

**Bestimmung der Aminosäure-Radiolyseprodukte
ortho-Tyrosin und 3-(4-Hydroxyphenyl)-
propionsäure als Nachweis der γ -Bestrahlung
proteinreicher Lebensmittel**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

aus dem

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

vorgelegt von

Jana Huňková
aus Kladno

Hamburg 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1998 bis September 2002 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. Hans Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie - Abt. Lebensmittelchemie - angefertigt.

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

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart danke ich für die Überlassung des Themas und die großartige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Bisping danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. Thomas Simat danke ich für seine stetige Diskussionsbereitschaft und Zusammenarbeit, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Lebensmittelchemie der Universität Hamburg danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Der Firma Beiersdorf AG und der Firma GAMMASTER GmbH danke ich für die Bestrahlung der Proben.

Der Daimler-Benz und der H.-Wilhelm-Schaumann-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Meinen Eltern danke ich für ihre unerschöpfliche Geduld.

Bei meinen Freunden Ruth, Jiří, Robert, Britta, Astrid, Kerstin, Lui und Marijana bedanke ich mich für Korrekturarbeiten und anderweitige vielfältige Unterstützung.

Abkürzungsverzeichnis

3,2-HPPA	3-(2-Hydroxyphenyl)-propionsäure
3,3-HPPA	3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure
3,4-HPPA	3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure
λ_{Ex}	Anregungswellenlänge
λ_{Em}	Emissionswellenlänge
AP-ESI	Atmospheric Pressure Electrospray Ionization
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
CV	Variationskoeffizient
Em	Emission
ESR	Elektronenspinresonanzspektroskopie
EU	Europäische Union
Ex	Anregung
FAO	Food and Agriculture Organization
FIA	Flow Injection Analysis
FL	Fluoreszenz
FLD	Fluoreszenzdetektion
GC	Gaschromatographie
HCl	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAEA	International Atomic Energy Agency
IS	Interner Standard
kGy	Kilo Gray
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
M	Molekülmasse
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
MSD	Massenselektive Detektion
MW	Mittelwert
n	Probenanzahl

n.n.	nicht nachweisbar
n.b.	nicht bestimmt
NH ₄ acetat	Ammoniumacetat
NH ₄ formiat	Ammoniumformiat
NWG	Nachweisgrenze
PE	Polyethylen
Phe	Phenylalanin
RP	Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
SIM	Single Ion Monitoring
SPE	Festphasenextraktion
TFA	Trifluoressigsäure
TL	Thermolumineszenz
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenverhältnis
WHO	World Health Organization
WFR	Wiederfindungsrate

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	10
2	ZIELSETZUNG	15
3	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	16
3.1	Bestrahlung der Lebensmittel	16
3.2	Chemische Wirkungen der ionisierenden Strahlung	17
3.2.1	Primär-Effekt der Bestrahlung	17
3.2.2	Sekundär-Effekt der Bestrahlung	18
3.2.3	Einfluss der Bestrahlungsdosis	20
3.2.4	Einfluss der Dosisleistung	20
3.2.5	Einfluss der Temperatur während der Bestrahlung	20
3.3	Veränderung der Lebensmittel während des Tiefrierens	21
4	MATERIAL	24
4.1	Garnelen	24
4.1.1	Glasieren	26
4.2	Hühnerbrustfleisch	26
4.3	Bestrahlungsanlagen und -bedingungen	27
5	METHODENENTWICKLUNG ZUR BESTIMMUNG VON O-TYROSIN	28
5.1	Optimierung der chromatographischen Bedingungen.....	28
5.2	Optimierung der Detektion.....	30
5.2.1	Fluoreszenzdetektion (FLD)	30
5.2.2	Massenselektive Detektion (MSD)	32
5.3	Entwicklung eines Clean-up	34
5.3.1	Deproteinierung.....	35
5.3.2	Homogenisierung	35
5.3.3	Isolierung des o-Tyr mittels Festphasenextraktion	36
5.4	Validierung	41
5.5	Diskussion.....	42
6	METHODENENTWICKLUNG ZUR BESTIMMUNG VON 3-(4-HYDROXYPHENYL)-PROPIONSÄURE	43
6.1	Optimierung der chromatographischen Bedingungen.....	43

