farbe zur Qualitätskontrolle von Fisch- und Fleischerzeugnissen eingesetzt. SCHUBRING (1998) nutzte die Möglichkeiten der instrumentellen Farbmessung zur Beurteilung der Qualität von Fisch und Fischerzeugnissen. Ebenso eignet sich die Methode zur Beurteilung der Qualität von bestrahlten Frikadellen aus Rindfleisch (GIROUX et al., 2001; MONTGOMERY et al., 2000), Schweineschnitzel (LUCHSINGER et al., 1996) und Würstchen (JO et al., 1999). Es lässt sich feststellen, dass die Messung des Rotwertes geeignet ist, unverarbeitete bestrahlte Nordseegarnelen von unbestrahlten zu unterscheiden. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Pigmentierung der Tiere saisonalen Schwankungen unterliegt. Weitere Untersuchungen müssten zeigen, ob für unbestrahltes Garnelenfleisch ein mittlerer Rotwert und eine natürliche Schwankungsbreite festgelegt werden können und ob sich bestrahlte Proben noch signifikant von diesen Werten unterscheiden.

#### **7.3.4 Sensorische und physikalische Texturmessung**

Bei der Profilprüfung zeigten sich eine Abnahme der „Zartheit“ sowie eine Zunahme der Deskriptoren „trocken/strohig“, „fest“ und „zäh“ bis zu einer Dosis von 5 kGy, wobei aufgrund der hohen Standardabweichung keine Signifikanzen festgestellt werden konnten. Diese Ergebnisse korrelierten nur zum Teil mit den Resultaten der

durchgeführten TPA. Bei der Messung der Kohäsion konnte ein Anstieg bis zu einer Bestrahlungsdosis von 5 kGy festgestellt werden. Erst bei einer Dosis von 10 kGy kam es wieder zu einem Abfall der benötigten Kraft. Bei der Profilprüfung wurde bei dieser Bestrahlungsstufe ebenfalls wieder eine Zunahme der „Zartheit“ festgestellt. Die anderen Messparameter der TPA (Härte, Elastizität, Kaubarkeit, Adhäsion) lieferten keine Ergebnisse, die sich mit den Resultaten der Profilprüfung korrelieren lassen. Die TPA-Messungen zeigen lediglich Trends auf, die daher differenziert betrachtet werden müssen. Schubring (1999) konnte zeigen, dass die Größe der Kompression einen signifikanten Einfluss auf die Messresultate besitzt. Unterschiedliche Intensitäten der Kompression korrelieren signifikant mit verschiedenen sensorischen Texturparametern. So zeigte sich bei der Untersuchung von Fischstäbchen, dass eine Kompression von 70 - 80% gut mit den sensorischen Parametern der Zartheit und Härte, eine Kompression von 50% dagegen mit dem Parametern Elastizität und Saftigkeit korrelierte (SCHUBRING, 2000).

Die Ergebnisse der Scherkraft-Messung entsprachen den Resultaten der Kohäsions-Messung. Allerdings muss auch hier gesagt werden, dass die Scherkraft signifikant von der Größe und dem Gewicht der Garnelen abhängt (KLEEBERG et al., 2001).

Im unteren Dosisbereich kommt es durch die Bestrahlung zu einer Schädigung von Zell- und Gewebestrukturen, die das Wasserbindungsvermögen reduziert. Beim Kauen ergibt sich daraus ein „zäher“ Textureindruck. Bei höheren Bestrahlungsdosen kommt es zu stärkeren Schädigungen der Texturproteine. PERNG und JANG (1990) konnten bei ihren elektronenmikroskopischen Messungen an bestrahlten Black Tiger Shrimps (*Penaeus monodon*) Schädigungen an den Myofibrillen und am Actin feststellen. Diese Schäden traten aber erst bei Bestrahlungsdosen von 10 kGy bei Raumtemperatur auf. Weitere Untersuchungen an Rindfleisch konnten ebenfalls zeigen, dass es bei der Bestrahlung zu Veränderungen an Texturproteinen kommt. Die Veränderungen traten bei Rindfleisch aber schon ab einer Bestrahlungsdosis von 3 kGy auf und führten zu einer Abnahme der Scherkraft (YOOK et al., 2001). Abschließend lässt sich feststellen, dass die instrumentelle TPA und die Bestimmung der Warner-Bratzler-Scherkraft zur Beschreibung der Qualität von bestrahlten Nordseegarnelen nur geeignet sind, wenn sämtliche die Messung beeinflussenden Faktoren bei der Versuchsplanung und -durchführung beachtet werden können.

## 8 Zusammenfassung / Summary

Die Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierenden Strahlen als Konservierungsverfahren ist weltweit unterschiedlich geregelt. Zur Angleichung der Rechtsvorschriften in der EU wurde eine Richtlinie über die mit ionisierenden Strahlen behandelten Lebensmittel und Lebensmittelbestandteile verabschiedet, die seit September 2001 anwendbar ist. Diese Richtlinie erlaubt nur die Bestrahlung von aromatischen Kräutern und Gewürzen. Über eine Erweiterung der Positivliste um z.B. Garnelen, Froschschenkel oder Eiklar wird zur Zeit diskutiert. Bisher ist dies jedoch aufgrund fehlender validierter Analyseverfahren für die proteinreichen und zugleich fettarmen Lebensmittel nicht möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Bestimmung von Aminosäure-Radiolyseprodukten entwickelt. Insbesondere die aromatischen Aminosäuren TRP, TYR und PHE reagieren empfindlich auf  $\gamma$ -Bestrahlung.

Bei der Bestrahlung wässriger TRP-Lösungen wurden OH-TRP-Isomere als Radiolyseprodukte identifiziert. Aufgrund der hohen Gehalte an freiem TRP in Nordseegarnelen sollte daher ein Bestrahlungsnachweis über die OH-TRP-Isomere mittels einer Aufarbeitung ohne Hydrolyse möglich sein. Die zu erwartenden Gehalte an OH-TRP-Isomeren wurden über den TRP-Verlust in den Nordseegarnelen bei Bestrahlung und die Bildungsrate in den bestrahlten wässrigen TRP-Lösungen abgeschätzt. Zur Isolierung der OH-TRP-Isomere wurde nach Proteinfällung mit Essigsäure eine zweistufige SPE an einer C18-Phase mit nachfolgendem Kationenaustausch an einer PRS-Phase durchgeführt. Durch diese Aufarbeitung gelang eine vollständige Abtrennung von Störsubstanzen. Die Analyse erfolgte mittels HPLC und EC-Detektion. Mit dem entwickelten Verfahren wurden Wiederfindungsraten von 75% für 6- und 7-OH-TRP und 57% für 4-OH-TRP erreicht. Die Anwendung der Methode auf mit 1, 3 und 5 kGy bestrahlte Nordseegarnelen zeigte jedoch, dass nur 5-OH-TRP bei der Bestrahlung gebildet wird. Die Gehalte stiegen bis zu einer Dosis von 3 kGy an und nahmen bei 5 kGy wieder ab. Anhand von Modellversuchen mit einer bestrahlten Aminosäure-Lösung, deren Zusammensetzung ungefähr den Gehalten an freien Aminosäuren in den Nordseegarnelen

entsprach, konnte festgestellt werden, dass die Bildung von 4-, 6- und 7-OH-TRP durch den hohen Überschuss an anderen Aminosäuren unterdrückt wird. Die nicht-physiologischen OH-TRP-Isomere aus dem frei vorkommenden TRP sind damit als Bestrahlungsmarker für Nordseegarnelen nicht geeignet.

Um weitere potenzielle Bestrahlungsmarker zu identifizieren, wurde ein Screening auf polare Radiolyseprodukte mittels HPLC und UV-, FL- und EC-Detektion durchgeführt. Es wurden drei verschiedene Garnelenarten (Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps, Tiefsee Shrimps), Hühnerfleisch und Eiklar untersucht. Ohne Probenanreicherung ließen sich nur die in konservierten Nordseegarnelen bei Bestrahlung entstehenden Radiolyseprodukte der Benzoesäure nachweisen. Nach Anreicherung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether konnten 3- und 4-OH-BA mittels HPLC-MS identifiziert werden. Der Nachweis von Phenol gelang nach Anreicherung durch Vakuumdestillation mittels GC-MS. Die Quantifizierung mittels HPLC-ECD zeigte, dass die Gehalte an BA-Radiolyseprodukten in den bei Raumtemperatur bestrahlten konservierten Nordseegarnelen um den Faktor 10 höher sind als in den gefroren bestrahlten Proben. Signifikante Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben konnten bei Raumtemperatur ab einer Dosis von 1 kGy, bei den gefroren bestrahlten Proben ab einer Dosis von 3 kGy festgestellt werden. Damit kann mit dieser Methode ein nicht erlaubter Einsatz von Benzoesäure in Verbindung mit einer nachfolgenden Bestrahlung der Nordseegarnelen nachgewiesen werden.

Nach Probenanreicherung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether um den Faktor 50 konnte HPPA, das Desaminierungsprodukt von TYR, in allen untersuchten Lebensmitteln nachgewiesen werden. Die Identifizierung gelang anhand von bestrahlten und mit dem Fenton-System behandelten Aminosäurelösungen mittels HPLC-MS. Die Quantifizierung mittels HPLC-FL/MS zeigte, dass die HPPA-Gehalte unabhängig von der Bestrahlungstemperatur sind. Sie betragen 2 - 20 µg/kg in den mit 1 - 10 kGy bestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps und Hühnerfleisch. Obwohl in allen Proben geringe Blindwerte gemessen werden konnten, waren signifikante Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben ab einer Dosis von 1 kGy feststellbar. In den bestrahlten Tiefsee Shrimps und im Eiklar waren die HPPA-Gehalte (2 - 5 µg/kg) geringer, wodurch sich signifikante Unterschiede erst bei höheren Bestrahlungsdosen ergaben.

---

HPPA eignet sich als Bestrahlungsmarker für Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps und Hühnerfleisch. Um die HPPA-Methode als Routineverfahren einsetzen zu können, müssen die Blindwerte in unbestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln und der Einfluss der Bestrahlungsbedingungen näher untersucht werden.

Abschließend wurden sensorische und physikalische Untersuchungen an bestrahlten Nordseegarnelen durchgeführt, um Erkenntnisse über die Verbraucherakzeptanz dieser Produkte zu erhalten. Es wurde ein erweiterter Triangeltest mit einem ungeschulten Sensorik-Panel durchgeführt. Hiermit sollte untersucht werden, ob sensorische Unterschiede zwischen den im gefrorenen Zustand bestrahlten Garnelen und unbestrahlten Kontroll-Proben von einem Verbraucher festgestellt werden.

In dem Verbrauchertest (Erweiterter Dreieckstest mit einem ungeschulten Panel) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den im gefrorenen Zustand bestrahlten Garnelen und den unbestrahlten Proben ab einer Bestrahlungsdosis von 5 kGy festgestellt werden. Eine signifikante Bevorzugung der unbestrahlten Garnelen war erst bei einer Bestrahlungsdosis von 10 kGy festzustellen. Des Weiteren wurde mit einem geschulten Sensorik-Panel eine Profilprüfung hinsichtlich Aussehen/Farbe, Geruch, Geschmack und Textur der  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen durchgeführt. Es zeigte sich, dass schon ab einer Bestrahlungsdosis von 3 kGy bei den gefroren bestrahlten Garnelen deutliche Flavour-Veränderungen auftreten. Der typische Garnelengeruch und -geschmack nach Algen/Meer nahm deutlich ab, während eine Zunahme von vor allem pilzigen, käsigen, kartoffelartigen und muffig/modrigen Geruchs- und Geschmackseindrücken zu verzeichnen war. Bei hohen Bestrahlungsdosen zeigten sich zusätzlich Farb- und Texturveränderungen. Die physikalische Farbmessung zeigte eine signifikante lineare Abnahme des Rotwertes in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis, während sich der Gelbwert durch die Bestrahlung nicht veränderte. Die instrumentelle TPA lieferte keine signifikanten Ergebnisse. Tendenziell ließ sich eine Zunahme der Scherkraft und Kohäsion bis zu einer Bestrahlungsdosis von 5 kGy feststellen. Anhand dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch bei gefroren bestrahlten Nordseegarnelen schon bei geringen Bestrahlungsdosen deutliche sensorische Veränderungen auftreten, die die Verbraucherakzeptanz negativ beeinflussen können.

## 8 Summary

Legislation on irradiation treatment of foodstuffs varies throughout the world. To assimilate legislation in the EU European commission ratified the directive 1999/2/EG on irradiation of food and food ingredients which became applicable in September 2001. It includes the permission to irradiate herbs and spices to a maximum dose of 10 kGy. Clearance for further foodstuff to be treated by  $\gamma$ -irradiation like shrimps, frog legs, or egg white is currently discussed. The lack of reliable analytical methods for determination irradiation treatment of these protein-rich, low-fat products prohibits the extension of the positive list at the moment.

This work presents different methods for determination of amino acid radiation products, especially for the aromatic amino acids TRP, TYR, and PHE which are very sensitive to irradiation treatment.

OH-TRP-isomers were identified in irradiated TRP-solutions. Because of the high free TRP content in brown shrimps (*crangon crangon*), OH-TRP isomers were supposed to be formed in detectable amounts for the use as irradiation markers. Analysis of unbound radiation products made it possible to leave out the enzymatic pre-treatment. Expected amounts of OH-TRP-isomers were approximated from experimental determination of TRP loss and OH-TRP-isomers conversion rates in irradiated TRP-solutions. For isolation of OH-TRP-isomers from irradiated brown shrimps proteins were precipitated by addition of acetic acid. SPE-clean-up was performed on a C18-cartridge followed by cation-exchange on a PRS-cartridge in order to remove other matrix components. Analysis was done using RP-HPLC with EC-detection. Recovery rates were 75% for 6- and 7-OH-TRP and 57% for 4-OH-TRP. Application of the method for brown shrimps irradiated with doses of 1, 3 and 5 kGy showed that 5-OH-TRP was the only OH-TRP-isomer formed in irradiated samples. Contents raised up to an irradiation dose of 3 kGy followed by decrease at a dose of 5 kGy. Experiments using irradiated amino acid solutions as model systems, in which the amino acid composition was similar to the composition in brown shrimps, showed totally suppression of the formation of 4-, 6- and 7-OH-TRP by excess of other amino acids. Therefore, non-physiological OH-TRP-isomers

formed from free TRP represent no appropriate markers for the determination of irradiation treatment of protein-rich, low-fat foodstuff.

For identification of other marker compounds irradiated samples were screened for polar radiation products by HPLC analysis with UV-, FL- and EC-detection. Three different shrimps (brown shrimps, black tiger shrimps, deep sea shrimps), chicken meat and egg white were analysed. Without further sample concentration it was only possible to detect radiation products of benzoic acid in preserved brown shrimps. 3- and 4-OH-BA could be identified by HPLC-MS after sample concentration by liquid-liquid-extraction with diethylether. Identification of phenol was done by GC-MS after sample enrichment by vacuum distillation. Quantitation by HPLC-ECD showed that the contents of BA radiation products were significantly higher (10fold) in samples irradiated at room temperature. Significant differences to unirradiated samples were obtained for samples irradiated at room temperature from doses of 1 kGy, for irradiated frozen samples from 3 kGy. This method is applicable for determination illicit chemical preservation in combination with subsequent irradiation treatment of brown shrimps.

After sample enrichment by liquid-liquid-extraction by a factor of 50 HPPA, the deamination product of TYR, was detectable in all samples. Identification was done by HPLC-MS analysis of irradiated amino acid solutions in comparison with amino acid solutions treated with FENTON's reagent. Quantitation by HPLC-MS/FL showed that HPPA increased linearly with dose and was independent from irradiation temperature. Samples contained 2 - 20 µg/kg in brown shrimps, black tiger shrimps and chicken meat irradiated with doses of 1 - 10 kGy. Minor blind values of HPPA were detected in all unirradiated samples. Nevertheless, significant differences between irradiated and non-irradiated samples were obtained for doses from 1 kGy. HPPA contents of deep sea shrimps and egg white were much lower (2 - 5 µg/kg), hence significant differences were only obtained for higher irradiation doses.

HPPA represents an appropriate marker for the detection of irradiated brown shrimps, black tiger shrimps and chicken meat. In order to use the HPPA-method for routine analysis further investigations have to be done on the origin of the HPPA contents in unirradiated protein-rich foodstuffs and on the influence of the irradiation conditions.

In addition, sensory and physical properties of irradiated brown shrimps were investigated to evaluate occurring changes and consumer's acceptance for irradiated foodstuffs. An extended triangle test with an untrained panel was used to evaluate consumer's acceptability for irradiated foods. Aim of this study was to show if it is possible for the consumer to discriminate between irradiated and unirradiated brown shrimps. Panellists were able to detect a significant difference between these samples from a irradiation dose of 5 kGy. Significant preferences of unirradiated samples were obtained at a dose of 10 kGy.

Profile test was used to evaluate changes in colour, smell, taste and texture of irradiated brown shrimps with increasing irradiation doses. From an irradiation dose of 3 kGy flavour changes were noticeable. The typical smell and taste of unirradiated brown shrimps decreased, and cheesy, musty, mushroom-, and potato-like off-flavours occurred. At high irradiation doses changes of colour and texture also increased. Physical colour measurement showed a significant linear decrease of the red value with increasing irradiation dose. No changes of the yellow value could be observed. Instrumental TPA showed no significant results. Shear force and cohesion increased slightly up to an irradiation dose of 5 kGy.

It can be concluded that even low-dose irradiation of frozen brown shrimps leads to changes in sensory quality that might have a negative impact on consumer's acceptability for irradiated foodstuffs.



## 9 Literatur

ACHESON, R. M., HAZELWOOD, C. M.: The Free Radical Nature of Aromatic Hydroxylation Effected by Oxygen, Ascorbic Acid and Ferrous Ions, *Biochem. Biophys. Acta*, 42, 49-55 (1960).

ACKER, L., TERNES, W.: Chemische Zusammensetzung des Eies in: Ternes, W., Acker, L., Scholtyssek, S.; *Ei und Eiprodukte*, 90-194, Verlag Paul Parey, Hamburg (1994).

ANTUNES, S. A., NOVAK, A. F.: Radiolysis of Tryptophan in *Penaeus setiferus* in: Proceedings Series International Atomic Energy Agency; *Food Preservation by Irradiation*, Vol. 1, 397-406, Vienna (1978).

ARMSTRONG, R. C., SWALLOW, A. J.: Pulse- and Gamma-Radiolysis of Aqueous Solutions of Tryptophan, *Radiat. Res.*, 40, 563-579 (1969).

AUDETTE, M., BLOUQUIT, Y., HOUÉE-LEVIN, C.: Oxidative Dimerization of Proteins: Role of Tyrosine Accessibility, *Arch. Biochem. Biophys.*, 376, 217-220 (2000).

BERNWIESER, I., SONNTAG, G., SOLAR, S., QUINT, R. M., KRAJNIK, P., GETOFF, N.: Nachweis der Bestrahlung von Hühnerfleisch durch Bestimmung von o- und m-Tyrosin mit HPLC und Elektroden Array Detektor, *Ernährung*, 19, 159-162 (1995).

BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin): L-49.07-3: Bestimmung des Tryptophangehaltes in diätetischen Lebensmitteln auf der Basis von Proteinhydrolysaten in: *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG*, Beuth Verlag GmbH, Berlin (1989).