6.2	Optimierung der Detektion	45
6.3	Entwicklung eines Clean-up	46
6.3.1	Deproteinierung	47
6.3.2	Isolierung und Anreicherung der 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion	47
6.3.3	Isolierung und Anreicherung der 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure mittels Festphasenextraktion.....	48
6.4	Validierung	49
6.5	Diskussion	50
7	BESTIMMUNG VON PHENYLALANIN UND P-TYROSIN IN PROTEINREICHEN LEBENSMITTELN	51
8	BESTIMMUNG VON O-TYROSIN IN γ-BESTRAHLTEN PROTEINREICHEN LEBENSMITTELN.....	55
8.1	Einfluss der Temperatur	55
8.1.1	Bestimmung von o-Tyrosin bei RT bestrahlten proteinreichen Lebensmitteln	55
8.1.2	Bestimmung von o-Tyrosin in gefrorenen bestrahlten proteinreichen Lebensmitteln	58
8.2	Einfluss der Dosisleistung	62
8.3	Einfluss der Verarbeitung der Lebensmittel vor der Bestrahlung - Glasierung	64
8.4	o-Tyrosin-Hintergrundgehalte in unbestrahlten Proben.....	66
8.5	Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Phenylalanin und der strahleninduzierten Bildung von o-Tyrosin.....	66
9	BESTIMMUNG VON 3-(4-HYDROXYPHENYL)-PROPIONSÄURE IN γ-BESTRAHLTEN PROTEINREICHEN LEBENSMITTELN.....	69
9.1	Zusammenhang zwischen dem Gehalt an p-Tyrosin und der strahleninduzierten Bildung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure..	71
10	DISKUSSION	72
11	ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY.....	78
11.1	Zusammenfassung.....	78
11.2	Summary	80
12	LITERATUR	82

13	ANHANG	90
13.1	Chemikalien	90
13.2	Geräte	91
13.2.1	HPLC/FLD Anlage.....	91
13.2.2	HPLC/FLD/MSD Anlage.....	91
13.2.3	Weitere Geräte.....	91
13.3	HPLC-Bedingungen	92
13.3.1	Bestimmung von o-Tyrosin, p-Tyrosin und Phenylalanin mittels HPLC/FLD	92
13.3.2	Bestimmung von o-Tyrosin mittels HPLC/MSD.....	92
13.3.3	Bestimmung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure mittels HPLC/FLD.....	93
13.4	Kalibriergeraden und Verfahrenskenndaten	94
13.5	FL-Spektren	103
13.6	Bestrahlungsbedingungen	104
13.7	Clean-up zur Bestimmung von o-Tyrosin in γ-bestrahlten proteinreichen Lebensmitteln	105
13.7.1	Homogenisierung	105
13.7.2	Deproteinierung.....	106
13.7.3	C18-Festphasenextraktion	107
13.7.4	Kationenaustauscher.....	108
13.7.5	Anionenaustauscher.....	109
13.8	Verfahrensvalidierung zur Bestimmung von o-Tyrosin	110
13.9	Verfahrensvalidierung zur Bestimmung von Phenylalanin	110
13.10	Bestimmung von o-Tyrosin, p-Tyrosin und Phenylalanin in γ- bestrahlten proteinreichen Lebensmitteln	111
13.11	Ergebnisse der γ-Bestrahlung der Lebensmittel - Bestimmung von Phenylalanin und p-Tyrosin	111
13.12	Ergebnisse der γ-Bestrahlung der Lebensmittel – Bestimmung von o-Tyrosin	113
13.12.1	Einfluss der Bestrahlungsdosis und Temperatur	113
13.12.2	Einfluss der Dosisleistung.....	114
13.12.3	Einfluss der Glasur	116
13.12.4	Bildung von o-Tyrosin in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis....	116
13.12.5	Bestimmung von o-Tyrosin mittels HPLC/MS	117
13.13	Clean-up zur Bestimmung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure in γ- bestrahlten proteinreichen Lebensmitteln	118
13.13.1	Deproteinierung	118
13.13.2	Probenaufarbeitung – Isolierung und Anreicherung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion	120
13.13.3	C18-Festphasenextraktion.....	121