BLANCHARD, J.: Evaluation of the Relative Efficacy of Various Techniques for Deproteinizing Plasma Samples Prior to High-Performance Liquid Chromatographic Analysis, *J. Chromatogr.*, 226, 455-460 (1981).

---

CAC (Codex Alimentarius Commission): Programme Mixte FAO/OMS sur les Normes Alimentaires Comité du Codex sur les Additifs Alimentaires et les Contaminants. Projet de Codex Révisé de Standard Général pour les Aliments Irradiés, Rotterdam (2002).

CAC (Codex Alimentarius Commission): Codex General Standard for Irradiated Foods and Recommended International Code of Practice for the Operation of Radiation Facilities Used for the Treatment of Foods, Food and Agriculture Organization of the United Nations CAC Vol. XV – ed 1, Rome (1983).

CHUAQUI-OFFERMANN, N., MCDUGALL, T.: An HPLC Method to Determine o-Tyrosine in Chicken Meat, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 300-302 (1991).

CLAYBROOK, D. L.: Nitrogen Metabolism in: Bliss, D. E.; *The Biology of Crustacea*, 163-213, Academic Press, New York (1983).

COSBEY, S. H., CRAIG, I., GILL, R.: Novel Solid-Phase Extraction Strategy for the Isolation of Basic Drugs from Whole Blood. Preliminary Study Using Commercially Available Extraction Cartridges, *J. Chromatogr. B*, 669, 229-235 (1995).

CURTIUS, R. CH., METTLER, M.: Study of the Intestinal Tyrosine Metabolism Using Stable Isotopes and Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J Chromatogr.*, 126, 569-580 (1976).

DEFENDENTI, C., BONACINA, E., MAURONI, M., GELOSA, L.: Validation of a High Performance Liquid Chromatographic Method for Alpha Amanitin Determination in Urine, *Forensic Sci. Int.*, 92, 59-68 (1998).

DELINCEE, H.: Control of Irradiated Food: Recent Developments in Analytical Detection Methods, *Radiat. Phys. Chem.*, 42, 351-357 (1993).

DIEHL, J. F.: *Safety of Irradiated Foods*, 2. Aufl., Marcel Dekker Inc., New York (1995).

---

EHLERMANN, D. A. E., DELINCEE, H.: Die Strahlenkonservierung von Lebensmitteln, Zentralstelle für Agrardokumentation und -information (ZADI), Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (BML): <http://www.dainet.de/bfe/deutsch/ehl06/ehl06.html> (22.10.1998).

EHLERMANN, D., MÜNZNER, R.: Strahlenkonservierung von Nordseekrabben, *Arch. Lebensmittelhyg.*, 27, 50-55 (1976).

ELIAS, P. S.: Die gesundheitliche Unbedenklichkeit bestrahlter Lebensmittel in: Ehlermann, D. A. E., Spieß, W. E. L., Wolf, W.; Lebensmittelbestrahlung, Kolloquium anlässlich der Inbetriebnahme des Elektronen-Linearbeschleunigers, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, BFE-R-92-01, Karlsruhe (1992).

ELIAS, P. S., COHEN, A. J.: *Radiation Chemistry of Major Food Components*, Elsevier North-Holland Biomedical Press B. V., Amsterdam (1977).

ELSDEN, S. R., HILTON, M. G., WALLER, J. M.: The End Products of the Metabolism of Aromatic Amino Acids by Clostridia, *Arch. Microbiol.*, 107, 283-288 (1976).

ESBENSEN, K., SCHONKOPF, S., MIDTGAARD, T.: *Multivariate Analysis in Practice*, CAMO ASA, Trondheim (1996).

EU: Mitteilung der Kommission über Lebensmittel und Lebensmittelzutaten, die für die Behandlung mit ionisierenden Strahlen in der Gemeinschaft zugelassen sind, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften C 241/03 (2001).

EU: Richtlinie 1999/2/EG, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 66, 16-23 (1999a).

EU: Richtlinie 1999/3/EG, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 66, 24-25 (1999b).

---

FENTON, H. J. H.: Oxidation of Tartaric Acid in Presence of Iron, *J. Chem. Soc.* , 65, 899-910 (1894).

FLETCHER, G. L., OKADA, S.: Radiation-Induced Formation of Dihydroxy-phenylalanine from Tyrosine and Tyrosine-Containing Peptides in Aqueous Solution, *Radiat. Res.*, 15, 349-354 (1961).

FOX, J. A., HAYES, D. J., SHOGREN, J. F.: Consumer Preferences for Food Irradiation: How Favorable and Unfavorable Descriptions Affect Preferences for Irradiated Pork in Experimental Auctions, *J. Risk Uncertainty*, 24, 75-95 (2002).

FRENZEN, P. D., DEBESS, E. E., HECHERY, K. E., KASSENBOURG, H., KENNEDY, M., MCCOMBS, K., MCNEES, A.: Consumer Acceptance of Irradiated Meat and Poultry in the United States, *J. Food Protect.*, 64, 2020-2026 (2001).

GARRISON, W. M.: The Radiation Chemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins in Relation to Radiation Sterilization of High-Protein Foods, *Radiat. Effects*, 54, 29-40 (1981).

GARRISON, W. M.: Radiation Chemistry of Organo-Nitrogen Compounds in: Ebert, M., Howard, A.; *Current Topics in Radiation Research*, 43-94, North Holland Publ. Co., Amsterdam (1968).

GETOFF, N.: Pulse Radiolysis of Aromatic Amino Acids – State of the Art, *Amino Acids*, 2, 195-214 (1992).

GIROUX, M., OUATTARA, B., YEFSAH, R., SMORAGIEWICZ, W., SAUCIER, L., LACROIX, M.: Combined Effect of Ascorbic Acid and Gamma Irradiation on Microbial and Sensorial Characteristics of Beef Patties during Refrigerated Storage, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 919-925 (2001).

GOODWIN, B. L., RUTHVEN, C. R. J., SANDLER, M.: Gut Flora and the Origin of some Urinary Aromatic Phenolic Compounds, *Biochem. Pharmacol.*, 47, 2294-2297 (1994).

---

GROOTVELD, M., JAIN, R.: Methods for the Detection of Irradiated Foodstuffs: Aromatic Hydroxylation and Degradation of Polyunsaturated Fatty Acids, *Radiat. Phys. Chem.*, 34, 925-934 (1989).

GROSSI, G., BARGOSSO, A., SPROVIERI, G., BERNOGOZZI, V., PASQUALI, R.: Full Automation of Serotonin Determination by Column-Switching and HPLC, *Chromatographia*, 30, 61-68 (1990).

HEIN, W. G., SIMAT, T. J., STEINHART, H.: Detection of Irradiated Food. Determination of Non-Protein Bound o-Tyrosine as a Marker for the Detection of Irradiated Shrimps, *Eur. Food Res. Technol.*, 210, 299-304 (2000).

HELLE, N., BALLIN, U., KRUSE, R.: Etablierung analytischer Methoden zur Identifizierung bestrahlter Fische und Krebstiere, *Arch. Lebensmittelhyg.*, 47, 1-32 (1996).

HOVART, P., SCHIETECATTE, W., VYNCKE, W.: Wirtschaftliche und technologische Studie über das Bestrahlen von Garnelen (*Crangon vulgaris* Fabr.), Informationsheft des Büro EURISOTOP 70, Serie: Monographien – 19, Brüssel (1972).

HUNKOVA, J., SIMAT, T. J., STEINHART, H.: Determination of o-Tyrosin as a Marker for the Detection of Irradiated Shrimps, *Czech. J. Food Sci.*, 18, 78-80 (2000).

HUNTER, C.: Changing Attitudes to Irradiation Throughout the Food Chain, *Radiat. Phys. Chem.*, 57, 239-243 (2000).

IAEA (International Atomic Energy Agency): *Irradiation of Fish, Shellfish and Frog Legs. A Compilation of Technical Data for Authorization and Control*, IAEA-TECDOC-1158, Wien (2000).

ITO, H., RASHID, H. O., SANGTHONG, N., ADULYATHAM, P., RATTAGOOL, P., ISHIGAKI, I.: Effect of Gamma-Irradiation on Frozen Shrimps for Decontamination of Pathogenic Bacteria, *Radiat. Phys. Chem.*, 42, 279-282 (1993).

---

JO, C., AHN, D. U., BYUN, M. W.: Lipid Oxidation and Volatile Production in Irradiated Raw Pork Batters Prepared with Commercial Soybean Oil Containing Vitamin E, *Radiat. Phys. Chem.*, 61, 41-47 (2001).

JO, C., LEE, J. I., AHN, D. U.: Lipid Oxidation, Color Changes and Volatiles Production in Irradiated Pork Sausage with Different Fat Content and Packaging during Storage, *Meat Sci.*, 51, 355-361 (1999).

JOSIMOVIC, L. J., JOVANOVIC, S., CUDINA, I.: Radiation Induced Decomposition of Tryptophan in Deaerated Aqueous Solutions, *Radiat. Phys. Chem.*, 22, 771-778 (1983).

KAUR, H., HALLIWELL, B.: Detection of Hydroxyl Radicals by Aromatic Hydroxylation in: *Methods in Enzymology*, 233, 67-83, (1994).

KILCAST, D.: Irradiation and Combination Treatments, *Food Control*, 2, 6-8 (1991).

KLEEBERG, K. K., MÜLLER, A., SIMAT, T. J., STEINHART, H., SCHUBRING, R.: Sensorische und physikalische Untersuchungen von Qualitätsveränderungen in  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen, *Lebensmittelchemie*, 55, 90-91 (2001).

KLEEBERG, K. K., MÜLLER, B., SCHÜPPHAUS, M., SIMAT, T. J., STEINHART, H.: Qualität biotechnologisch hergestelltes Tryptophan – analytischer Vergleich der auf dem Markt befindlichen Produkte, *Lebensmittelchemie*, 52, 126 (1998).

KOPOLDOVA, J., VLASAKOVA, V., WEINGART, M.: Radiolysis of Aqueous Oxygen-free Solutions of Tryptophan at Various pH Values, *J. Radioanal. Nucl. Chem. Lett.*, 96, 363-372 (1985).

KRACH, C., SONTAG, G., SOLAR, S.: A Simple Chemical Method for Identification of Irradiated Industrial Processed Food, *Food Res. Int.*, 32, 43-47 (1999).

---

KRACH, C., SONTAG, G., SOLAR, S., GETOFF, N.: HPLC with Coulometric Electrode Array Detection. Determination of o- and m-Tyrosine for Identification of Irradiated Shrimps, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 204, 417-419 (1997).

KRAJNIK, P., QUINT, R. M., SOLAR, S., GETOFF, N., SONNTAG, G.: Influence of Temperature and Oxygen Concentration on the Radiation Induced Oxidation of Phenylalanine, *Z. Naturforsch. A*, 50, 864-870 (1995).

KUMTA, U. S., MAVINKURVE, S. S., GORE, M. S., SAWANT, P. L., GANGAL, S. V., SREENIVASAN, A.: Radiation Pasteurization of Fresh and Blanched Tropical Shrimps, *J. Food Sci.*, 35, 360-363 (1970).

LAMBERT, M. A., MOSS, C. W.: Production of p-Hydroxyhydrocinnamic Acid from Tyrosine by *Peptostreptococcus anaerobius*, *J. Clin. Microbiol.*, 12, 291-293 (1980).

LEE, K., HONG, J.: Nonionic Adsorption of Aromatic Amino Acids on a Cation-Exchange Resin, *React. Funct. Polym.*, 28, 75-80 (1995).

LIEBSTER, J., KOPOLDOVA, J.: The Radiation Chemistry of Amino Acids, *Adv. Radiat. Biol.*, 1, 157-225 (1964).

LIU, H., WORTHEN, H. G.: Measurement of Free Amino Acid Levels in Ultrafiltrates of Blood Plasma by High-performance Liquid Chromatography with Automatic Pre-Column Derivatization, *J. Chromatogr.*, 579, 215-224 (1992).

LOAHARANU, P.: Irradiation as a Cold Pasteurization Process of Food, *Vet. Parasitol.*, 64, 71-82 (1996).

LOAHARANU, P.: Status and Prospects of Food Irradiation, *Food Technol.*, 48, 125-131 (1994).

LUCHSINGER, S. E., KROPF, D. H., GARCIA ZEPEDA, C. M., HUNT, M. C., MARSDEN, J. L., RUBIO CANAS, E. J., KASTNER, C. L., KUECKER, W. G., MATA, T.: Color and Oxidative Rancidity of Gamma and Electron Beam-Irradiated Boneless Pork Chops, *J. Food Sci.*, 61, 1000-1005 (1996).

LUKTEN, A., MACKINNEY, G.: Effect of Ionising Radiations on Carotenoid Stability, *Food Technol.*, 10, 630 (1956).

MARTIN, S., BATZER, O. F., LANDMANN, W. A., SCHWEIGERT, B. S.: The Role of Gluthathione and Methionine in the Production of Hydrogen Sulfide and Methyl Mercaptan during Irradiation of Meat, *J. Agric. Food Chem.*, 10, 91-93 (1962).

MARX, F.: Nachweis der Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierenden Strahlen in: Günzler, H., Bahadir, A. A., Danzer, K., Fresenius, W. (Hrsg.); *Analytiker-Taschenbuch*, 19, 137-161, Springer Verlag, Berlin (1998).

MASKOS, Z., RUSH, J. D., KOPPENOL, H. H.: The Hydroxylation of Tryptophan, *Arch. Biochem. Biophys.*, 296, 514-520 (1992a).

MASKOS, Z., RUSH, J. D., KOPPENOL, H. H.: The Hydroxylation of Phenylalanine and Tyrosine: A Comparison with Salicylate and Tryptophan, *Arch. Biochem. Biophys.*, 296, 521-529 (1992b).

MASOTTI, P., ZONTA, F.: Food Irradiation: An Update of Legal and Analytical Aspects, *Ital. J. Food Sci.*, 11, 305-316 (1999).

MEIER, W., HEDIGER, H., ARTHO, A.: Determination of o-Tyrosine in Shrimps, Fish, Mussels, Frog Legs and Egg-White in: McMurray, C. H., Stewart, E. M., Gray, R., Pearce, J.; *Detection Methods for Irradiated Foods: Current Status*, 303-309, Royal Society of Chemistry, Cambridge (1996).

MILLER, J. H., DAWSON, L. E., BAUER, D. H.: Free Amino Acid Content of Chicken Muscle from Broilers and Hens, *J. Food Sci.*, 30, 406-411 (1965).



---

MÖRSEL, J. T.: Einfluss ionisierender Strahlen auf oxidative Prozesse an Lipiden in: Knörr, M., Ehlermann, D. A. E., Delincee, H.; *Lebensmittelbestrahlung – 5. Deutsche Tagung*, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, BFE-R-99-01, Karlsruhe (1999).

MOLINS, R. A., MOTARJEMI, Y., KÄFERSTEIN, F. K.: Irradiation: A Critical Control Point in Ensuring the Microbiological Safety of Raw Foods, *Food Control*, 12, 347-356 (2001).

MONTGOMERY, J. L., PARRISH, F. C., OLSON, D. G.: Irradiation and Storage Effects on Aroma and Color of Raw Beef Patties in Anaerobic or Aerobic Packaging, *J. Muscle Foods*, 11, 19-33 (2000).

MOREHOUSE, K. M., DESROSIERS, M. F.: Electron Spin Resonance Investigations of Gamma-Irradiated Shrimp Shell, *Appl. Radiat. Isotop.*, 44, 429-432 (1993).

MÜLLER, G., WEBER, H.: *Mikrobiologie der Lebensmittel: Grundlagen*, 6. Auflage, Behrs Verlag, Hamburg (1996).

NDIAYE, B., JAMET, G., MIESCH, M., HASSELMANN, C., MARCHIONI, E.: 2-Alkylcyclobutanones as Markers for Irradiated Foodstuffs. II. The CEN (European Committee for Standardization) method: Field of Application and Limit of Utilization, *Radiat. Phys. Chem.*, 55, 437-445 (1999).

NERKAR, D. P., BANDEKAR, J. R.: Elimination of Salmonella from Frozen Shrimp by Gamma Radiation, *J. Food Safety*, 10, 175-180 (1990).

OTTO, M.: *Chemometrie: Statistik und Computereinsatz in der Analytik*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1997).

PARTMANN, W., SCHLASZUS, H.: Muster freier Aminosäuren in frischen und gelagerten hartgekochten Eiern, *Z. Ernährungswiss.*, 19, 14-20 (1980).

PERNG, F.-S., YANG, J.-S.: Ultrastructural Effect of Gamma Radiation on Grass Shrimps (*Penaeus monodon* Fabricius), *Radiat. Phys. Chem.*, 35, 258-262 (1990).

---

PETER, G., RAJEWSKY, B.: Die indirekte Wirkung von Röntgenstrahlen auf Aminosäuren. II. Bestrahlung von Tryptophan, *Z. Naturforsch. B*, 18, 110-114 (1963).

POOLE, S. E., MITCHELL, G. E., MAYZE, J. L.: Low Dose Irradiation Affects Microbiological and Sensory Quality of Sub-Tropical Seafood, *J. Food Sci.*, 59, 85-87 (1994).

RADOMYSKI, T., MURANO, E. A., OLSON, D. G., MURANO, P. S.: Elimination of Pathogens of Significance in Food by Low-dose Irradiation: A Review, *J. Food Prot.*, 57, 73-86 (1994).

RALSTON, P. B., STREIN, T. G.: A Study of Deproteinization for Subsequent Serum Analysis with Capillary Electrophoresis, *Microchem. J.*, 55, 270-283 (1997).

RAO, P. S., HAYON, E.: Reaction of Hydroxyl Radicals with Oligopeptides in Aqueous Solutions. A Pulse Radiolysis Study, *J. Phys. Chem.*, 79, 109-115 (1975).

RUSHING, L. G., WEBB, S. F., THOMPSON JR., H. C.: Determination of Leucogentian Violet and Gentian Violet in Catfish Tissue by High-Performance Liquid Chromatography with Visible Detection, *J. Chromatogr. B*, 674, 125-131 (1995).

SAMUELSON, O.: *Ion Exchange Separations in Analytical Chemistry*, Almqvist & Wiksell, Stockholm (1963).

SCHREIBER, G. A., SCHULZKI, G., SPIEGELBERG, A., HELLE, N., BÖGL, K. W.: Evaluation of a Gas Chromatographic Method to Identify Irradiated Chicken, Pork, and Beef by Detection of Volatile Hydrocarbons, *J. AOAC int.*, 77, 1202-1217 (1994).

SCHREIBER, G. A., HOFFMANN, A., HELLE, N., BÖGL, K. W.: Nachweis einer Strahlenbehandlung von Meeresfrüchten durch Thermolumineszenz-Analyse, *Bundesgesundhbl.*, 36, 522-529 (1993a).

---

SCHREIBER, G. A., WAGNER, U., LEFFKE, A., HELLE, N., AMMON, J., BUCHHOLTZ, H.-V., DELINCEE, H., ESTENDORFER, S., FUCHS, K., VON GRABOWSKI, H.-U., KRUSPE, W., MAINCZYK, K., MÜNZ, H., NOOTENBOOM, H., SCHLEICH, C., VREDEN, N., WIEZOREK, C., BÖGL, K. W.: Thermoluminescence Analysis to Detect Irradiated Spices, Herbs and Spice- and Herb Mixtures – An Intercomparison Study, Bericht des Institutes für Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes, SozEp-Heft 2/1993, Berlin (1993b).

SCHREIBER, G. A., WAGNER, U., HELLE, N., AMMON, J., BUCHHOLTZ, H.-V., DELINCEE, H., ESTENDORFER, S., VON GRABOWSKI, H.-U., KRUSPE, W., MAINCZYK, K., MÜNZ, H., SCHLEICH, C., VREDEN, N., WIEZOREK, C., BÖGL, K. W.: Thermoluminescence Analysis to Detect Irradiated Fruit and Vegetables – An Intercomparison Study, Bericht des Institutes für Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes, SozEp-Heft 3/1993, Berlin (1993c).

SCHUBRING, R.: Instrumentelle und sensorische Bewertung der Textur von Fischstäbchen, *Dtsch. Lebensm. Rdsch.*, 96, 210-221 (2000).

SCHUBRING, R.: Untersuchung von Einflussfaktoren auf die instrumentelle Texturprofilanalyse (TPA) von Fischerzeugnissen. 1. Einfluss der Kompression, *Dtsch. Lebensm. Rdsch.*, 95, 373-386 (1999).

SCHUBRING, R.: Instrumental Colour Measurement as a Tool for the Determination of Fish Freshness in: *Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industry*, Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action "Evaluation of Fish Freshness", International Institute of Refrigeration AIR3CT94-2283, 383-390, Paris (1998).

SIMAT, T. J.: Identifizierung von Tryptophanderivaten in Tryptophan, tryptophanhaltigen Peptiden und Proteinen, Dissertation Universität Hamburg (1997).

SIMIC, M. G.: Radiation Chemistry of Amino Acids and Peptides in Aqueous Solutions, *J. Agric. Food Chem.*, 26, 6-14 (1978).

SINGH, A., ANTONSEN, S. A., KOROLL, G. H., KREMERS, H., SINGH, H.: Radiolysis and Photolysis of Aqueous Aereated Tryptophan Solutions in: Bors, W., Saran, M., Tait, D.; *Oxygen Radicals in Chemistry and Biology*, 491-500, Walter de Gruyter & Co., Berlin (1984).

SNAUWAERT, F., TOBBACK, P. P., MAES, E.: Carotenoid Stability during Radurization of the Brown Shrimp (*Crangon vulgaris* Fabr.), *Lebensm. Wiss. Technol.*, 6, 7-10 (1973).

SOLAR, S., SOLAR, W., GETOFF, N.: Reactivity on OH with Tyrosine in Aqueous Solution Studied by Pulse Radiolysis, *J. Phys. Chem.*, 88, 2091-2095 (1984).

SOUCI, FACHMANN, KRAUT: *Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert Tabellen*, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1994).

STADTMAN, E. R.: Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-Catalyzed Reactions, *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 797-821 (1993).

STADTMAN, E. R., BERLETT, B. S.: Fenton Chemistry. Amino Acid Oxidation, *J. Biol. Chem.* , 266, 17201-17211 (1991).

STEVENSON, M. H., GRAY, R.: Can ESR Spectroscopy Be Used to Detect Irradiated Food? in: Johnston, D. E., Stevenson, M. H.; *Food Irradiation and the Chemist*, 1-12, Royal Society of Chemistry, Cambridge (1990).

STULIK, K., PACAKOVA, V., WEINGART, M.: High-performance Liquid Chromatography of Tryptophan and its Irradiation Products Using UV Photometric and Voltammetric Detection, *J. Chromatogr.*, 354, 449-453 (1986).

SUDARMADJI, S., URBAIN, W. M.: Flavor Sensitivity of Selected Animal Protein Foods to Gamma Radiation, *J. Food Sci.*, 37, 671-672 (1972).

---

TAKADA, K., AOKI, T., KUNISAKI, N.: Proximate Composition, Free Amino Acid, Fatty Acid, Mineral and Cholesterol Contents in Imported Frozen Shrimps, *Nippon Suisan Gakkaishi Bull. Jap. Sci. Fish.*, 54, 2173-2179 (1988).

TANAKA, T.: The Decomposition of L-Tyrosine and Its Derivatives by *Proteus Vulgaris*. 4. The Decomposition Pathway of p-Hydroxyphenyllactic Acid, p-Hydroxyphenylacrylic Acid and p-Hydroxyphenylpropionic Acid, *Bull. Pharm. Res. Inst.*, 74, 1-10 (1968).

TAUB, I. A., KAPRIELIAN, R. A., HALLIDAY, J. H.: Radiation Chemistry of High Protein Foods Irradiated at Low Temperature in: Proceedings Series International Atomic Energy Agency; *Food Preservation by Irradiation*, Band 1, 371-383, Wien (1978).

THAKUR, B. R., SINGH, R. K.: Food Irradiation – Chemistry and Applications, *Food Rev. Int.*, 10, 437-473 (1994).

TOMODA, T., TANAKA, T.: Studies on the Decomposition of Tyrosine and Tyramine by Mycobacteria, *Bull. Pharm. Res. Inst.*, 76, 1-4 (1968).

TUUMINEN, T., PALOMAKI, P., RAKKOLAINEN, A., WELIN, M.-G., WEBER, T., KAPYAHO, K.: 3-p-Hydroxyphenylpropionic Acid – A Sensitive Fluorogenic Substrate for Automated Fluorometric Enzyme Immunoassays, *J. Immunoassay*, 12, 29-46 (1991).

TZEDAKIS, T., SAVALL, A., CLIFTON, M. J.: The Electrochemical Regeneration of Fenton's Reagent in the Hydroxylation of Aromatic Substrates: Batch and Continuous Process, *J. Appl. Electrochem.*, 19, 911-921 (1989).

URBAIN, W. M.: *Food Irradiation*, Academic Press, Orlando Florida (1986).

VAN CLEEMPUT, O., DEBEVERE, J., DEBEVERE, P., BAERT, L.: Gamma Irradiation of Tropical Shrimps, *Lebensm. Wiss. Technol.*, 13, 322-323 (1980).

VAN WICKERN, B.: Identifizierung von Radiolyseprodukten des Tryptophans in proteinreichen Lebensmitteln nach  $\gamma$ -Bestrahlung, Dissertation Universität Hamburg (1997).

VAN WICKERN, B., MÜLLER, B., SIMAT, T. J., STEINHART, H.: Determination of  $\gamma$ -Radiation Induced Products in Aqueous Solutions of Tryptophan and Synthesis of 4-, 6- and 7-Hydroxytryptophan, *J. Chromatogr. A*, 786, 57-65 (1997).

VON SONNTAG, C.: *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor & Francis, London (1987).

WALLING, C.: Fenton's Reagent Revisited, *Acc. Chem. Res.*, 8, 125-131 (1975).

WEBER, R. E., VAN MARREWIJK, W. J. A.: Free Amino Acids in the Shrimp *Crangon crangon* and their Osmoregulatory Significance, *Neth. J. Sea Res.*, 5, 391-415 (1972).

WEEKS, B. M., GARRISON, W. M.: Radiolysis of Aqueous Solutions of Glycine, *Radiat. Res.*, 9, 291-304 (1958).

WELSH, W. J., LIN, W., TERSIGNI, S. H., COLLANTES, E., DUTA, R., CAREY, M. S., ZIELINSKI, W. L., BROWER, J., SPENCER, J. A., LAYLOFF, T. P.: Pharmaceutical Fingerprinting: Evaluation of Neural Networks and Chemometric Techniques for Distinguishing among Same-Product Manufacturers, *Anal. Chem.*, 68, 3473-3482 (1996).

WHO: High-Dose Irradiation: Wholesomeness of Food Irradiated with Dosis above 10 kGy. Report on a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee, *WHO Techn. Rep. Ser.* 890, World Health Organization, Genf (1999).

WHO: *FOOD and Environmental Protection Newsletter: Supplement*, Volume 1, Issue 2, June (1998).

---

WHO: Safety and Nutritional Adequacy of Irradiated Food, World Health Organization, Genf (1994).

WHO: Food-Irradiation – a Technique for Preserving and Improving the Safety of Food, World Health Organization, 1-84, Genf (1988).

WINK, D. A., NIMS, R. W., SAAVEDRA, J. E., UTERMAHLEN Jr., W. E., FORD, P. C.: The Fenton Oxidation Mechanism: Reactivities of Biologically Relevant Substrates with Two Oxidizing Intermediates Differ from those Predicted for the Hydroxyl Radical, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 6604-6608 (1994).

YOOK, H.-S., LEE, J.-W., LEE, K.-H., KIM, M.-K., SONG, C.-W., BYUN, M.-W.: Effect of Gamma Irradiation on the Microstructure and post-mortem Anaerobic Metabolism of Bovine Muscle, *Radiat. Phys. Chem.*, 61, 163-169 (2001).





## 10 Anhang

### 10.1 Chemikalien und Geräte

#### 10.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Gefahrenhinweise
1-Butanol	Merck	Xn; R: 10-20; S: 16
3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure	Aldrich	
3-Hydroxybenzoesäure	Fluka	Xi; R: 22-36/37/38; S: 26-36
4-Hydroxybenzoesäure	Merck	Xi; R: 36
4-Hydroxytryptophan		
5-Hydroxytryptophan	Merck	Xn; R: 22
5-Methyltryptophan	Sigma	
6-Hydroxytryptophan		
7-Hydroxytryptophan		
Acetonitril f. die HPLC	Baker	T, F; R: 11-23/24/25; S: 16-27-45
Alanin, L-	Degussa	
Ameisensäure 98%	Merck	C; R: 35; S: 2-23-26
Ammoniak 25%	Merck	Xi; R: 36/37/38; S: 2-26
Arginin-Base, L-	Degussa	
Ascorbinsäure, L(+)-	Merck	
Asparagin, L-	Degussa	
Asparaginsäure, L-	Merck	
Benzoessäure	Merck	Xn; R: 22-36; S: 24
Dichlormethan	Merck	K3, Xn; R: 40; S: 23.2-24/25-36/37
Diethylether	Merck	F+; R: 12-19; S: 9-16-29-33
Eisen(II)-sulfat-heptahydrat	Merck	Xn; R: 22-36/37/38; S: 26-36
Essigsäure 100%	Merck	C; R: 10-35; S: 2-23-26
Glutamin, L-	Sigma	S: 22-24/25
Glutaminsäure, L-	Degussa	
Glycin	Merck	22-24/25
Histidin-Base, L-	Degussa	
Isoleucin, L-	Degussa	
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	
Leucin, L-	Degussa	
Lysin-hydrochlorid, L-	Degussa	
Methanol f. die HPLC	Merck	T, F; R: 11-23/25; S: 7-16-24-45
Methionin, L-	Degussa	
Natriumcarbonat	Merck	Xi; R: 36; S: 22-26

Chemikalie	Hersteller	Gefahrenhinweise
Natriumethylenediamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma	Xn; R: 22-36/37/38; S: 26-36
<i>d</i> -Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat	Merck	
Natriumhydroxid	Merck	C; R: 35; S: 2-26-37/39-45
Natriumsulfat	Merck	
Perchlorsäure 60%	Merck	O, C; R: 5-8-35; S: 23.2-26-36/37/39-45
Phenol	Merck	T; R: 24/25-34; S: 28.6-45
Phenylalanin, L-	Degussa	
Prolin, L-	Degussa	
Serin, L-	Degussa	
Sulfosalicylsäure-2-hydrat, 5-	Merck	Xi; R: 36/37/38; S: 26-36
Threonin, L-	Degussa	
Trichloressigsäure	Merck	C; R: 35; S: 24/25-26
Trifluoressigsäure, Uvasol	Merck	C; R: 20-35; S: 9-26-27-28-45
Tryptophan, L-	Ajinomoto	
Tyrosin, L-	Merck	
Valin, L-	Degussa	
Wasserstoffperoxid 30%	Merck	C; R: 34; S: 3-28-36/39-45

4-, 6- und 7-OH-TRP wurden im Arbeitskreis synthetisiert (VAN WICKERN et al., 1997).

### 10.1.2 Geräte

#### HPLC-Systeme

##### HPLC-ECD

- Pumpe: - Merck-Hitachi L-6200 A Intelligent Pump
- Probenaufgabe: - TSP SpectraSeries AS 100 Autosampler
- Detektoren: - TSP EC2000 Elektrochemischer Detektor  
 Arbeitselektrode: Glassy Carbon  
 Referenzelektrode: Silber/Silberchlorid  
 - Merck-Hitachi L-4250 UV/VIS-Detektor
- Auswertesysteme: - SCPA GmbH Chromstar Software, Version 4.05  
 - Bio-TEK Kontron Instruments KromaSystem 2000, Version 8.1

---

**HPLC-PDA/FL**

- Pumpe: - Merck-Hitachi L-6200 A Intelligent Pump  
Probenaufgabe: - Merck-Hitachi 655A-40 Autosampler  
Degasser: - Uniflows Degasys DG-1310  
Säulenofen: - LKB Bromma 2155 Column Thermostat  
Detektoren: - Bio-TEK Kontron Instruments 540 Diode Array Detector  
- Merck-Hitachi F-1080 Fluoreszenz Detektor  
Auswertesystem: - Bio-TEK Kontron Instruments KromaSystem 2000, Version 8.1

**HPLC-MS**

- Pumpe: - HP 1100 Series G 1312 A Binary Pump  
Probenaufgabe: - HP 1100 Series G 1313 A Autosampler  
Degasser: - HP 1100 Series G 1322 A Degasser  
Säulenofen: - HP 1100 Series G 1316 A Column Thermostat  
Detektoren: - HP 1100 Series G1314 A UV-Detektor  
- HP 1100 Series G 1946 A Massenselektiver Detektor  
Auswertesystem: - HP HPLC-MS ChemStation, Version A.06.01

**GC-MS**

- GC: - HP 5890 Series II  
Detektor: - HP 5971 A Massenselektiver Detektor  
Auswertesystem: - HP GC-MS ChemStation, Version A.03.00

**PH-Meter:** WTW, pH Digi 520

**Schüttler:** Edmund Bühler, Swip KL-2

**SPE-Box:** Baker-Box SPE-10

**Ultraturrax:** IKA-Labortechnik, T25

**Vakuumrotationsverdampfer:** Heidolph

**Zentrifuge:** Sigma 3 K12

## 10.2 HPLC-Bedingungen

### 10.2.1 Bestimmung des TRP-Gehaltes in Garnelenserum

Säule: Nucleosil 120-3 RP18, 250 x 4 mm  
 Detektion: Merck-Hitachi F 1080 Fluoreszenz Detektor  
 Ex/Em = 285/340 nm  
 Flow: 1 mL/min  
 Temperatur: 30 °C  
 Eluent: 0,1% TFA in bidest. Wasser/MeCN 84/16 (v/v)

### 10.2.2 Bestimmung von TRP und 5-OH-TRP in dotiertem Garnelenserum (Test verschiedener Deproteinierungsmethoden)

Säule: Nucleosil 120-3 RP18, 250 x 4 mm  
 Detektion: Merck-Hitachi F 1080 Fluoreszenz Detektor  
 Ex/Em = 285/340 nm  
 Flow: 1 mL/min  
 Temperatur: 30 °C  
 Eluent: Gradient: A: 0,1% TFA in bidest. Wasser  
 B: MeCN

min	A (%)	B (%)
0	95	5
13	95	5
30	55	45
35	55	45
36	95	5
43	95	5

### 10.2.3 Bestimmung von 5-OH-TRP (Versuche zur Charakterisierung der Festphasen)

Säule: Nucleosil 120-3 RP18, 250 x 4 mm  
 Detektion: Merck-Hitachi L-4250 UV/VIS-Detektor  
 260 nm  
 Flow: 1 mL/min  
 Temperatur: 30 °C  
 Eluent: Gradient: A: 0,1% TFA in bidest. Wasser  
 B: MeCN

min	A (%)	B (%)
0	92	8
10	92	8
10,1	50	50
14	50	50
14,1	92	8
20	92	8

#### 10.2.4 Bestimmung der OH-TRP-Isomere in Garnelenserum

Säule: Nucleosil 120-3 RP18, 250 x 4 mm  
 Detektion: TSP EC2000 Elektrochemischer Detektor  
 Arbeitselektrode: Glassy Carbon  
 Referenzelektrode: Silber/Silberchlorid  
 Oxidationspotential: +0,75 V  
 Flow: 1 mL/min  
 Temperatur: 30 °C  
 Eluent: 0,1% TFA in bidest. Wasser/MeOH 93/7 (v/v)

#### 10.2.5 Screening auf unbekannte Bestrahlungsmarker in eiweißreichen Lebensmitteln

Säulen: - Nucleosil 120-3 RP18, 250 x 4 mm  
 - Phenomenex Aqua RP18, 250 x 4 mm  
 Detektion: - TSP EC2000 Elektrochemischer Detektor  
 Arbeitselektrode: Glassy Carbon  
 Referenzelektrode: Silber/Silberchlorid  
 Oxidationspotential: +1,15 V  
 - Bio-TEK Kontron Instruments 540 Diode Array Detector  
 220 nm  
 - Merck-Hitachi F-1080 Fluoreszenz Detektor  
 Ex/Em = 270/315 nm  
 - HP 1100 Series G 1946 A Massenselektiver Detektor  
 Flow: 1 mL/min  
 Temperatur: 30 °C  
 Eluenten: - Proben ohne Anreicherung:  
 0,1% TFA in bidest. Wasser/MeCN 95/5 (v/v) (PDA, FLD, ECD)  
 Gradient (PDA, FL): A: 0,1% TFA in bidest. Wasser  
 B: MeCN

min	A (%)	B (%)
0	95	5
5	95	5
40	65	35
51	65	35
52	20	80
57	20	80
58	95	5
68	95	5

- Proben mit Anreicherung:

0,1% TFA in bidest. Wasser/MeCN 95/5, 85/15 v/v (PDA, FLD, ECD)

Essigsäure pH 3/MeCN 95/5, 85/15 v/v (PDA, FLD, MSD)

**Table 10.1** Parameter für die massenselektive Detektion

Methode	1	2
Ionenquelle	AP-ESI	AP-CI
Polarität	positiv	negativ
Drying Gas Flow	12 L/min	8 L/min
Drying Gas Temperature	350 °C	300 °C
Nebulizer Pressure	50 psig	50 psig
Capillary Voltage	4000 V	4000 V
Corona Current	-	10
Fragmentorspannung	70 V	70 V
Ionenspuren	Scan	Scan
	m/z 70-250	m/z 70-250

### 10.2.6 Bestimmung der Benzoessäure-Radiolyseprodukte in konservierten Nordseegarnelen

Säule: Nucleosil 120-3 RP18, 250 x 4 mm  
 Detektion: TSP EC2000 Elektrochemischer Detektor  
 Arbeitselektrode: Glassy Carbon  
 Referenzelektrode: Silber/Silberchlorid  
 Oxidationspotential: +1,15 V  
 Flow: 1 mL/min  
 Temperatur: 30 °C  
 Eluent: 0,1% TFA in bidest. Wasser/MeCN 95/5 (v/v)

### 10.2.7 Bestimmung von HPPA in eiweißreichen Lebensmitteln

Säulen: Multospher RP18, 250 x 4 mm  
 Detektion: - Merck-Hitachi F-1080 Fluoreszenz Detektor  
                   Ex/Em = 276/310 nm  
                   - HP 1100 Series G 1946 A Massenselektiver Detektor  
 Flow: 1 mL/min  
 Temperatur: 30 °C  
 Eluent: Essigsäure pH 3/MeCN 87,5/12,5