13.13.4	Anionenaustauscher.....	122
13.14	Verfahrensvalidierung zur Bestimmung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure.....	123
13.15	Bestimmung der 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure in γ-bestrahlten proteinreichen Lebensmitteln.....	123
13.16	Ergebnisse der γ-Bestrahlung der Lebensmittel – Bestimmung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure.....	124
13.17	Chromatogramme.....	125

1 Einleitung

Lebensmittel können zur Konservierung mit γ -Strahlen behandelt werden. Dieses Verfahren ist weltweit in 41 Ländern erlaubt und wird in 26 Staaten auch kommerziell genutzt. Als leicht verderbliche Lebensmittel dürfen Garnelen und Hühnerfleisch mit Dosen bis 7 kGy bestrahlt werden (WHO, 1998, EU RICHTLINIE, 1999). In 11 Staaten ist die Bestrahlung von Garnelen zugelassen. In 10 Staaten darf auch Hühnerfleisch bestrahlt werden. Die Bestrahlung dient dabei zur Haltbarkeitsverlängerung und zur Reduzierung pathogener Keime (z.B. *Salmonella sp.*).

Hühnerfleischprodukte, wie z.B. entbeinte und enthäutete Hühnerbrust, werden oft über lange Handelswege geleitet, bevor sie zum Verbraucher gelangen. Die Gefahr der Salmonellenkontamination bei der Geflügelzucht und in Schlachthöfen ist bekanntlich sehr hoch. Ein weiteres Produkt, bei dem ebenfalls eine intensive Keimbelastung auftreten kann, sind Nordseegarnelen oder andere Krustentiere (*Crustaceen*). Die Garnelen werden direkt nach dem Fang gekocht und danach häufig zum Schalen nach Polen oder Marokko transportiert. Erst über lange Transportwege gelangen diese Produkte zu den Verbrauchern (DEUTSCHE SEE, 1994).

Lebensmittelbestrahlung gilt als ein gründlich untersuchtes und sicheres Verfahren. Ein Expertenkomitee der Food and Agriculture Organization (FAO), der World Health Organization (WHO) und der International Atomic Energy Agency (IAEA) kam 1980 zum Schluss, dass bei Lebensmittelbestrahlung bis zu 10 kGy keine toxikologischen Risiken und keine Bedenken bezüglich mikrobiologischer Kontamination und Einfluss auf den Nährwertgehalt bestehen (WHO, 1981). Die gesundheitliche Unbedenklichkeit der Lebensmittelbestrahlung wurde 1994 von einem Expertengremium der WHO noch einmal bestätigt (WHO, 1994).

In Deutschland ist das Inverkehrbringen bestrahlter Lebensmittel nicht erlaubt, einzig für getrocknete aromatische Kräuter und Gewürze ist die Bestrahlung zugelassen. Zur Einhaltung der rechtlichen Regelungen und zur Kontrolle der

Lebensmittelbestrahlung werden zuverlässige Nachweismethoden für eine erfolgte Bestrahlung benötigt (EHLERMANN and DELINCEE, 1998, EU RICHTLINIE, 1999).

Aufgrund der hohen Ansprüche an die Untersuchungsmethoden zeigten sich nur wenige Verfahren zum Bestrahlungsnachweis für den routinemäßigen Einsatz geeignet. In die amtliche Sammlung der Untersuchungsmethoden nach § 35 LMBG konnten bisher nur einige Verfahren aufgenommen werden (BgVV, 1998) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Amtliche Untersuchungsmethoden nach § 35 LMBG zum Nachweis einer Strahlenbehandlung (ionisierende Strahlen) von Lebensmitteln

Untersuchungsmethode	Lebensmittel	Nummer
Elektronenspinresonanzspektroskopie	Fleisch, knochenhaltig	L 06.00-30
	Fische	L 10.00-6
	Krebstiere	L 12.01-1
	Nüsse	L 23.05-1
	Frischobst	L 29.00-5
	Obstprodukte	L 30.00-3
	Gewürze	L 53.00-3
Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS)	Käse (Camembert)	L 03.00-24
	Fleisch	L 06.00-37
Thermolumineszenz-Messung	Frischobst	L 29.00-4
	Shrimps	L 12.01.02-1
	Frischobst	L 29.00-3
	Gewürze, Gewürzmischungen	L 53.00-2