***Tabelle 10.2*** Parameter für die massenselektive Detektion

Parameter	Bestimmung von HPPA
Ionenquelle	AP-CI
Polarität	negativ
Drying Gas Flow	6 L/min
Drying Gas Temperature	350 °C
Nebulizer Pressure	50 psig
Capillary Voltage	3800 V
Corona Current	20
Fragmentorspannung	70 V
Ionenspur	SIM
	m/z 165 [M-H] <sup>-</sup>

### 10.3 GC-MS-Bedingungen

Säule: HP-1 (15 m, 0,25 mm ID, 0,33 µm)  
 Trägergas: Helium (1 mL/min)  
 Injektor: Splitless, 250 °C  
 Detektion: HP 5971 A Massenselektiver Detektor

***Tabelle 10.3*** Parameter für die massenselektive Detektion

Parameter	Identifizierung flüchtiger Radiolyseprodukte
Ionisierungsverfahren	Electron Impact
Ionenspuren	Scan
	m/z 50-550
Threshold	500

Temp.-Programm: 60 °C (3 min) – 5 °C/min – 280 °C (20 min)

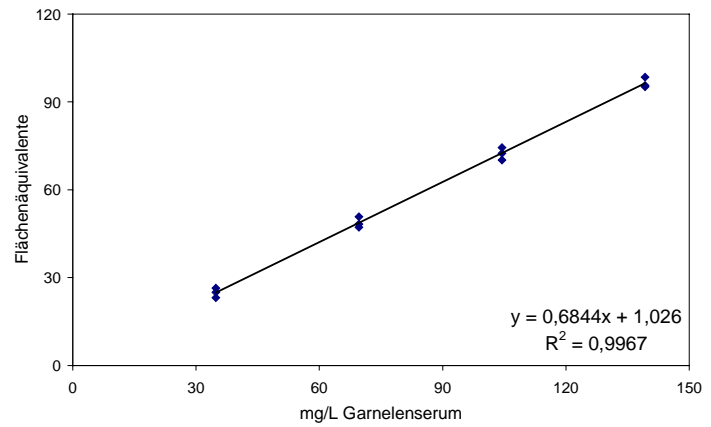
## 10.4 Kalibriergeraden und Verfahrenskenndaten

### 10.4.1 TRP

#### TRP

FL-Detektion

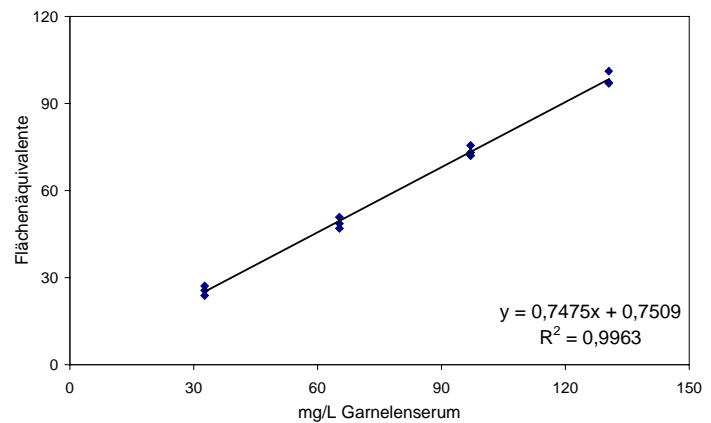
Ex/Em = 285/340



#### 5-Me-TRP

FL-Detektion

Ex/Em = 285/340



**Tabelle 10.4** Verfahrenskenndaten für die TRP-Bestimmung

Verfahrenskenndaten	TRP	5-Me-TRP
Achsenabschnitt a	1,0260	0,7509
Steigung b	0,6844	0,7476
Korrelationskoeffizient r	0,9984	0,9982
Reststandardabweichung der Geraden $S_{gr}$	1,67	1,81
Verfahrensstandardabweichung $S_x$ (mg/L)	2,44	2,42
Verfahrenvariationskoeffizient $CV_x$ (%)	2,80	2,97

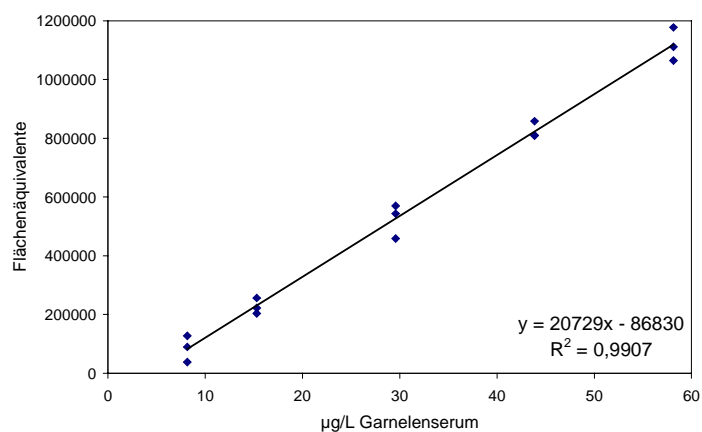


## 10.4.2 OH-TRP-Isomere

### 4-OH-TRP

EC-Detektion

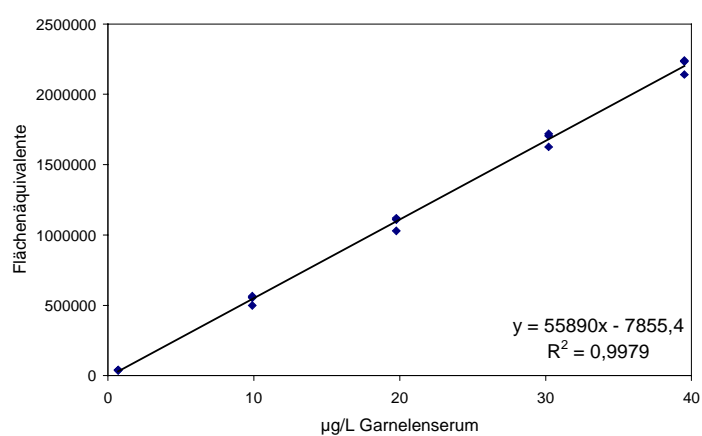
+ 0,75 V



### 5-OH-TRP

EC-Detektion

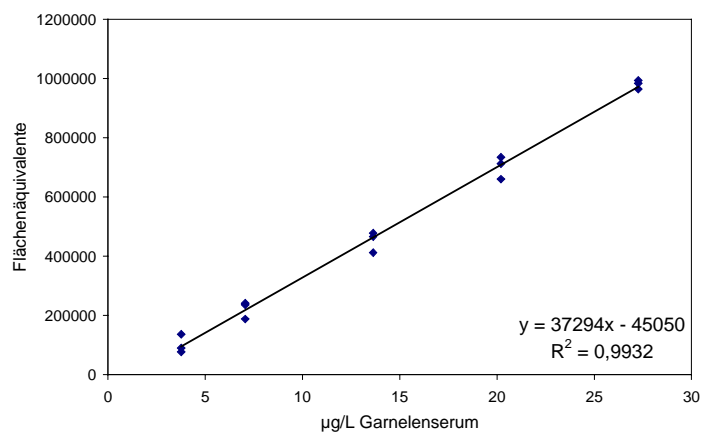
+ 0,75 V



### 6-OH-TRP

EC-Detektion

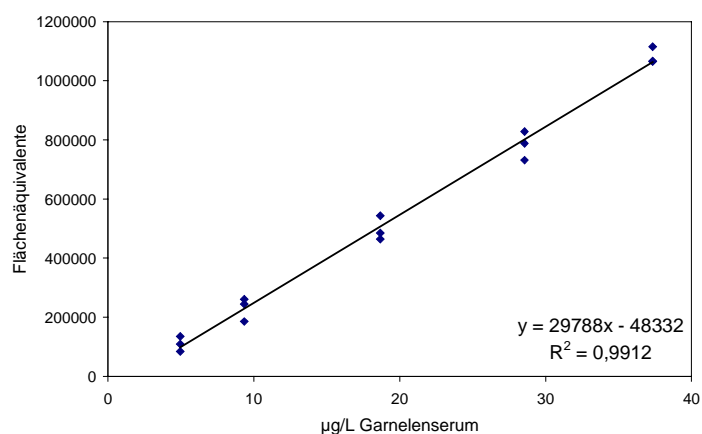
+ 0,75 V



### 7-OH-TRP

EC-Detektion

+ 0,75 V



**Tabelle 10.5** Verfahrenskenndaten für die Bestimmung der OH-TRP-Isomere

Verfahrenskenndaten	4-OH-TRP	5-OH-TRP	6-OH-TRP	7-OH-TRP
Achsenabschnitt a	-86830	-7855	-45050	-48332
Steigung b	20729	55890	37294	29788
Korrelationskoeffizient r	0,9953	0,9989	0,9966	0,9956
Reststandardabweichung der Geraden $S_{gr}$	39524	38188	28311	36143
Verfahrensstandardabweichung $S_x$ ( $\mu\text{g/L}$ )	1,91	0,68	0,76	1,21
Verfahrenvariationskoeffizient $CV_x$ (%)	6,15	3,41	5,28	6,14
Nachweisgrenze <sup>1</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	5,9	0,6	1,4	2,2

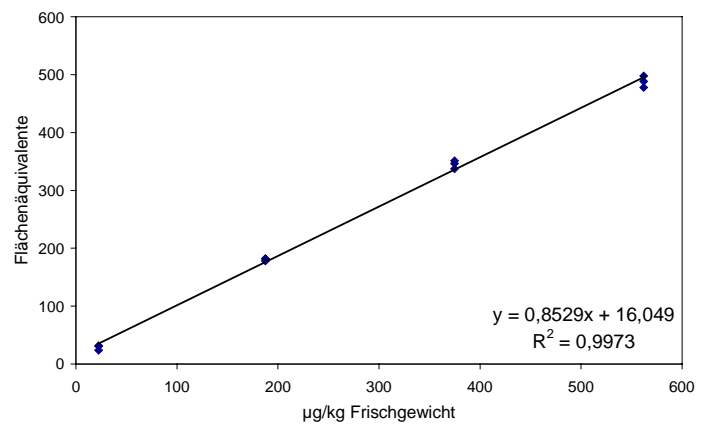
1 = Signal/Rausch-Verhältnis 3:1

### 10.4.3 BA-Radiolyseprodukte

#### 3-OH-BA

EC-Detektion

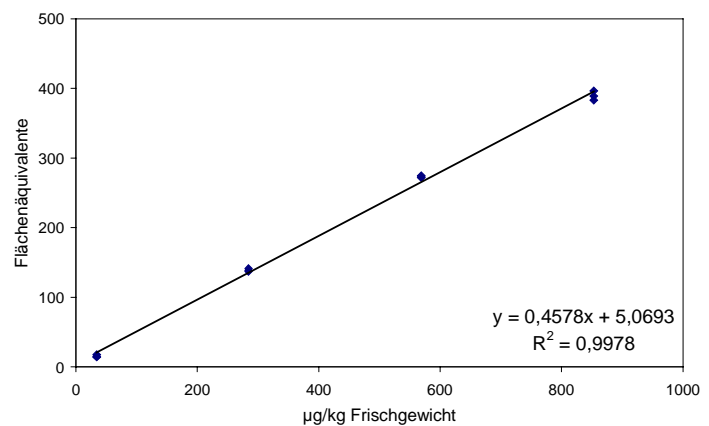
+ 1,15 V



#### 4-OH-BA

EC-Detektion

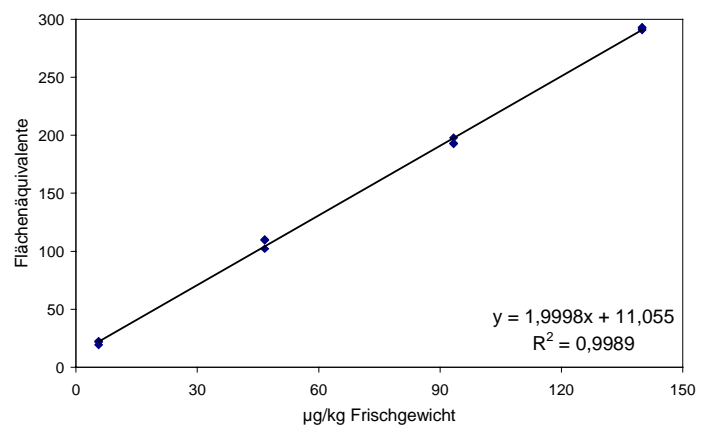
+ 1,15 V



#### Phenol

EC-Detektion

+ 1,15 V



**Tabelle 10.6** Verfahrenskenndaten für die Bestimmung der BA-Radiolyseprodukte

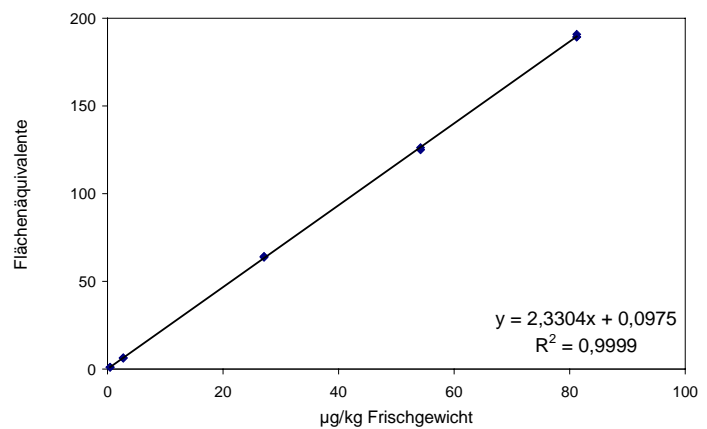
Verfahrenskenndaten	3-OH-BA	4-OH-BA	Phenol
Achsenabschnitt a	16,0488	5,0693	11,0553
Steigung b	0,85290	0,45778	1,99983
Korrelationskoeffizient r	0,9986	0,9989	0,9995
Reststandardabweichung der Geraden $S_{gr}$	9,836	7,290	3,587
Verfahrensstandardabweichung $S_x$ ( $\mu\text{g/kg}$ )	11,53	15,92	1,79
Verfahrenvariationskoeffizient $CV_x$ (%)	4,02	3,66	2,51
Nachweisgrenze <sup>1</sup> ( $\mu\text{g/kg}$ Frischgewicht)	25	40	5

1 = Signal/Rausch-Verhältnis 3:1

#### 10.4.4 HPPA

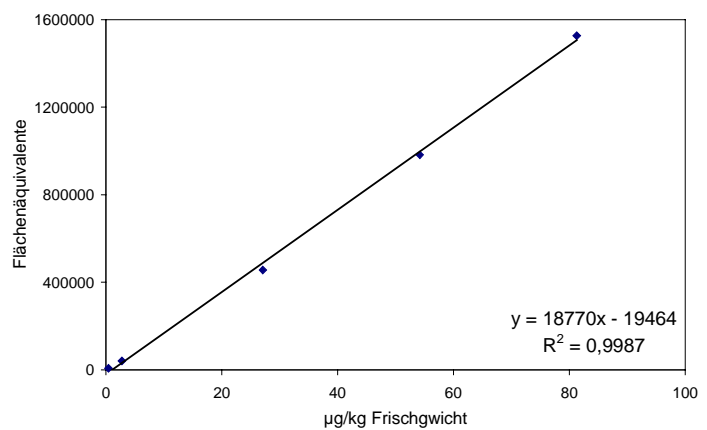
FL-Detektion

Ex/Em = 276/310



MS-Detektion

CI negativ

 $m/z = [M-H]^-$ **Tabelle 10.7** Verfahrenskenndaten für die HPPA-Bestimmung

Verfahrenskenndaten	FL-Detektion	MS-Detektion
Achsenabschnitt a	0,0975	-19464,0
Steigung b	2,33043	18770,0
Korrelationskoeffizient r	1,0000	0,9994
Reststandardabweichung der Geraden $S_{gr}$	0,748	26962,5
Verfahrensstandardabweichung $S_x$ ( $\mu\text{g/kg}$ )	0,32	1,44
Verfahrenvariationskoeffizient $CV_x$ (%)	0,97	4,34
Nachweisgrenze <sup>1</sup> ( $\mu\text{g/kg}$ Frischgewicht)	0,13	0,25

1 = Signal/Rausch-Verhältnis 3:1

## **10.5 Probenvorbereitung**

### **10.5.1 Garnelen**

#### **Nordseegarnelen**

Es wurden ungeschälte, gekochte Nordseegarnelen auf dem Wochenmarkt gekauft und sofort geschält. Das Garnelenfleisch wurde in Portionen zu ca. 50 g in PE-Folie eingeschweißt und anschließend bei -18 °C tiefgefroren.

Für das Screening wurden zusätzlich Nordseegarnelen direkt vom Fischer bezogen, die nach dem Fang auf See nicht wie die kommerziell erhältlichen Nordseegarnelen unter Zusatz von NaCl und Benzoesäure gekocht wurden. Diese Garnelen wurden ebenfalls nach dem Schälen in Portionen zu ca. 50 g in PE-Folie eingeschweißt und anschließend bei -18 °C tiefgefroren.

#### **Black Tiger und Tiefsee Shrimps**

Im Supermarkt wurden tiefgefrorene, glasierte Tiefsee und Black Tiger Shrimps gekauft und in Portionen zu ca. 50 g in PE-Folie eingeschweißt. Die Proben wurden bei -18 °C gelagert.

### **10.5.2 Hühnerbrustfleisch**

Im Supermarkt wurde frische Hühnerbrust gekauft und in Stücke von ca. 50 g portioniert. Jedes Stück wurde in PE-Folie eingeschweißt und anschließend bei -18 °C tiefgefroren.

### **10.5.3 Hühnereiklar**

Zur Untersuchung des Eiklars wurden Hühnereier (Handelsklasse 4) aufgeschlagen und das Eiklar isoliert. Aus dem gesammelten Eiklar wurde ein Mischmuster hergestellt. Das Eiklar wurde in weichmacherfreie 20 mL PE-Gefäße (Fa. Zinsser) gefüllt. Alle Proben wurden sofort bei -18 °C tiefgefroren.

Der zur Bestrahlung bei Raumtemperatur vorgesehene Anteil der Proben wurde erst kurz vor der Bestrahlung aufgetaut und direkt danach wieder eingefroren. Alle Proben wurden bis zur Analyse bei -18 °C gelagert.

### 10.5.4 Modell-Lösungen

Für die Modell-Versuche wurde eine Aminosäure-Modell-Lösung nach folgendem Schema (Tabelle 10.8) hergestellt:

**Tabelle 10.8** Zusammensetzung der Aminosäure-Modell-Lösung

Aminosäure	Gehalt in der Modell-Lösung (mg/L)
Alanin	940,3
Arginin	1035,6
Asparagin	34,6
Asparaginsäure	12,4
Glutamin	427,6
Glutaminsäure	187,7
Glycin	12473,8
Histidin	51,2
Isoleucin	60,8
Leucin	113,2
Lysin	51,3
Methionin	64,6
Phenylalanin	27,2
Prolin	1497,0
Serin	86,0
Threonin	48,4
Tyrosin	30,9
Valin	120,4

Ein Aliquot wurde mit 135,9 mg/L TRP versetzt. Außerdem wurden eine TRP-Lösung (135,9 mg/L) und eine Benzoesäure (BA)-Lösung (14,75 g/L) hergestellt. Alle Lösungen wurden in weichmacherfreie 20 mL PE-Gefäße (Fa. Zinsser) gefüllt und bis zur Bestrahlung bei -18 °C tiefgefroren. Kurz vor der Bestrahlung wurden die Proben aufgetaut und bei Raumtemperatur bestrahlt. Anschließend wurden sie tiefgefroren bis zur Analyse gelagert.