Obwohl zahlreiche chemische, biologische und physikalische Methoden zur Identifizierung bestrahlter Lebensmittel veröffentlicht wurden (GROOTVELD und JAIN, 1989, IBE et al., 1991, DELINCEE, 1993, GLIDEWELL et al., 1993, SCHREIBER et al., 1993, STEVENSON, 1994, STEVENSON und STEWART, 1995, BÖGL und SCHREIBER, 1995, HELLE et al., 1996, HAIRE et al., 1997), gibt es bis heute keine etablierte Methode zum Nachweis einer erfolgten γ -Bestrahlung für eiweißreiche und gleichzeitig fettarme Lebensmittel (z.B. entbeintes Hühnerfleisch, geschälte Garnelen).

Der Nachweis der Bestrahlung von fettarmen Lebensmitteln ohne Knochen oder Schalen bereitet Schwierigkeiten. Zum einen kann bei geschälten oder entbeinten Produkten nicht auf die ESR-Spektroskopie zurückgegriffen werden (DODD et al., 1985, HELLE et al., 1993). Zum anderen ist die Thermolumineszenz-Untersuchung von mineralischen Bestandteilen (wie z.B. Sand in Darmtrakt von Garnelen) sehr aufwendig (HEIDE, 1990, SCHREIBER et al., 1994). Auch die GC und GC/MS

Bestimmung der strahleninduzierten Kohlenwasserstoffe, den spezifischen Radiolyseprodukten, die aus Fetten durch γ -Bestrahlung gebildet werden, kann aufgrund des niedrigen Fettgehaltes in Hühnerbrust und Garnelen nicht angewendet werden (GLIDEWELL et al., 1993, SCHREIBER et al., 1994). Eine andere Möglichkeit zum Bestrahlungsnachweis bietet die Untersuchung strahleninduzierter Veränderungen an den aromatischen Aminosäuren.

Bei der Bestrahlung von Wasser werden OH-Radikale gebildet, die gegenüber aromatischen Aminosäuren höchst reaktiv sind (VON SONNTAG, 1987). So entstehen beispielsweise nach einem Angriff von radiolytisch gebildeten OH-Radikalen auf Phenylalanin (Phe) die drei möglichen Hydroxy-Phe-Isomere p-Tyr, m-Tyr und o-Tyr (WANG und VON SONNTAG, 1991). m- und o-Tyr entstehen durch Bestrahlung, während p-Tyr physiologisch vorkommt. o-Tyr lässt sich wesentlich einfacher chromatographisch von p-Tyr trennen als m-Tyr. Aus diesem Grund haben KARAM und SIMIC (1988) ein Verfahren zur Identifizierung von bestrahltem Hühnerfleisch über den gaschromatographischen Nachweis von o-Tyr vorgeschlagen. Es wurde eine Reihe von Verfahren veröffentlicht (HELLE et al., 1993, MISCHKE et al., 1993, ZOLLER et al., 1993, CHUAQUI-OFFERMANN und McDOUGALL, 1991b, MEIER et al., 1993), mittels derer proteingebundenes o-Tyr nach saurer Hydrolyse der Lebensmittel mit HPLC/FLD oder nach Derivatisierung mit GC/MS bestimmt werden konnte (BLOUNT und DUNCAN, 1997, LEEUWENBURGH et al., 1997a, 1997b). Trotz der zunächst vielversprechenden Ergebnisse konnte sich das Verfahren nicht durchsetzen. Da o-Tyr auch in unbestrahlten Lebensmitteln nachgewiesen werden konnte (HART et al., 1988, HOUEE-LEVIN, 1994, MEIER et al., 1989), blieb es als Marker für eine stattgefundene γ -Bestrahlung in der Diskussion. Das häufig beschriebene Verfahren zur HPLC Bestimmung von o-Tyr nach Freisetzung der Aminosäuren durch Säure-Hydrolyse der Proteine erwies sich als problematisch. So sind bei der Hydrolyse ein hoher Überschuss an freigesetztem p-Tyr und eine komplexe Matrix entstanden, die die chromatographische Trennung der Tyr-Isomere erschwerten (IBE et al., 1991).