## 10.6 Bestrahlungsbedingungen

In den Tabellen 10.9 und 10.10 sind die Bestrahlungsbedingungen aufgeführt.

**Tabelle 10.9** Bestrahlung im gefrorenen Zustand

Zieldosis	1 kGy	3 kGy	5 kGy	10 kGy
Temperatur (vor Bestrahlung)	-19,8 °C	-13,4 °C	-18,0 °C	-10,8 °C
Temperatur (nach Bestrahlung)	-13,4 °C	-6,9 °C	-11,0 °C	-3,7 °C
Erreichte Dosis (oben)	1,1 kGy	2,5 kGy	4,8 kGy	10,1 kGy
Erreichte Dosis (unten)	0,9 kGy	3,0 kGy	5,1 kGy	9,7 kGy

**Tabelle 10.10** Bestrahlung bei Raumtemperatur

Zieldosis	1 kGy	3 kGy	5 kGy	10 kGy
Erreichte Dosis (innen)	0,9 kGy	3,0 kGy	4,3 kGy	8,6 kGy
Erreichte Dosis (außen)		3,5 kGy	4,7 kGy	9,4 kGy

## 10.7 Bestimmung von OH-TRP-Isomeren in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen

### 10.7.1 Bestimmung von TRP in Garnelenserum

#### Lösungen:

- Interner Standard (IS): 5-Me-TRP 231,5 mg/L
- Garnelenserum: Die homogenisierten Nordseegarnelen wurden zur Abtrennung unlöslicher Matrixbestandteile ausgepresst. Aus ca. 5 g Garnelen wurde 1 mL Presssaft gewonnen.

250  $\mu$ L Garnelenserum wurden mit 100  $\mu$ L 5-Me-TRP-Lösung (IS), 880  $\mu$ L bidest. Wasser und 20  $\mu$ L Essigsäure (100%) versetzt. Anschließend wurde 20 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:5 verdünnt und mittels HPLC analysiert (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 10.2.1).

Die Auswertung erfolgte über den IS anhand einer Kalibriergeraden (Ergebnisse siehe Tabelle 10.11). Es wurden jeweils fünf Bestimmungen durchgeführt.

**Tabelle 10.11** TRP-Gehalt in verschiedenen Nordseegarnelen

Probe	geschält	geschält	geschält	ungeschält	ungeschält	ungeschält
	1	2	3	1	2	3
1	100,8	124,2	120,9	79,3	113,6	113,6
2	103,6	125,4	120,8	83,8	109	115,9
3	101,5	123,4	124,4	86,1	106,8	111
4	107,5	124,3	117,9	85,6	108,9	116,5
5	103,3	125,8	121,1	79,8	114,1	116,5
Mittelwert	103,3	124,6	121,0	82,9	110,5	114,7
Std.-Abw.	2,33	0,87	2,06	2,86	2,87	2,14

### 10.7.2 Bestimmung des TRP-Verlusts in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen

Die Bestimmung des TRP-Gehalts in den  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen und einer unbestrahlten Vergleichsprobe erfolgte analog zur TRP-Bestimmung in verschiedenen Nordseegarnelen (siehe Anhang 10.7.1).

Der prozentuale TRP-Verlust bei Bestrahlung mit 1, 3 und 5 kGy ist in Tabelle 10.12 dargestellt. Es wurden jeweils drei Bestimmungen durchgeführt.

**Tabelle 10.12** TRP-Verlust (%) in  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen

Probe	Bestrahlungsdosis (kGy)		
	1	3	5
1	6,27	6,20	8,94
2	6,49	8,19	6,26
3	3,77	6,36	14,22
Mittelwert	5,51	6,91	9,81
Std.-Abw.	1,23	0,90	3,31



### **10.7.3 Clean-up**

#### **10.7.3.1 Deproteinierung**

##### **Lösungen:**

- Perchlorsäure 6%
- Trichloressigsäure 30%
- Sulfosalicylsäure 8%
- TRP 219,2 mg/L
- 5-OH-TRP 208,0 mg/L
- Garnelenserum: Die homogenisierten Nordseegarnelen wurden zur Abtrennung unlöslicher Matrixbestandteile ausgepresst. Aus ca. 5 g Garnelen wurde 1 mL Presssaft gewonnen.

##### **Essigsäurefällung:**

250 µL Garnelenserum wurden mit je 250 µL TRP- und 5-OH-TRP-Lösung, 230 µL bidest. Wasser und 20 µL Essigsäure (100%) versetzt. Anschließend wurde 20 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:100 verdünnt und mittels HPLC analysiert.

##### **Perchlorsäurefällung:**

100 µL Garnelenserum wurden mit je 100 µL TRP- und 5-OH-TRP-Lösung, 700 µL bidest. Wasser und 1 mL Perchlorsäure-Lösung versetzt. Anschließend wurde 20 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:25 verdünnt und mittels HPLC analysiert.

##### **Trichloressigsäurefällung:**

250 µL Garnelenserum wurden mit je 250 µL TRP-, 5-OH-TRP-Lösung und bidest. Wasser und 100 µL Trichloressigsäure-Lösung versetzt. Anschließend wurde 20 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:125 verdünnt und mittels HPLC analysiert.

**Sulfosalicylsäurefällung:**

200 µL Garnelenserum wurden mit je 200 µL TRP-, 5-OH-TRP-Lösung und bidest. Wasser und 1 mL Sulfosalicylsäure-Lösung versetzt. Anschließend wurde 20 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde 2:125 verdünnt und mittels HPLC analysiert.

**Ultrafiltration:**

250 µL Garnelenserum wurden mit je 250 µL TRP-, 5-OH-TRP-Lösung und bidest. Wasser versetzt. Anschließend wurde 3 h bei 5000 x g und 4 °C durch einen Ultrafilter (Centricon Concentrator, Ausschlussgrenze 30 kDa) zentrifugiert. Das Filtrat wurde 1:125 verdünnt und mittels HPLC analysiert.

Für jede Deproteinierungsmethode wurde zur TRP-Bestimmung undotiertes Garnelenserum analog behandelt. Statt der TRP- und 5-OH-TRP-Lösungen wurde bidest. Wasser zugegeben.

Die Wiederfindungsraten (Tabelle 10.13) wurden anhand von externen Kalibriergeraden mittels HPLC-FL-Detektion bestimmt (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 10.2.2).

**Tabelle 10.13** Wiederfindungsraten von TRP und 5-OH-TRP in dotiertem Garnelenserum bei verschiedenen Deproteinierungsmethoden

Methode		TRP	5-OH-TRP
Essigsäure	Mittelwert*	94,1	97,7
	Std.-Abw.*	1,34	0,83
Perchlorsäure	Mittelwert	94,9	95,2
	Std.-Abw.	0,60	0,89
Trichloressigsäure	Mittelwert	99,8	89,8
	Std.-Abw.	1,85	0,6
Sulfosalicylsäure	Mittelwert	90,2	80,0
	Std.-Abw.	0,88	1,15
Ultrafiltration	Mittelwert	96,7	82,5
	Std.-Abw.	8,08	7,61

\*Mittelwert = Mittelwert aus 5 Messungen (%)

\*Std.-Abw. = Standardabweichung (%)

### 10.7.3.2 Ionenaustauschchromatographie

#### Lösungen:

- Salzsäure 1 M
- Phosphat-Puffer-Gemisch (GROSSI et al., 1990):  
Natriumdihydrogenphosphat (50 mMol/L, pH 2,8)/MeOH/MeCN 77/15/8 (v/v/v)
- 5-OH-TRP 395,4 µg/L: Die Lösung wurde mit Essigsäure auf pH 3,5 eingestellt.

#### Säulenkonditionierung:

- 2 Säulenfüllungen MeOH
- 2 Säulenfüllungen bidest. Wasser

#### Ionenaustausch-SPE

Probenaufgabe: 1 mL 5-OH-TRP-Lösung pH 3,5

Waschen: 2 mL bidest. Wasser

Elution: 1. 2 mL Salzsäure 1 M oder  
2. 2 mL Phosphat-Puffer-Gemisch (GROSSI et al., 1990)

Alle Eluate wurden mittels HPLC-FL-Detektion analysiert (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 10.2.3). Die Wiederfindungsraten für 5-OH-TRP wurden über Einpunktkalibrierung mit einer externen Standardlösung bestimmt (siehe Tabelle 10.14).

**Tabelle 10.14** Ergebnisse des Kationenaustauscher-Säulentests

Typ	Säule	Proben- aufgabe	Wiederfindung 5-OH-TRP		
			Waschen	Elution 1 M HCl	Elution Puffer
Benzolsulfonsäure 500 mg	IST SCX	-	-	-	-
	Merck SCX	-	-	-	-
	Varian SCX	-	-	-	-
Propylsulfonsäure 500 mg	IST PRS	-	-	33%	42%
	Varian PRS	-	-	52%	76%
Carboxymethyl 500 mg	IST CBA	-	65%	n.b.	n.b.
	Varian CBA	1%	73%	n.b.	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

- = nicht nachweisbar

### 10.7.3.3 Charakterisierung der PRS-Kationenaustauscher (Fa. IST)

#### Lösungen:

- 5-OH-TRP-Standardlösung (5  $\mu\text{Mol/mL}$ )
- 5-OH-TRP-Standardlösung (5  $\mu\text{Mol/mL}$ ) + Natriumchlorid (27  $\mu\text{Mol/mL}$ )
- 5-OH-TRP-Standardlösung (5  $\mu\text{Mol/mL}$ ) + L-Alanin (8  $\mu\text{Mol/mL}$ )

#### Säulenconditionierung:

- 2 Säulenfüllungen MeOH
- 2 Säulenfüllungen bidest. Wasser

#### Versuch 1: Bestimmung der Kapazität des PRS-Kationenaustauschers

Aliquote der 5-OH-TRP-Standardlösung (5  $\mu\text{Mol/mL}$ ) wurden mit Phosphorsäure (85%) auf die pH-Werte 1,5, 2,5, 3,5 und 4,5 eingestellt. Anschließend wurde jeweils 1 mL dieser Lösungen auf die konditionierten Säulen gegeben und das Eluat aufgefangen. Vor der Analyse wurde das Eluat durch Zugabe von 0,5 mL bidest. Wasser verdünnt. Die Aufgabe der Standardlösung wurde solange wiederholt bis die Kapazität der Säulen erschöpft war.

#### Versuch 2: Einfluss eines Natriumzusatzes auf die Kapazität des PRS-Ionenaustauschers

Die 5-OH-TRP-Standardlösung mit Natriumzusatz wurde mit Phosphorsäure (85%) auf pH 3,5 eingestellt. Anschließend wurde 1 mL dieser Lösung auf die konditionierte Säule gegeben und das Eluat aufgefangen. Die Aufgabe der Standardlösung wurde solange wiederholt bis die Kapazität der Säule erschöpft war.

#### Versuch 3: Einfluss eines L-Alaninzusatzes auf die Kapazität des PRS-Ionenaustauschers

Die 5-OH-TRP-Standardlösung mit L-Alaninzusatz wurde mit Phosphorsäure (85%) auf pH 3,5 eingestellt. Anschließend wurde 1 mL dieser Lösung auf die konditionierte Säule gegeben und das Eluat aufgefangen. Die Aufgabe der Standardlösung wurde solange wiederholt bis die Kapazität der Säule erschöpft war.

Die Analyse erfolgte mittels HPLC-UV-Detektion (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 10.2.3). Die Wiederfindungsraten wurden durch Einpunktkalibrierung mit einer externen Standardlösung bestimmt.

#### 10.7.3.4 RP18-Festphasenextraktion

##### Lösungen:

- Elutionslösung: Wasser bidest./MeOH 50/50 (v/v)
- 5-OH-TRP-Stammlösung: 250 µg/L
- 5-OH-TRP-Standardlösung: 62,5 µg/L, pH 3 (eingestellt mit Phosphorsäure 85%)
- Garnelenserum: Die homogenisierten Nordseegarnelen wurden zur Abtrennung unlöslicher Matrixbestandteile ausgepresst. Aus ca. 5 g Garnelen wurde 1 mL Presssaft gewonnen.
- Dotiertes Garnelenserum: 67,5 µg/L 5-OH-TRP: 700 µL Garnelenserum wurden mit 30 µL Essigsäure (100%) und 270 µL 5-OH-TRP-Stammlösung versetzt. Anschließend wurde 15 min zentrifugiert (10000 x g, 4 °C).

##### Säulenkonditionierung:

- 2 Säulenfüllungen MeOH
- 2 Säulenfüllungen bidest. Wasser

##### C18-SPE

Probenaufgabe: 1,5 mL 5-OH-TRP-Standardlösung bzw.

500 µL dotiertes Garnelenserum

Waschen: 1,5 mL bidest. Wasser

Elution: 4,5 mL bidest. Wasser/MeOH 50/50 (v/v)

Die Eluate der Probenaufgabe und des Waschschrilles wurden jeweils vor der Analyse ad 2 mL und die Elutionslösung ad 5 mL mit bidest. Wasser verdünnt. Alle Lösungen wurden mittels HPLC-EC-Detektion analysiert (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 10.2.4). Die Wiederfindungsraten für 5-OH-TRP wurden über Einpunktkalibrierung mit einer externen Standardlösung bestimmt (siehe Tabelle 10.15).

**Tabelle 10.15** Ergebnisse des RP18-Säulentests

Säule	Typ	Wiederfindung 5-OH-TRP			
		Standard		Dotiertes Garnelenserum	
		Aufgabe + Waschen	Elution	Aufgabe + Waschen	Elution
Varian C18 OH	C18, 500 mg	-	103%	83%	21%
Varian C18 ec	C18, 500 mg endcapped	-	101,5%	-	100,4%

- = nicht nachweisbar

### 10.7.3.5 Optimierung der RP18-Festphasenextraktion

#### Lösungen:

- Elutionslösung: Wasser bidest./MeOH 95/5 (v/v)
- OH-TRP-Standardlösung: 4-, 5-, 6- und 7-OH-TRP je 500 µg/L
- Garnelenserum: Die homogenisierten Nordseegarnelen wurden zur Abtrennung unlöslicher Matrixbestandteile ausgepresst. Aus ca. 5 g Garnelen wurde 1 mL Presssaft gewonnen.
- Dotiertes Garnelenserum (Optimierung der Probenaufgabe): 700 µL Garnelenserum wurden mit 270 µL OH-TRP-Standardlösung und 30 µL Essigsäure (100%) versetzt. Anschließend wurde 15 min zentrifugiert (10000 x g, 4 °C).
- Dotiertes Garnelenserum (Optimierung des Waschschrattes und der Elution): 1 mL Garnelenserum wurde mit 125 µL OH-TRP-Standardlösung, 50 µL Essigsäure (100%) und 75 µL bidest. Wasser versetzt. Anschließend wurde 15 min zentrifugiert (10000 x g, 4 °C).

#### Säulenkonditionierung: C18 ec, 500 mg (Fa. Varian)

- 2 Säulenfüllungen MeOH
- 2 Säulenfüllungen bidest. Wasser

#### Optimierung der Probenaufgabe

Es wurden jeweils 500, 625, 750 und 915 µL dotiertes Garnelenserum (entspricht 350, 438, 525 und 641 µL Garnelenserum) auf die SPE-Säulen gegeben und die Eluate mittels HPLC-EC-Detektion analysiert (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 10.2.4). Die Wiederfindungsraten für die OH-TRP-Isomere wurden über Einpunktkalibrierung mit einer externen Standardlösung bestimmt (siehe Tabelle 10.16).

**Tabelle 10.16** Optimierung der C18-Probenaufgabe

Probenaufgabe	Durchbruch (%)			
	4-OH-TRP	5-OH-TRP	6-OH-TRP	7-OH-TRP
350 µL Garnelenserum	-	3,0	3,5	-
438 µL Garnelenserum	-	5,8	1,2	-
525 µL Garnelenserum	0,2	1,5	0,4	-
641 µL Garnelenserum	-	2,3	3,6	-

- = nicht nachweisbar

### Optimierung des Waschschrattes

Es wurden 750 µL dotiertes Garnelenserum (entspricht 600 µL Garnelenserum) auf die SPE-Säule gegeben und viermal mit je 1 mL bidest. Wasser gewaschen. Die Eluate wurden mittels HPLC-EC-Detektion analysiert (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 10.2.4). Die Wiederfindungsraten für die OH-TRP-Isomere wurden über Einpunktkalibrierung mit einer externen Standardlösung bestimmt (s. Tabelle 10.17).

**Tabelle 10.17** Optimierung des C18-Waschschrattes

Waschschratte (1 mL)	Durchbruch (%)			
	4-OH-TRP	5-OH-TRP	6-OH-TRP	7-OH-TRP
Waschen 1	-	-	-	-
Waschen 2	-	0,9	1,1	-
Waschen 3	-	2,6	0,5	-
Waschen 4	-	6,7	6,9	2,0

- = nicht nachweisbar

### Optimierung der Elution

Es wurden 750 µL dotiertes Garnelenserum (entspricht 600 µL Garnelenserum) auf die SPE-Säule gegeben und mit 3 mL bidest. Wasser gewaschen. Anschließend wurde sechsmal mit je 1 mL Elutionslösung eluiert. Die Eluate wurden mittels HPLC-EC-Detektion analysiert (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 10.2.4). Die Wiederfindungsraten für die OH-TRP-Isomere wurden über Einpunktkalibrierung mit einer externen Standardlösung bestimmt (siehe Tabelle 10.18).

**Tabelle 10.18** Optimierung der C18-Elution

Elutionsschritte (1 mL)	Wiederfindung (%)			
	4-OH-TRP	5-OH-TRP	6-OH-TRP	7-OH-TRP
Elution 1	-	-	-	-
Elution 2	-	34,7	36,5	8,5
Elution 3	19,2	63,7	51,1	52,1
Elution 4	40,4	14,9	8,9	26,2
Elution 5	22,9	-	-	6,1
Elution 6	-	-	-	-
Summe	82,5	113,3	96,5	92,9

- = nicht nachweisbar



### 10.7.3.6 Optimierung der PRS-Elution (Box-Behnken-Versuchsplan)

#### Lösungen:

- OH-TRP-Standardlösung: 4-, 5-, 6- und 7-OH-TRP je 150 µg/L, mit Ameisensäure (98%) auf pH 3,5 eingestellt.
- Ammoniumformiat-Puffer (pH 4,6, 125 mMol/L): 1,2 mL Ameisensäure (98%) und 2,4 mL Ammoniak (25%) wurden mit bidest. Wasser ad 250 mL aufgefüllt.
- Ammoniumformiat-Puffer (pH 2, 100 mMol/L): 40 mL Ammoniumformiat-Puffer (pH 4,6, 125 mMol/L) wurden in einem 50 mL Messkolben mit Ameisensäure (98%) auf pH 2 eingestellt und mit bidest. Wasser ad 50 mL aufgefüllt.
- Ammoniumformiat-Puffer (pH 3,5, 100 mMol/L): 40 mL Ammoniumformiat-Puffer (pH 4,6, 125 mMol/L) wurden in einem 50 mL Messkolben mit Ameisensäure (98%) auf pH 3,5 eingestellt und mit bidest. Wasser ad 50 mL aufgefüllt.
- Ammoniumformiat-Puffer (pH 5, 100 mMol/L): 40 mL Ammoniumformiat-Puffer (pH 4,6, 125 mMol/L) wurden mit bidest. Wasser ad 50 mL aufgefüllt.