In Geweben und Körperflüssigkeiten aller Lebewesen sind proteingebundene und freie Aminosäuren enthalten. Da Proteine in lebenden Organismen einer ständigen Umsetzung unterliegen, befinden sich proteingebundene und nicht proteingebundene

(freie) Aminosäuren in einem dynamischen Gleichgewicht. Die Menge der freien Aminosäuren ist stets sehr viel kleiner als die der proteingebundenen. Da alle 20 proteinogenen Aminosäuren bei der Proteinbiosynthese benötigt werden, müssen diese im Pool freier Aminosäuren vorhanden sein. Die Konzentration der freien Aminosäuren ist, abhängig von Spezies und Gewebe, intrazellulär wesentlich höher als extrazellulär (ULRICH, 1990).

o-Tyr wird außerdem aus freiem Phe gebildet, welches dem gleichen Reaktionsmechanismus wie das proteingebundene Phe unterliegt. Die Bestimmung von freien o-Tyr bietet einen Ansatz für den Nachweis der γ -Bestrahlung. Das Verfahren hat im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Methoden einen großen Vorteil: eine schonende Aufarbeitung der Probenmatrix. Die Probe wird schnell und einfach durch eine Proteinfällung bearbeitet. Die anschließende Analytik bleibt so unbeeinflusst von Störungen. Probleme bei der Hydrolyse können somit umgangen werden. Zwei Untersuchungen von Garnelen zum Nachweis der γ -Bestrahlung über nicht proteingebundenes o-Tyr wurden bereits durchgeführt (KRACH et al., 1997, HEIN et al., 2000). Neben diesen Untersuchungen an Garnelen wurden auch Verfahren zur Bestimmung des freien o-Tyr im bestrahlten und unbestrahlten Hühnerfleisch veröffentlicht (BERNWIESER und SONTAG, 1995, KRACH und SONTAG, 1997). Die Probenaufarbeitung erfolgte mittels Deproteinierung mit Aceton oder Trichloressigsäure. Die Bestimmung von o-Tyr wurde mittels RP-HPLC durchgeführt. In diesen Arbeiten wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den o-Tyr-Gehalten in unbestrahlten und bestrahlten Proben festgestellt. Keines dieser Verfahren zur Bestimmung von o-Tyr wurde validiert, so dass es routinemäßig für die proteinreichen Lebensmittel eingesetzt werden konnte.

Bei der Behandlung einer wässrigen Lösung von aromatischen Aminosäuren mit dem Fenton-System zur Simulation der Bestrahlung konnte eine Bildung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure (3,4-HPPA) aus Phe und Tyr nachgewiesen werden (KLEEBERG, 2002). Das Fenton-Reagenz ist ein Gemisch aus Wasserstoffperoxid und Eisen(II)-Ionen, das in wässriger Lösung ein wirksames Oxidationsmittel für viele organische Substrate darstellt. Untersuchungen von STADTMAN und BERLETT (1991) und MASKOS et al. (1992) zeigten, dass aromatische Aminosäuren mit dem Fenton-Reagenz und bei γ -Bestrahlung zu den

gleichen Oxidationsprodukten reagieren. Der neue Ansatz für die Identifizierung der γ -bestrahlten proteinreichen und zugleich fettarmen Lebensmittel bietet eine Bestimmung des neuen potentiellen Bestrahlungsmarkers 3,4-HPPA. Anhand eines Screenings entdeckte KLEEBERG (2002) dieses Aminosäure-Radiolyseprodukt in verschiedenen γ -bestrahlten proteinreichen Lebensmitteln, wie Nordseegarnelen, Hühnerbrust und anderen Garnelenarten. Dieser Bestrahlungsmarker war sowohl bei Raumtemperatur als auch in gefrorenen bestrahlten Lebensmitteln nachweisbar. Es konnten signifikante Unterschiede zwischen den 3,4-HPPA-Gehalten in unbestrahlten und bestrahlten Proben festgestellt werden. Die Bestimmung von 3,4-HPPA erfolgte mittels HPLC/FLD. Dieses Verfahren konnte bis jetzt noch nicht als Routineverfahren eingesetzt werden.

2 Zielsetzung

Primäres Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Validierung eines schnell durchführbaren und zuverlässigen Verfahrens zum Nachweis der γ -Bestrahlung von Nordseegarnelen über nicht proteingebundenes o-Tyrosin und eine anschließende Etablierung dieses Verfahrens für den routinemäßigen Einsatz. Das Verfahren sollte dazu dienen, eindeutig unterscheiden zu können, ob Garnelen mit γ -Strahlen behandelt wurden oder nicht.

Um o-Tyrosin empfindlich genug nachweisen zu können, sollte eine HPLC/FLD-Methode entwickelt werden. Hierzu musste die Probenaufarbeitung optimiert werden und ein Clean-up-Verfahren entwickelt werden. Eine Absicherung der Methode sollte über HPLC/MS erfolgen. Anschließend sollte die Anwendbarkeit der Methode auf andere proteinreiche Lebensmittel wie z.B. andere Garnelenarten oder Hühnerfleisch überprüft und ggf. optimiert werden.

Um die Eignung des o-Tyrosin als Bestrahlungsmarker für die Identifizierung der bestrahlten proteinreichen Lebensmittel zu überprüfen, sollten die Einflussfaktoren auf die radiolytische Bildung von o-Tyrosin, wie Bestrahlungsbedingungen (Dosis, Temperatur, Dosisleistung), biologische Variabilität (Lebensmittelmatrix, o-Tyrosin-Hintergrundgehalte in unbestrahlten Proben, Gehalt des Precursors Phenylalanin, Gehalt an p-Tyrosin) und Verarbeitung der Lebensmittel vor der Bestrahlung (Glasierung) untersucht werden.

Weiterhin sollte die Eignung der neuen potentiellen Bestrahlungsmarker 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure für einen Bestrahlungsnachweis in proteinreichen Lebensmitteln überprüft werden. Hierzu musste ein schnelles, einfaches und zuverlässiges Verfahren zur Bestimmung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure mittels HPLC/FLD optimiert und validiert werden. Zur Isolierung und Anreicherung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure aus den Lebensmitteln sollte ein geeignetes Clean-up-Verfahren entwickelt werden.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Bestrahlung der Lebensmittel

Zur Bestrahlung von Lebensmitteln sind drei unterschiedliche Strahlungsarten zugelassen (CODEX ALIMENTARIUS, 1984):

- γ -Strahlen der Radionuklide ^{60}Co (werden künstlich hergestellt aus ^{59}Co , es werden zwei γ -Quanten mit einer Energie von 1,17 MeV und 1,33 MeV emittiert)
- γ -Strahlen der Radionuklide ^{137}Cs (aus Kernspaltung, es wird ein γ -Quant mit einer relativ niedrigen Energie von 0,66 MeV emittiert)
- β -Strahlen bis zur einer Energie von 10 MeV
- Röntgenstrahlen (Sekundärstrahlung aus Elektronenbeschleuniger) bis zu einer Energie von 5 MeV

Zur Lebensmittelbestrahlung werden am häufigsten γ -Strahlen eingesetzt, da sie im Vergleich zu β -Strahlen ein hohes Durchdringungsvermögen für Materie besitzen und deshalb gut zur Bestrahlung von Produkten auf Paletten geeignet sind (DIEHL, 1995).

Abhängig vom Anwendungsbereich der Bestrahlung werden unterschiedliche Bestrahlungsdosen von 0,05 bis 10 kGy verwendet. Der hohe Dosisbereich von mehr als 10 kGy ist für kommerzielle Lebensmittel nicht zugelassen, wird jedoch für spezielle Zwecke zur Sterilisierung eingesetzt. Einige Anwendungsbereiche mit den erlaubten Maximaldosen der Bestrahlung sind in Tabelle 2 zusammengestellt (IAEA, 2000).