Die einzelnen Elutionspuffer wurden nach folgendem Schema hergestellt (siehe Tabelle 10.19):

**Tabelle 10.19** Versuchsplan nach Box-Behnken und Herstellungsschema für die Elutionspuffer

Fall	PH	Ammonium (mMol/L)	MeOH (% v/v)	eingestellter Puffer (mL)	Methanol (mL)	Wasser (mL)
1	3,5	50	10	5	1	4
2	3,5	50	10	5	1	4
3	3,5	50	10	5	1	4
4	2	75	10	7,5	1	1,5
5	2	50	20	5	2	3
6	2	50	0	5	0	5
7	2	25	10	2,5	1	6,5
8	5	25	10	2,5	1	6,5
9	5	50	20	5	2	3
10	5	50	0	5	0	5
11	5	75	10	7,5	1	1,5
12	3,5	25	20	2,5	2	5,5
13	3,5	25	0	2,5	0	7,5
14	3,5	75	20	7,5	2	0,5
15	3,5	75	0	7,5	0	2,5

**Säulenkonditionierung:**

- 2 Säulenfüllungen MeOH
- 2 Säulenfüllungen bidest. Wasser

**PRS-SPE****IST PRS 200 mg**

Probenaufgabe: 1 mL OH-TRP-Lösung

Waschen: 1 mL bidest. Wasser

Elution: 5 mL des jeweiligen Elutionspuffers

Anschließend wurden die PRS-Eluate bei 0,5 mbar gefriergetrocknet und in 1 mL bidest. Wasser aufgenommen. Die Analyse erfolgte mittels HPLC-EC-Detektion (+0,75 V) (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 10.2.4). Die Wiederfindungsraten der OH-TRP-Isomere für den Box-Behnken-Plan wurden über Einpunktkalibrierung mit einer externen Standardlösung bestimmt (siehe Tabelle 10.20).

**Tabelle 10.20** Wiederfindungsraten der OH-TRP-Isomere (BOX-Behnken-Plan)

Fall	Faktoren			Wiederfindungsrate (%)			
	pH	Ammonium (mMol/L)	MeOH (% v/v)	4-OH-TRP	5-OH-TRP	6-OH-TRP	7-OH-TRP
1	3,5	50	10	101,5	92,8	89,7	93,6
2	3,5	50	10	98,0	95,7	85,2	98,9
3	3,5	50	10	104,4	102,7	76,8	105,5
4	2	75	10	100,5	97,3	76,2	98,7
5	2	50	20	100,6	92,3	78,6	92,2
6	2	50	0	77,6	100,8	95,6	96,1
7	2	25	10	61,7	66,3	68,3	72,8
8	5	25	10	74,9	76,1	70,9	76,2
9	5	50	20	108,3	101,2	101,2	105,0
10	5	50	0	101,2	98,4	98,2	99,3
11	5	75	10	101,9	99,6	92,0	97,8
12	3,5	25	20	84,3	86,5	89,9	89,9
13	3,5	25	0	68,3	83,6	88,7	87,6
14	3,5	75	20	91,7	100,0	67,7	98,0
15	3,5	75	0	101,3	102,9	77,6	103,3

### 10.7.4 C18 ec/PRS-Festphasenextraktion zur Bestimmung der OH-TRP-Isomere in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen und Modell-Lösungen

#### Lösungen:

- OH-TRP-Standardlösung: 4-, 5-, 6- und 7-OH-TRP je 400  $\mu\text{g/L}$
- Wasser/MeOH 95/5, pH 3: Bidest. Wasser wird mit Ameisensäure (98%) auf pH 3 eingestellt. 19 mL dieser Lösung werden mit 1 mL MeOH versetzt.
- Ammoniumformiat-Puffer, 200 mMol, pH 3: 0,45 mL Ameisensäure (98%) und 0,8 mL Ammoniak (25%) werden mit bidest. Wasser auf 50 mL aufgefüllt und mit Ameisensäure (98%) auf pH 3 eingestellt.
- Garnelenserum: Die homogenisierten Nordseegarnelen wurden zur Abtrennung unlöslicher Matrixbestandteile ausgepresst. Aus ca. 5 g Garnelen wurde 1 mL Presssaft gewonnen.
- TRP-Lösung (5 kGy) s. Anhang 10.5.4
- AS-Modell-Lösung (5 kGy) s. Anhang 10.5.4

1 mL Garnelenserum bzw. 1 mL Modell-Lösung wurden mit 200  $\mu\text{L}$  OH-TRP-Standardlösung oder 200  $\mu\text{L}$  bidest. Wasser und 50  $\mu\text{L}$  Essigsäure versetzt und geschüttelt. Anschließend wurde 15 min zentrifugiert (10000 x g, 4 °C).

#### Säulenkonditionierung:

- 2 Säulenfüllungen MeOH
- 2 Säulenfüllungen bidest. Wasser

#### C18-SPE

#### C18 ec, 500 mg (Fa. Varian)

Probenaufgabe: 750  $\mu\text{L}$  Probe dotiert und undotiert (entspricht 600  $\mu\text{L}$  Garnelenserum)

750  $\mu\text{L}$  TRP-Lösung (5 kGy), AS-Modell-Lösung (5 kGy)

Waschen: 3 mL bidest. Wasser

Elution: 5 mL Wasser/MeOH 95/5, pH 3,5

<b>PRS-SPE</b>	<b>PRS, 200 mg (Fa. IST)</b>
Probenaufgabe:	Quantitative Aufgabe der 5 mL C18-Eluat, Nachspülen mit 2 mL Wasser/MeOH 95/5, pH 3,5
Waschen:	3 mL bidest. Wasser
Elution:	1,5 mL Ammoniumformiat-Puffer, 200 mMol, pH 3

Anschließend wurden die PRS-Eluate direkt mittels HPLC-EC-Detektion (+0,75 V) analysiert. Die Wiederfindungsraten für die OH-TRP-Isomere in dotiertem Garnelenserum sind in Tabelle 10.21 dargestellt. Die Berechnung erfolgte anhand einer externen Kalibriergeraden (s. Anhang 10.4.2).

**Tabelle 10.21** Wiederfindungsraten nach C18/PRS-SPE

Probe	Wiederfindungsrate (%)			
	4-OH-TRP	5-OH-TRP	6-OH-TRP	7-OH-TRP
1	60,3	120,3	73,5	79,9
2	72,5	145,3	87,8	93,7
3	47,8	102,8	62,4	64,0
4	45,8	149,2	72,6	64,1
5	56,5	177,9	77,9	68,5
Mittelwert	56,6	139,1	74,8	74,0
Std.-Abw.	9,6	25,7	8,2	11,4

## **10.8 Screening auf polare Radiolyseprodukte in $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln**

### **10.8.1 Screening auf polare Radiolyseprodukte in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen**

#### **10.8.1.1 Probenaufarbeitung**

Ca. 5 g homogenisierte Nordseegarnelen wurden zur Abtrennung unlöslicher Matrixbestandteile ausgepresst. 1 mL des gewonnenen Presssaftes wurde mit 50  $\mu$ L Perchlorsäure (60%) versetzt und 15 min zentrifugiert (10000 x g, 4 °C). Das Zentrifugat wurde nach Membranfiltration (0,2  $\mu$ m) direkt zur HPLC-Analyse (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 10.2.5) eingesetzt.

#### **10.8.1.2 Isolierung und Anreicherung mittels Festphasenextraktion**

##### **Lösungen:**

- Waschlösungen: Wasser/MeOH 90/10 (v/v), Wasser/MeOH 85/15 (v/v)
- Elutionslösung: Wasser/MeOH 70/30 (v/v)

##### **Säulenkonditionierung: C18 ec, 500 mg (Fa. Varian)**

- 2 Säulenfüllungen MeOH
- 2 Säulenfüllungen bidest. Wasser

2 - 4 g Nordseegarnelen (10 kGy, RT) wurden mit 600  $\mu$ L Perchlorsäure (60%) in einem 50 mL PE-Zentrifugengefäß versetzt, auf 12 mL mit bidest. Wasser aufgefüllt und mittels Ultraturrax 30 s homogenisiert. Der wässrige Extrakt wurde anschließend 15 min zentrifugiert (10000 x g, 4 °C). 1 - 3 mL dieser Zentrifugate wurden nach dem in Tabelle 10.22 beschriebenen Schema auf die SPE-Säulen gegeben. Für den Versuch 8 wurde ein Aliquot des Zentrifugates vor der Aufgabe auf die SPE-Säule mit Ammoniak-Lösung (25%) neutralisiert.

Alle SPE-Fractionen wurden mittels HPLC-UV/FL-Detektion analysiert (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 10.2.5). Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Peakflächen der unbekannt Substanzen 4 - 6 in den verschiedenen SPE-Fractionen mit den Peakflächen ohne SPE (s. Tabelle 10.23).

**Tabelle 10.22** SPE-Versuche zur Isolierung der unbekanntenen Substanzen 4 - 6 aus Nordseegarnelen

Nr.	Extraktion	Proben- aufgabe	Waschen	Elution
1	3 g/12 mL + 600 µL PCI	3 mL	5 mL Wasser/MeOH 85/15	5 mL Wasser/MeOH 70/30
2	2 g/12 mL + 600 µL PCI	2 mL	5 mL Wasser/MeOH 85/15	5 mL Wasser/MeOH 70/30
3	2 g/12 mL + 600 µL PCI	1 mL	5 mL Wasser/MeOH 85/15	5 mL Wasser/MeOH 70/30
4	2 g/12 mL + 600 µL PCI	1 mL	3 mL Wasser/MeOH 85/15	5 mL Wasser/MeOH 70/30
5	4 g/12 mL + 600 µL PCI	2 mL	5 mL Wasser/MeOH 90/10	5 mL Wasser/MeOH 70/30
6	4 g/12 mL + 600 µL PCI	1,5 mL	5 mL Wasser/MeOH 90/10	5 mL Wasser/MeOH 70/30
7	4 g/12 mL + 600 µL PCI	1 mL	5 mL Wasser/MeOH 90/10	5 mL Wasser/MeOH 70/30
8	4 g/12 mL + 600 µL PCI neutralisiert mit NH <sub>3</sub> -Lösung 25%	2 mL	5 mL Wasser/MeOH 90/10	5 mL Wasser/MeOH 70/30

**Tabelle 10.23** Wiederfindungsrate (%) der unbekanntenen Substanzen 4 - 6 bei den SPE-Versuchen 1 - 8 (Tabelle 10.22), bezogen auf die Peakfläche ohne SPE

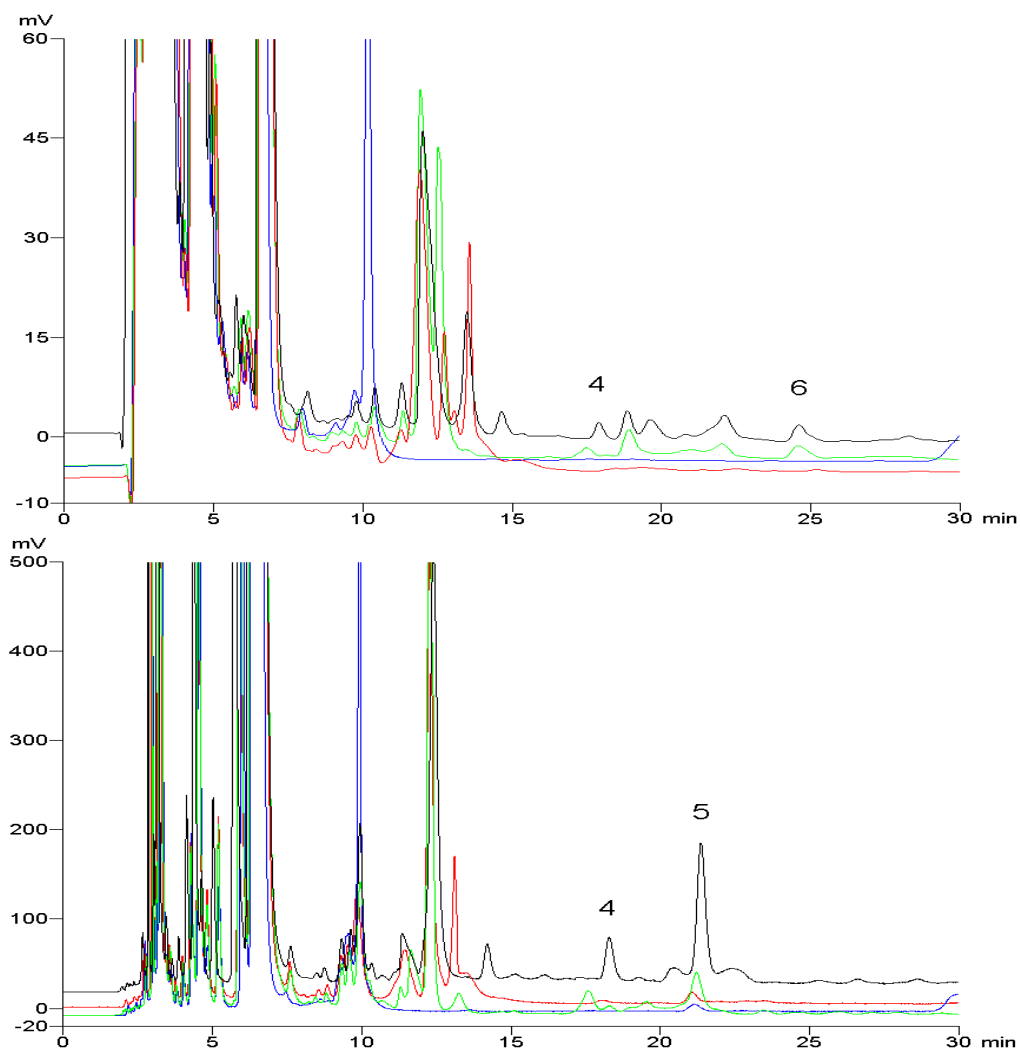
Nr.	Probenaufgabe			Waschen			Elution		
	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 4	Peak 5	Peak 6
1	-	-	-	79,5	5,7	20,7	20,5	94,3	79,3
2	-	-	-	44,1	6,5	10,3	55,9	93,5	89,7
3	-	-	-	36,5	2	1,6	63,5	98	98,4
4	-	-	-	-	-	-	100	100	100
5	-	-	-	68,7	4,3	6,4	31,3	95,7	93,6
6	-	-	-	17,6	5,3	3,6	82,4	94,7	96,4
7	-	-	-	0,5	-	-	100	100	100
8	-	-	-	28,1	11,4	6,3	71,9	88,6	93,7

### 10.8.1.3 Isolierung und Anreicherung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion

Ca. 4 g Nordseegarnelen (10 kGy, RT) wurden mit 12 mL Wasser und 600 µL Perchlorsäure (60%) in einem 50 mL PE-Zentrifugengefäß versetzt. Anschließend wurde mittels Ultraturrax (30 s) homogenisiert und 15 min zentrifugiert (10000 x g, 4 °C). Vom Überstand wurden jeweils 2 mL abgenommen und mit 2 mL Diethylether,

1-Butanol und Dichlormethan ausgeschüttelt. Zur Emulsionstrennung wurde 5 min zentrifugiert (3000 x g, 4 °C). Die wässrigen Phasen wurden membranfiltriert (0,2 µm) und mittels HPLC-UV/FL-Detektion analysiert (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 10.2.5).

In Abbildung 10.1 sind die Chromatogramme der wässrigen Probenextrakte der bestrahlten Nordseegarnelen nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mit den verschiedenen Lösungsmitteln dargestellt. Als Vergleich dient das Chromatogramm des wässrigen Extraktes ohne Flüssig-Flüssig-Extraktion.

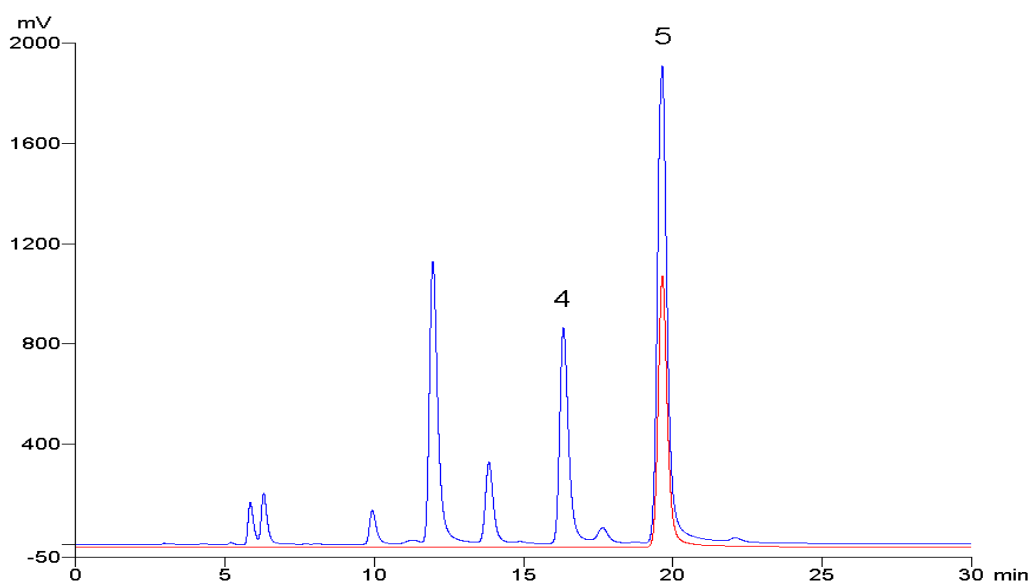


**Abbildung 10.1** Chromatogramme der wässrigen Probenlösung (NG 10 kGy) nach Flüssig-Flüssig-Extraktion (Nucleosil, 0,1% TFA/MeCN 95/5 (v/v), oben: UV 220 nm, unten: FL 270/315 nm); schwarz: ohne Extraktion, rot: Diethylether, blau: 1-Butanol, grün: Dichlormethan

#### 10.8.1.4 Isolierung und Anreicherung von flüchtigen Radiolyseprodukten mittels Vakuumdestillation

16 g Nordseegarnelen (10 kGy, RT) wurden genau gewogen und anschließend gleichmäßig auf 4 PE-Zentrifugengefäße (50 mL) aufgeteilt. Es wurden jeweils 10 mL Wasser und 600 µL Perchlorsäure (60%) zugegeben und mittels Ultraturrax (ca. 30 s) homogenisiert. Die am Ultraturrax anhaftenden Reste wurden durch Nachspülen mit Wasser quantitativ in die Zentrifugengefäße überführt und auf 20 mL aufgefüllt. Es wurde 15 min zentrifugiert (10000 x g, 4 °C) und die Überstände in vier weitere 50 mL Zentrifugengefäße dekantiert. Die wässrigen Extrakte wurden dreimal mit jeweils 6 mL Diethylether ausgeschüttelt und nach jeder Extraktion 5 min zentrifugiert (10000 x g, 8 °C). Die organischen Phasen von jeweils zwei Ansätzen (entsprechend 8 g Probe) wurden vereinigt und 1 mL bidest. Wasser zugegeben. Anschließend wurde der Diethylether im Stickstoffstrom entfernt. Nach Membranfiltration (0,2 µm) wurde einer der beiden erhaltenen wässrigen Extrakte direkt in die HPLC injiziert. Der andere Extrakt wurde mit weiteren 2 mL bidest. Wasser versetzt und unter Vakuum bis zur Trockne destilliert. Das Destillat wurde ebenfalls mittels HPLC-UV/FL-Detektion analysiert (HPLC-Bedingungen s. Anhang 10.2.5).