Tabelle 2: Anwendung der Lebensmittelbestrahlung

	Anwendungszweck	Dosisbereich (kGy)	Lebensmittel
Niedrige Dosen (unter 1 kGy)	Keimungshemmung	0,05 – 0,15	Kartoffeln, Zwiebeln, Ingwer
	Abtötung von Insekten und Parasiten	0,15 – 0,50	Getreide, frische und getrocknete Früchte
	Reifeverzögerung	0,50 – 1,00	frische Früchte, Gemüse
Mittlere Dosen (1 – 10 kGy)	Verbesserung der Haltbarkeit	1,00 – 3,00	Frischfisch, Erdbeeren usw.
	Abtötung pathogener Mikroorganismen	1,00 – 7,00	Fisch, Fleisch, Geflügel
	Verbesserung technologischer Eigenschaften	2,00 – 7,00	Trauben, dehydratisierte Lebensmittel
Hohe Dosen (10 – 50 kGy)	Industrielle Sterilisation	10 – 50	Fleisch, Geflügel, Krankenhausdiäten
	Dekontamination von Lebensmittelzusätzen	10 – 30	Gewürze, Enzymlösungen, Naturgummi

3.2 Chemische Wirkungen der ionisierenden Strahlung

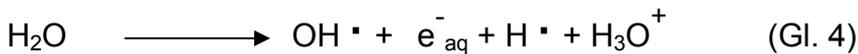
3.2.1 Primär-Effekt der Bestrahlung

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



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

radiolytisch gespalten, wobei im Wesentlichen die folgenden Radiolyseprodukte auftreten (Gl. 4) (DRAGNIC und DRAGNIC, 1963, VON SONNTAG, 1987, DODD, 1995):



3.2.2 Sekundär-Effekt der Bestrahlung

Die durch den Primär-Effekt der ionisierenden Bestrahlung gebildeten freien Radikale sind sehr reaktiv und können untereinander oder mit den Lebensmittelinhaltsstoffen reagieren, was zu den Sekundär-Produkten der Bestrahlung führt. Die dabei entstandenen Spezies können wie folgt weiterreagieren (Gl. 5, 6, 7):



Hydroxyl-Radikale als primäre Radiolyseprodukte des Wassers wirken stark oxidativ. Besonders reaktiv sind diese gegenüber ungesättigten Verbindungen und solchen mit aromatischen Ringen (KARAM und SIMIC, 1989, WANG et al., 1993). Beim Angriff eines OH-Radikals auf Phe kommt es zur Addition an den aromatischen Ring, wobei vier mögliche Zwischenprodukte (Abbildung 1) gebildet werden. Drei von ihnen (1, 2, 3) führen zur Bildung von Hydroxy-Phe, die Ipso-Form (4) hingegen zu unbekanntem Produkten (WANG et al., 1993).