In Abbildung 10.2 sind die Chromatogramme des wässrigen Probenextraktes von bestrahlten Nordseegarnelen nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether und des Destillates dargestellt.



**Abbildung 10.2** Chromatogramme von  $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen (10 kGy RT) (Nucleosil, 0,1% TFA/MeCN 95/5 (v/v), FL 270/315 nm); blau: nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether, rot: nach Vakuumdestillation



### 10.8.1.5 Identifizierung mittels HPLC-MS

#### Lösungen

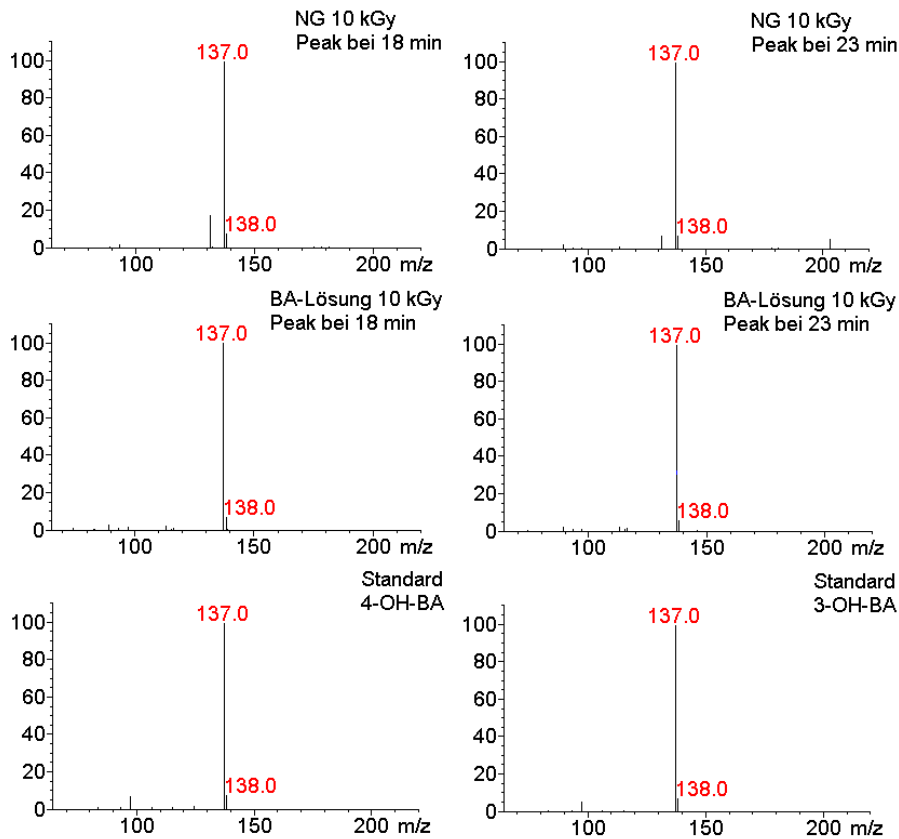
- BA-Lösung (10 kGy RT) s. Anhang 10.5.4
- OH-BA-Standard: 3-OH-BA, 4-OH-BA, jeweils 25 mg/L

Ca. 50 g Nordseegarnelen (10 kGy, RT) wurden genau gewogen und anschließend gleichmäßig auf 8 PE-Zentrifugengefäße (50 mL) aufgeteilt. Es wurden jeweils 10 mL Wasser und 600 µL Perchlorsäure (60%) zugegeben und mittels Ultraturrax (ca. 30 s) homogenisiert. Die am Ultraturrax anhaftenden Reste wurden durch Nachspülen mit Wasser quantitativ in die Zentrifugengefäße überführt und die Gefäße auf 20 mL aufgefüllt. Es wurde 15 min zentrifugiert (10000 x g, 4 °C) und die Überstände in 8 weitere 50 mL Zentrifugengefäße abdekantiert. Die wässrigen Extrakte wurden jeweils dreimal mit 6 mL Diethylether ausgeschüttelt und nach jeder Extraktion 5 min zentrifugiert (10000 x g, 8 °C). Alle organischen Phasen wurden vereinigt. Anschließend wurde 1 mL Wasser zugegeben, der Diethylether im Stickstoffstrom entfernt und die Lösung membranfiltriert (0,2 µm).

Als Vergleich wurden 10 mL BA-Lösung (10 kGy, RT) mit 50 µL Perchlorsäure (60%) versetzt und dreimal mit 6 mL Diethylether ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und 0,5 mL Wasser zugegeben. Anschließend wurde der Diethylether im Stickstoffstrom abgedampft.

Die angereicherten wässrigen Lösungen wurden mittels HPLC-MS analysiert (HPLC-Bedingungen s. Anhang 10.2.5). Zusätzlich wurde ein OH-BA-Standard unter den gleichen Bedingungen in die HPLC-MS injiziert.

Abbildung 10.3 zeigt einen Vergleich der Massenspektren der Peaks mit den Retentionszeiten 18 bzw. 23 min aus den Chromatogrammen der angereicherten Nordseegarnelen (10 kGy RT, Peaks 4 und 6), der BA-Lösung (10 kGy RT) und des OH-BA-Standards.



**Abbildung 10.3** Vergleich der Massenspektren der Peaks bei 18 und 23 min (HPLC-MS); oben: NG 10 kGy, mitte: BA-Lösung 10 kGy, unten: 3- und 4-OH-BA-Standard

### 10.8.1.6 Identifizierung mittels GC-MS

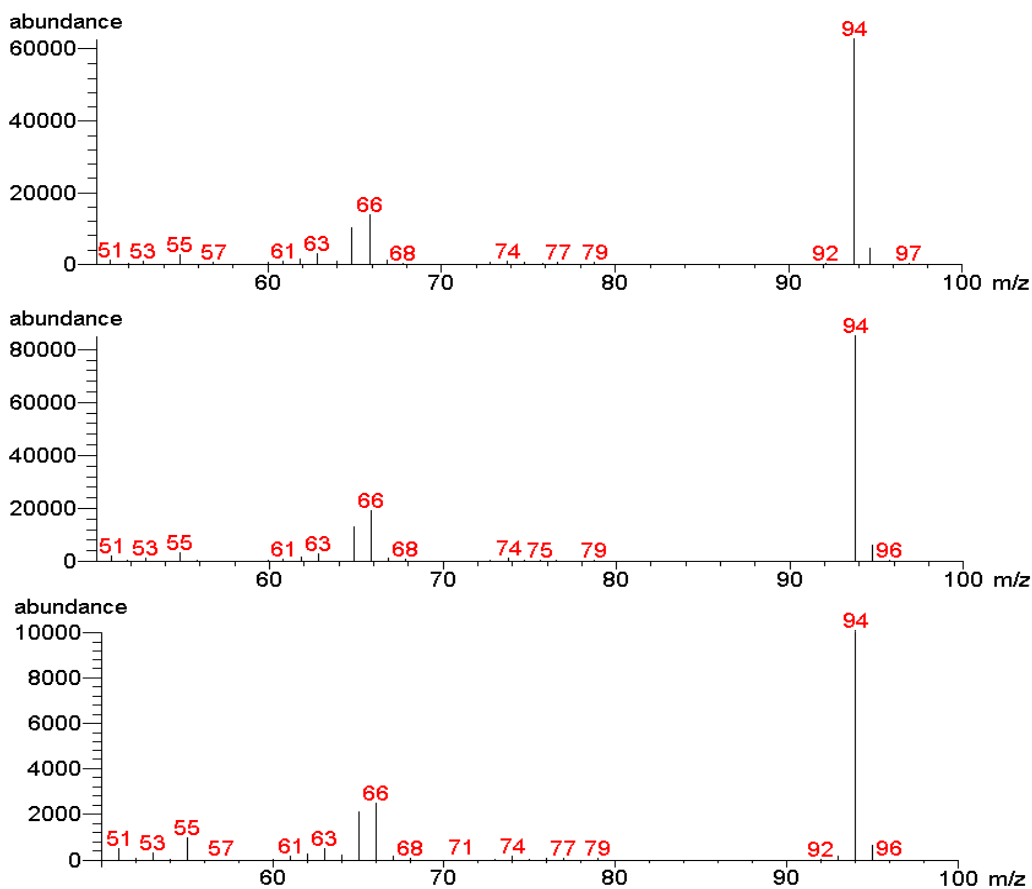
#### Lösungen

- BA-Lösung (10 kGy RT) s. Anhang 10.5.4

Ca. 50 g Nordseegarnelen (10 kGy, RT) wurden genau gewogen und anschließend gleichmäßig auf 8 PE-Zentrifugengefäße (50 mL) aufgeteilt. Es wurden jeweils 10 mL Wasser und 600  $\mu$ L Perchlorsäure (60%) zugegeben und mittels Ultraturrax (ca. 30 s) homogenisiert. Die am Ultraturrax anhaftenden Reste wurden durch Nachspülen mit Wasser quantitativ in die Zentrifugengefäße überführt und die Gefäße auf 20 mL aufgefüllt. Es wurde 15 min zentrifugiert (10000 x g, 4 °C) und die Überstände in 8 weitere 50 mL Zentrifugengefäße abdekantiert. Nach Zugabe von 0,6 g Natriumcarbonat (Einstellung auf pH 9) wurden die wässrigen Extrakte jeweils dreimal mit 6 mL Diethylether ausgeschüttelt und anschließend 5 min zentrifugiert (10000 x g, 8 °C). Alle organischen Phasen wurden vereinigt und 3 mL bidest. Wasser zugegeben. Anschließend wurde der Diethylether im Stickstoffstrom entfernt.

Der wässrige Rückstand wurde unter Vakuum bis zur Trockne destilliert und anschließend wieder dreimal mit 3 mL Diethylether ausgeschüttelt. Zur Konzentrierung wurde der Diethylether bis auf 1 mL im Stickstoffstrom abgedampft. Als Vergleich wurden 10 mL BA-Lösung (10 kGy, RT) mit 0,6 g Natriumcarbonat versetzt und dreimal mit 6 mL Diethylether ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und 3 mL Wasser zugegeben. Anschließend wurde der Diethylether im Stickstoffstrom abgedampft. Die Destillation und Konzentrierung der BA-Lösung erfolgte wie oben beschrieben. Die angereicherten Ether-Extrakte wurden mittels GC-MS analysiert (GC-MS-Bedingungen s. Anhang 10.3).

Abbildung 10.4 zeigt einen Vergleich der Massenspektren des Peaks mit der Retentionszeit 7,6 min aus den Chromatogrammen der angereicherten Nordseegarnelen (10 kGy RT, Peak 5) und der BA-Lösung (10 kGy RT). Zusätzlich ist das Massenspektrum von Phenol aus der Wiley-Spektrenbibliothek abgebildet.



**Abbildung 10.4** Vergleich der Massenspektren des Peaks bei 7,6 min (GC-MS); oben: NG 10 kGy, mitte: BA-Lösung 10 kGy, unten: Phenol (Wiley-Spektrenbibliothek)

## **10.8.2 Bestimmung von BA-Radiolyseprodukten in $\gamma$ -bestrahlten konservierten Nordseegarnelen**

### **10.8.2.1 Probenaufarbeitung**

Ca. 1,5 g Nordseegarnelen wurden mit 10 mL Wasser und 600  $\mu$ L Perchlorsäure (60%) in einem 50 mL PE-Zentrifugengefäß versetzt. Anschließend erfolgte eine Homogenisierung mittels Ultraturrax (30 s). Die am Ultraturrax anhaftenden Reste wurden durch Nachspülen mit Wasser quantitativ in das Zentrifugengefäß überführt und das Gefäß auf 20 mL aufgefüllt. Es wurde 15 min zentrifugiert (10000 x g, 4 °C) und der Überstand in ein weiteres 50 mL Zentrifugengefäß abdekantiert. Dieser wässrige Extrakt wurde dreimal mit je 3 mL Diethylether ausgeschüttelt und nach jeder Extraktion 5 min zentrifugiert (10000 x g, 8 °C). Die organischen Phasen wurden in einen 10 mL Messkolben überführt und 1 mL Wasser zugegeben. Anschließend wurde der Diethylether im Stickstoffstrom entfernt und der Messkolben bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Nach entsprechender Verdünnung (bei 18 °C bestrahlte Proben 1:2 bzw. 1:4 (10 kGy), bei RT bestrahlte Proben 1:3 bzw. 1:10 (10 kGy)) wurden die Proben mittels HPLC-EC-Detektion analysiert (HPLC-Bedingungen s. Anhang 10.2.6).

### **10.8.2.2 Ergebnisse**

Die Gehalte an BA-Radiolyseprodukten in gefroren und bei Raumtemperatur bestrahlten konservierten Nordseegarnelen sind in den Tabellen 10.24 und 10.25 dargestellt. Die Berechnung der Gehalte erfolgte anhand einer externen Kalibriergeraden (s. Anhang 10.4.3).

In Tabelle 10.26 sind die Ergebnisse des paarweisen Vergleichs der Gehalte an BA-Radiolyseprodukten bei verschiedenen Bestrahlungsdosen zur unbestrahlten Probe dargestellt.

**Tabelle 10.24** BA-Radiolyseprodukte in gefroren bestrahlten konservierten Nordseegarnelen

		3-OH-BA	4-OH-BA	Phenol
unbestrahlt	Mittelwert*	78,14	113,49	44,17
	Std.-Abw.*	8,59	4,38	6,90
1 kGy	Mittelwert	110,12	115,21	39,83
	Std.-Abw.	6,22	0,51	7,93
3 kGy	Mittelwert	168,37	150,01	64,89
	Std.-Abw.	9,87	5,77	23,95
5 kGy	Mittelwert	266,43	180,72	87,46
	Std.-Abw.	16,53	18,42	18,53
10 kGy	Mittelwert	518,08	269,38	89,40
	Std.-Abw.	47,80	46,84	6,16

\*Mittelwert = Mittelwert aus 3 Messungen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )\*Std.-Abw. = Standardabweichung ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )**Tabelle 10.25** BA-Radiolyseprodukte in bei Raumtemperatur bestrahlten konservierten Nordseegarnelen

		3-OH-BA	4-OH-BA	Phenol
unbestrahlt	Mittelwert*	78,14	113,49	44,17
	Std.-Abw.*	8,59	4,38	6,90
1 kGy	Mittelwert	372,75	686,95	63,20
	Std.-Abw.	114,02	102,54	10,28
3 kGy	Mittelwert	1453,74	1589,54	387,72
	Std.-Abw.	74,66	74,90	43,13
5 kGy	Mittelwert	1759,36	2298,11	417,11
	Std.-Abw.	146,98	176,12	15,15
10 kGy	Mittelwert	4972,03	4985,15	1112,45
	Std.-Abw.	37,74	140,73	92,87

\*Mittelwert = Mittelwert aus 3 Messungen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )\*Std.-Abw. = Standardabweichung ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )**Tabelle 10.26** Paarweiser Vergleich der Gehalte an BA-Radiolyseprodukten bei verschiedenen Bestrahlungsdosen zur unbestrahlten Probe (t-Test beidseitig)

	3-OH-BA		4-OH-BA		Phenol	
	-18 °C	RT	-18 °C	RT	-18 °C	RT
1 kGy	0,00	0,07	0,67	0,02	0,70	0,26
3 kGy	0,02	0,00	0,03	0,00	0,34	0,01
5 kGy	0,01	0,00	0,05	0,00	0,05	0,00
10 kGy	0,01	0,00	0,04	0,00	0,02	0,00

### **10.8.3 Screening auf polare Radiolyseprodukte in $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln**

#### **10.8.3.1 Probenaufarbeitung**

Die Probenaufarbeitung der Tiefsee und Black Tiger Shrimps und der nicht konservierten Nordseegarnelen erfolgte analog zur Aufarbeitung der kommerziell erhältlichen Nordseegarnelen (siehe Anhang 10.8.1.1).

1,3 mL Eiklar wurden mit 200  $\mu$ L Wasser und 65  $\mu$ L Perchlorsäure (60%) in einem 2 mL Eppendorf-Vial versetzt und 15 min zentrifugiert (10000 x g, 4°C). Das Zentrifugat wurde nach Membranfiltration (0,2  $\mu$ m) direkt zur HPLC-Analyse eingesetzt.

4 g Hühnerfleisch wurden in ein 50 mL PE-Zentrifugengefäß eingewogen und mit 600  $\mu$ L Perchlorsäure (60%) versetzt. Es wurde mit Wasser auf 12 mL aufgefüllt und mittels Ultraturrax (ca. 30 s) homogenisiert. Danach wurde 15 min zentrifugiert (10000 x g, 4 °C) und das Zentrifugat nach Membranfiltration (0,2  $\mu$ m) direkt zur HPLC-Analyse eingesetzt. Die HPLC-Bedingungen sind in Anhang 10.2.5 dargestellt.

### **10.8.4 Screening auf polare Radiolyseprodukte in $\gamma$ -bestrahlten eiweißreichen Lebensmitteln nach Probenanreicherung**

#### **10.8.4.1 Probenaufarbeitung**

Ca. 25 g Nordseegarnelen, Tiefsee Shrimps, Black Tiger Shrimps, Eiklar und Hühnerfleisch wurden genau gewogen und anschließend gleichmäßig auf 4 PE-Zentrifugengefäße (50 mL) aufgeteilt. Es wurden jeweils 10 mL Wasser und 600  $\mu$ L Perchlorsäure (60%) zugegeben und mittels Ultraturrax (ca. 30 s) homogenisiert. Die am Ultraturrax anhaftenden Reste wurden durch Nachspülen mit Wasser quantitativ in die Zentrifugengefäße überführt und die Gefäße auf 20 mL aufgefüllt. Es wurde 15 min zentrifugiert (10000 x g, 4 °C) und die Überstände in 4 weitere 50 mL Zentrifugengefäße abdekantiert. Die wässrigen Extrakte wurden jeweils dreimal mit 6 mL Diethylether ausgeschüttelt und anschließend 5 min zentrifugiert (10000 x g, 8 °C). Alle organischen Phasen einer Probe wurden vereinigt. Anschließend wurde der Diethylether im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 0,5 mL bidest. Wasser aufgenommen. Nach Membranfiltration (0,2  $\mu$ m) wurden die Proben in die HPLC injiziert (HPLC-Bedingungen s. Anhang 10.2.5).

---

### 10.8.4.2 Modellversuche

#### AS-Modell-System

#### Lösungen

- AS-Modell-Lösungen (siehe Anhang 10.5.4):
  - mit TRP: unbestrahlt, 10 kGy RT
  - ohne TRP: unbestrahlt, 10 kGy RT
- TRP-Lösung (siehe Anhang 10.5.4):
  - unbestrahlt, 5 kGy RT

#### Durchführung

10 mL der Modell-Lösungen wurden jeweils mit 500 µL Perchlorsäure (60%) versetzt und dreimal mit 6 mL Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherphasen wurden im Stickstoffstrom bis zur Trockne abgedampft und die Rückstände jeweils in 0,5 mL bidest. Wasser aufgenommen. Die Lösungen wurden direkt zur HPLC-Analyse eingesetzt (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 10.2.5).

## Fenton-System

### Lösungen

- Natronlauge (0,5 M)
- Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,2):  
12,535 g Kaliumdihydrogenphosphat und 25,07 g *di*-Natriumhydrogenphosphat-12-hydrat wurden in einen 1 L Messkolben gewogen und der Kolben mit bidest. Wasser bis fast zur Eichmarke aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 0,5 M Natronlauge auf pH 7,20 eingestellt. Der Kolben wurde mit bidest. Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt.
- Wasserstoffperoxid-Lösung 3% (v/v)
- Stammlösung A: 140,2 mg Tyrosin/500 mL Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,2)
- Stammlösung B: 112,4 mg Phenylalanin/100 mL Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,2)
- Stammlösung C: 99,3 mg Histidin/50 mL Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,2)
- Stammlösung D: 1804,3 mg Arginin/50 mL Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,2)
- Stammlösung E: 120,4 mg Methionin/50 mL Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,2)
- Fenton-Reaktionsgemisch 1: 50 mL Stammlösung A und je 10 mL der Stammlösungen B - E werden in einen 200 mL Iodzahlkolben pipettiert und mit 10 mL Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,2) versetzt.
- Fenton-Reaktionsgemisch 2: 50 mL Stammlösung A und je 10 mL der Stammlösungen B - D werden in einen 200 mL Iodzahlkolben pipettiert und mit 20 mL Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,2) versetzt.
- Fenton-Reaktionsgemisch 3: 50 mL Stammlösung A und je 10 mL der Stammlösungen B und C werden in einen 200 mL Iodzahlkolben pipettiert und mit 30 mL Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,2) versetzt.
- Fenton-Reaktionsgemisch 4: 50 mL Stammlösung A und 10 mL Stammlösung B werden in einen 200 mL Iodzahlkolben pipettiert und mit 40 mL Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,2) versetzt.
- Fenton-Reaktionsgemisch 5: 50 mL Stammlösung A werden in einen 200 mL Iodzahlkolben pipettiert und mit 50 mL Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,2) versetzt.
- Fenton-Reaktionsgemisch 6: 50 mL Stammlösung B werden in einen 200 mL Iodzahlkolben pipettiert und mit 50 mL Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,2) versetzt.

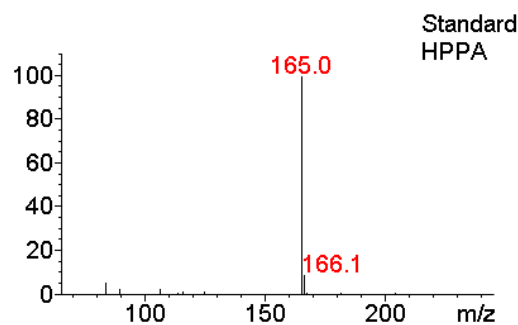


**Durchführung:**

Die Fenton-Reaktionsgemische 1 - 6 wurden 3 min mit Stickstoff begast. Nacheinander wurden jeweils 280 mg Eisen(II)-sulfat-heptahydrat (1 mMol), 370 mg Natrium-EDTA (1 mMol), 90 mg Ascorbinsäure (0,5 mMol) und 2,4 mL 3%ige Wasserstoffperoxid-Lösung unter Rühren und weiterem Durchleiten von Stickstoff zugegeben. Die Lösungen wurden 90 min mit Stickstoff begast. Anschließend wurden die Reaktionsgemische in einen 500 mL Scheidetrichter filtriert und nach Ansäuern mit 3,6 mL Perchlorsäure (60%) jeweils dreimal mit 100 mL Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherphasen wurden 30 min über Natriumsulfat getrocknet und anschließend filtriert. Die Filtrate wurden am Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft und die Rückstände jeweils in 0,5 mL bidest. Wasser aufgenommen, membranfiltriert (0,2 µm) und anschließend zur HPLC-Analyse eingesetzt (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 10.2.5).

**10.8.4.3 Identifizierung mittels HPLC-MS**

Zur Identifizierung von HPPA in den angereicherten Probenextrakten wurden die HPLC-MS-Parameter (SIM) optimiert (siehe Anhang 10.2.7). Das Massenspektrum von HPPA ist in Abbildung 10.5 dargestellt.



**Abbildung 10.5** Massenspektrum von HPPA (HPLC-MS)

## 10.8.5 Bestimmung von HPPA in $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen, Tiefsee Shrimps, Black Tiger Shrimps und Hühnerfleisch

### 10.8.5.1 Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung zur Bestimmung von HPPA erfolgte analog zur Aufarbeitung für das Screening nach Anreicherung (siehe Anhang 10.8.4.1). Die HPLC-Bedingungen sind in Anhang 10.2.7 aufgeführt. Ausgewertet wurde anhand einer externen Kalibriergeraden (s. Anhang 10.4.4). Die Wiederfindungsrate für HPPA für diese Aufarbeitung wurde anhand von Black Tiger Shrimps überprüft. Dazu wurden Aliquote einer HPPA-Standard-Lösung (130  $\mu\text{g/L}$ ) entsprechend 2,7, 26,6 und 51,9  $\mu\text{g/kg}$  HPPA zur unbestrahlten Probe zudotiert und nach der oben beschriebenen Methode aufgearbeitet. Die Ergebnisse der FL-Detektion sind in Tabelle 10.27 dargestellt.

**Tabelle 10.27** Wiederfindungsrate von HPPA in Black Tiger Shrimps

Probe	Dotierung ( $\mu\text{g/kg}$ )	WFR (%)
Black Tiger Shrimps 25 g/0,5 mL	2,7	56,9
	26,6	64,1
	51,9	55,4
Mittelwert		58,8
Std.-Abw.		3,8

### 10.8.5.2 Ergebnisse

Die HPPA-Gehalte in gefroren und bei Raumtemperatur bestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger Shrimps, Tiefsee Shrimps und Hühnerfleisch bei FL-Detektion sind in den Tabellen 10.28 und 10.29 angegeben. Die Ergebnisse der MS-Detektion sind in den Tabellen 10.31 und 10.32 dargestellt.

In Tabelle 10.30 sind die Ergebnisse des paarweisen Vergleichs der HPPA-Gehalte (FL-Detektion) bei verschiedenen Bestrahlungsdosen zur unbestrahlten Probe dargestellt.

**Tabelle 10.28** HPPA-Gehalte ( $\mu\text{g/kg}$  Frischfleisch) in gefrorenen bestrahlten Proben (FLD)

		Nordsee- garnelen konserviert	Black Tiger Shrimps	Tiefsee Shrimps	Hühner- fleisch
unbestrahlt	Mittelwert*	0,37	0,15	1,56	0,52
	Std.-Abw.*	0,31	0,05	0,22	0,11
1 kGy	Mittelwert	2,11	1,72	2,06	2,18
	Std.-Abw.	0,11	0,54	0,23	0,29
3 kGy	Mittelwert	4,64	4,81	2,48	3,75
	Std.-Abw.	0,78	1,11	0,29	0,73
5 kGy	Mittelwert	9,05	9,35	4,57	11,92
	Std.-Abw.	1,42	1,92	0,93	2,18
10 kGy	Mittelwert	19,93	12,57	5,32	21,30
	Std.-Abw.	1,83	3,95	1,04	5,15

\*Mittelwert = Mittelwert aus 3 Messungen ( $\mu\text{g/kg}$ )\*Std.-Abw. = Standardabweichung ( $\mu\text{g/kg}$ )**Tabelle 10.29** HPPA-Gehalte ( $\mu\text{g/kg}$  Frischfleisch) in bei Raumtemperatur bestrahlten Proben (FLD)

		Nordsee- garnelen konserviert	Nordsee- garnelen	Black Tiger Shrimps	Tiefsee Shrimps	Hühner- fleisch
unbestrahlt	Mittelwert*	0,44	0,89 <sup>1</sup>	0,15	1,56	0,52
	Std.-Abw.*	0,11		0,05	0,22	0,11
1 kGy	Mittelwert	1,61	2,63 <sup>1</sup>			2,44 <sup>1</sup>
	Std.-Abw.	0,22				
3 kGy	Mittelwert	21,14	5,25 <sup>1</sup>			6,71 <sup>1</sup>
	Std.-Abw.	3,29				
5 kGy	Mittelwert	31,39	6,70 <sup>1</sup>			14,54 <sup>1</sup>
	Std.-Abw.	6,75				
10 kGy	Mittelwert	61,76	13,04 <sup>1</sup>	10,61 <sup>1</sup>	3,66 <sup>1</sup>	14,98 <sup>1</sup>
	Std.-Abw.	5,19				

\*Mittelwert = Mittelwert aus 3 Messungen ( $\mu\text{g/kg}$ )\*Std.-Abw. = Standardabweichung ( $\mu\text{g/kg}$ )

1 = Einfachbestimmung

**Tabelle 10.30** Paarweiser Vergleich der HPPA-Gehalte (FLD) bei verschiedenen Bestrahlungsdosen zur unbestrahlten Probe (t-Test beidseitig)

-18 °C					RT
	NG <sub>kons.</sub>	BTS	TS	HU	NG <sub>kons.</sub>
1 kGy	0,00	0,05	0,36	0,03	0,03
3 kGy	0,02	0,03	0,13	0,03	0,01
5 kGy	0,01	0,02	0,03	0,02	0,02
10 kGy	0,00	0,05	0,03	0,03	0,00

**Tabelle 10.31** HPPA-Gehalte ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  Frischfleisch) in gefrorenen bestrahlten Proben (MSD)

		Nordsee- garnelen konserviert	Black Tiger Shrimps	Tiefsee Shrimps	Hühner- fleisch
unbestrahlt	Mittelwert*	0,54	0,32	2,42	0,37
	Std.-Abw.*	0,76	0,11	0,58	0,10
1 kGy	Mittelwert	2,93	2,06	4,15	2,39
	Std.-Abw.	0,19	0,25	1,09	0,41
3 kGy	Mittelwert	5,23	5,12	3,78	4,90
	Std.-Abw.	0,76	0,43	1,87	0,43
5 kGy	Mittelwert	10,76	13,41	7,26	12,09
	Std.-Abw.	2,74	4,93	1,25	3,79
10 kGy	Mittelwert	30,22	11,70	6,90	24,36
	Std.-Abw.	4,46	5,67	1,66	5,00

\*Mittelwert = Mittelwert aus 3 Messungen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )\*Std.-Abw. = Standardabweichung ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )**Tabelle 10.32** HPPA-Gehalte ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  Frischfleisch) in bei Raumtemperatur bestrahlten Proben (MSD)

		Nordsee- garnelen konserviert	Nordsee- garnelen	Black Tiger Shrimps	Tiefsee Shrimps	Hühner- fleisch
unbestrahlt	Mittelwert*	0,54	1,00 <sup>1</sup>	0,32	2,42	0,37
	Std.-Abw.*	0,76		0,11	0,58	0,10
1 kGy	Mittelwert	8,26	2,73 <sup>1</sup>			2,46 <sup>1</sup>
	Std.-Abw.	5,43				
3 kGy	Mittelwert	38,27	4,11 <sup>1</sup>			11,57 <sup>1</sup>
	Std.-Abw.	5,13				
5 kGy	Mittelwert	41,20	6,98 <sup>1</sup>			16,15 <sup>1</sup>
	Std.-Abw.	13,22				
10 kGy	Mittelwert	86,78	15,78 <sup>1</sup>	15,30 <sup>1</sup>	5,43 <sup>1</sup>	12,81 <sup>1</sup>
	Std.-Abw.	12,23				

\*Mittelwert = Mittelwert aus 3 Messungen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )\*Std.-Abw. = Standardabweichung ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

1 = Einfachbestimmung

## 10.9 Sensorische Untersuchungen an $\gamma$ -bestrahlten Nordseegarnelen

### 10.9.1 Ergebnisse der Profilprüfung

In den Tabellen 10.33 - 10.36 sind die Ergebnisse der Profilprüfung der im gefrorenen Zustand bestrahlten Nordseegarnelen dargestellt (Intensitätsskala 0 - 5). Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben (n=12).

**Tabelle 10.33** Aussehen und Farbe der im gefrorenen Zustand bestrahlten Nordseegarnelen

Parameter		unbestrahlt	1 kGy	3 kGy	5 kGy	10 kGy
orange	Mittelwert	2,5	2,2	2,1	1,6	1,6
	Std.-Abw.	1,4	1,1	1,0	1,0	1,1
rosa	Mittelwert	2,2	2,2	2,0	2,3	1,8
	Std.-Abw.	1,1	0,8	1,0	0,7	0,8
glänzend	Mittelwert	2,8	1,9	2,3	2,3	1,8
	Std.-Abw.	1,0	1,0	0,8	0,6	0,4
verwaschen	Mittelwert	1,4	2,3	2,3	2,3	3,0
	Std.-Abw.	1,2	1,6	1,2	1,5	1,2
Grauschimmer	Mittelwert	0,8	1,7	1,1	1,8	1,9
	Std.-Abw.	0,8	1,1	1,0	1,2	1,2

**Tabelle 10.34** Geruchsprofile der im gefrorenen Zustand bestrahlten Nordseegarnelen

Parameter		unbestrahlt	1 kGy	3 kGy	5 kGy	10 kGy
Algen/Meer	Mittelwert	2,8	2,7	2,2	1,9	1,7
	Std.-Abw.	0,9	0,9	0,7	1,1	1,0
erdig	Mittelwert	1,1	1,3	1,5	1,6	1,3
	Std.-Abw.	0,6	0,9	0,9	1,0	0,8
fischig	Mittelwert	1,4	1,8	1,2	1,8	1,3
	Std.-Abw.	0,9	1,0	1,1	1,4	1,2
ammoniakalisch	Mittelwert	0,4	0,4	0,4	1,0	0,7
	Std.-Abw.	0,8	0,6	0,6	1,0	0,9
pilzartig	Mittelwert	0,5	1,0	2,4	2,0	2,3
	Std.-Abw.	0,8	1,2	1,1	1,5	1,2
gekochte Kartoffel	Mittelwert	0,8	1,2	1,8	1,8	2,0
	Std.-Abw.	0,9	1,2	1,6	1,5	1,7
muffig/modrig	Mittelwert	0,9	1,1	1,4	1,3	1,8
	Std.-Abw.	0,9	1,0	0,9	0,7	0,9
käsig	Mittelwert	0,3	0,4	1,4	1,0	1,3
	Std.-Abw.	0,4	0,6	1,5	1,2	1,3

**Tabelle 10.35** Geschmacksprofile der im gefrorenen Zustand bestrahlten Nordseegarnelen

Parameter		unbestrahlt	1 kGy	3 kGy	5 kGy	10 kGy
nach Algen/Meer	Mittelwert	3,1	2,0	2,1	1,8	1,5
	Std.-Abw.	0,8	1,0	0,9	0,9	0,8
salzig	Mittelwert	1,9	2,4	2,7	2,3	2,3
	Std.-Abw.	0,5	0,6	0,8	0,8	0,8
süßlich	Mittelwert	2,3	2,6	2,3	2,7	2,8
	Std.-Abw.	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2
fischig	Mittelwert	0,7	1,3	0,9	1,3	0,9
	Std.-Abw.	0,6	1,1	1,0	1,0	1,0
pilzartig	Mittelwert	0,7	1,2	2,1	2,1	2,7
	Std.-Abw.	0,9	1,1	0,9	1,4	1,1
muffig/modrig	Mittelwert	0,5	0,7	0,9	1,0	1,3
	Std.-Abw.	0,6	0,7	0,9	0,7	1,1
bitter	Mittelwert	0,6	0,6	0,7	0,7	1,0
	Std.-Abw.	0,8	0,8	0,9	0,7	1,2
käsig	Mittelwert	0,2	0,5	0,6	1,0	1,0
	Std.-Abw.	0,4	0,8	1,0	1,3	1,0

**Tabelle 10.36** Texturprofile der im gefrorenen Zustand bestrahlten Nordseegarnelen

Parameter		unbestrahlt	1 kGy	3 kGy	5 kGy	10 kGy
elastisch	Mittelwert	1,8	2,1	2,0	2,0	1,7
	Std.-Abw.	1,0	0,8	1,0	1,1	0,9
zart	Mittelwert	2,6	0,9	0,6	0,7	2,2
	Std.-Abw.	0,9	1,0	0,6	0,7	1,2
saftig	Mittelwert	2,4	2,1	1,8	2,2	1,5
	Std.-Abw.	0,9	0,5	0,7	0,7	0,9
fest	Mittelwert	1,5	2,1	2,7	2,2	1,8
	Std.-Abw.	1,0	1,0	0,8	1,1	1,4
trocken/strohig	Mittelwert	1,4	2,3	2,7	2,1	2,2
	Std.-Abw.	1,3	1,2	1,2	1,3	1,3
zäh	Mittelwert	0,8	1,7	2,2	1,7	1,5
	Std.-Abw.	0,8	1,5	1,3	1,2	1,2
wasserlässig	Mittelwert	2,1	2,1	2,6	2,5	2,5
	Std.-Abw.	1,1	1,3	1,2	1,3	1,0

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Kim Karen Kleeberg  
geboren am: 19.03.1968 in Hamburg  
Familienstand: ledig

## Schulausbildung

09/1974 - 07/1978 Schule Brockdorffstraße in Hamburg, Grundschule  
09/1978 - 05/1987 Gymnasium Rahlstedt in Hamburg  
Schulabschluss: Abitur

## Berufs- und Hochschulausbildung

08/1987 - 07/1989 Ausbildung zur pharmazeutisch-technischen Assistentin an der Berufsfachschule Chemie und Pharmazie Dr. von Morgenstern in Lüneburg  
08/1989 - 01/1990 Praktische Ausbildung zur pharmazeutisch-technischen Assistentin in der Rahlstedt-Center-Apotheke in Hamburg  
10/1990 - 10/1995 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Hamburg  
04.10.1995 Erste Lebensmittelchemische Staatsprüfung, Diplom in Lebensmittelchemie  
11/1995 - 04/1996 Praktische Ausbildung im Handels- und Umweltschutzlaboratorium Dr. Wiertz - Dipl.-Chem. Eggert - Dr. Jörissen GmbH in Hamburg  
05/1996 - 10/1996 Praktische Ausbildung am Hygiene Institut Hamburg  
07.02.1997 Zweite Lebensmittelchemische Staatsprüfung

## Berufstätigkeit

02/1990 - 03/1990 Pharmazeutisch-technische Assistentin in der Rahlstedt-Center-Apotheke in Hamburg  
01/1997 - 01/2001 Aushilfstätigkeit in der mikrobiologischen Abteilung des Handels- und Umweltschutzlaboratoriums Dr. Wiertz - Dipl.-Chem. Eggert - Dr. Jörissen GmbH in Hamburg  
01.04.1997 Beginn der Dissertation in der Abteilung für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg  
10/1997 - 01/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Universität Hamburg  
Seit 02/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitsbereich Abfallwirtschaft und Stadttechnik, Technische Universität Hamburg-Harburg