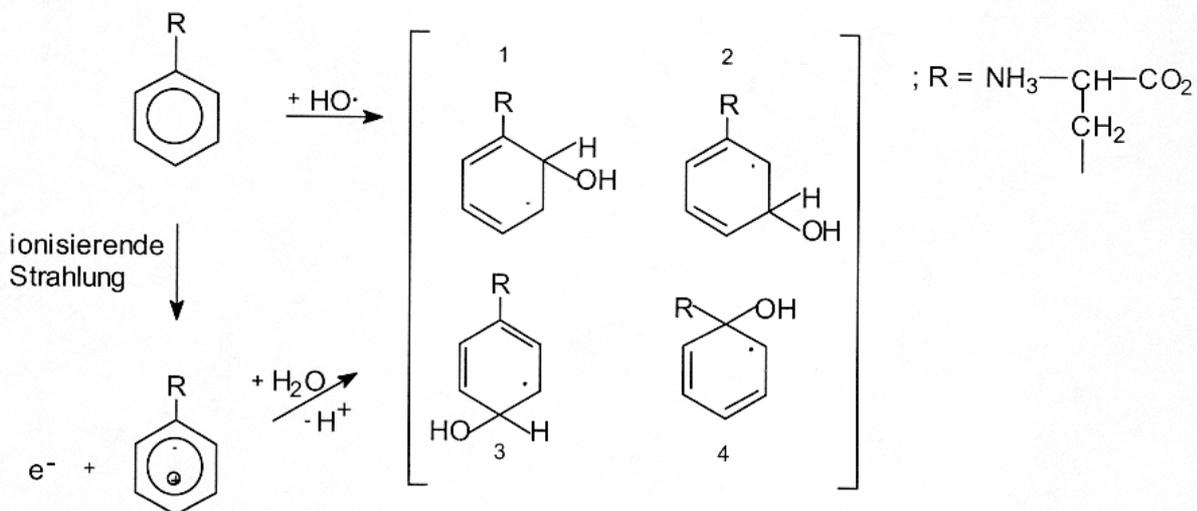


Abbildung 1: Bildung der Hydroxy-Phe-Radikale durch Primär- und Sekundär-Effekt

Die Hydroxy-Phe-Radikale aus Primär- und Sekundär-Effekt werden oxidiert mit geeigneten Oxidationsmitteln wie freie Radikale, Fe^{3+} -Ionen oder Sauerstoff und es entstehen o-Tyr (50%) (Abbildung 2), m-Tyr (14%) und p-Tyr (30%) (WANG und VON SONNTAG, 1991).

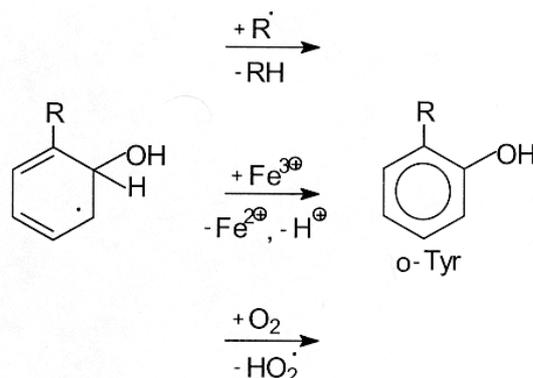


Abbildung 2: Oxidation des o-Hydroxy-Phe-Radikals zu o-Tyr

Die Menge der bei der Bestrahlung entstehenden Tyr-Stellungsisomere und ihr Verhältnis hängen von zahlreichen Parametern ab, wobei der pH-Wert der Umgebung und das Vorhandensein von Oxidantien - besonders von Sauerstoff - die größte Rolle spielen (VON SONNTAG, 1987, WANG und VON SONNTAG, 1991, WANG et al., 1993). Bei niedrigen pH-Werten kommt es bei nicht proteingebundenen Aminosäuren auch zur Decarboxylierung - die Abgabe von CO_2 kann zum Bestrahlungsnachweis genutzt werden (FURUTA et al., 1997). Bei der Bestrahlung wässriger Lösungen von aromatischen Aminosäuren treten im Wesentlichen die Hydroxylierungsreaktionen am aromatischen Ring auf. Dabei spielt die oxidative und die reduktive Desaminierung nur eine untergeordnete Rolle (GETOFF, 1992, MASKOS et al., 1992, SOLAR et al., 1984).

Die Reaktionen, die bei der γ -Bestrahlung in Lebensmitteln auftreten, sind höchst komplex. Sie sind von der Zusammensetzung, insbesondere dem Wassergehalt, der Temperatur, dem Sauerstoffgehalt und dem pH-Wert abhängig (THAKUR und SINGH, 1994, URBAIN, 1986, TAUB et al., 1978). Es wurde ebenfalls nachgewiesen, dass auch Antioxidantien dabei eine wichtige Rolle spielen können. HOEY und BUTLER (1984) berichteten über einen stark hemmenden Effekt der Antioxidantien auf die Bildung von freien Radikalen.

3.2.3 Einfluss der Bestrahlungsdosis

Das Ausmaß der primären und sekundären Effekte ist von der Bestrahlungsenergie, die von der bestrahlenden Substanz absorbiert wird – d.h. der Bestrahlungsdosis, abhängig. Die Bildung des Produktes steigt gewöhnlich mit der Dosis. Dies stimmt im Bereich von sehr hohen Dosen nicht: Wenn das radiolytische Produkt, das sich bei den niedrigen Dosen gebildet hat, selbst durch die Strahlung zerstört wird, dann wird die Produktbildung nicht mit der Dosis linear ansteigen. Es ist auch möglich, dass eine kleine Menge von Radikalfängern, wie z.B. Antioxidantien, im Bestrahlungssystem vorhanden ist. Diese würden anfänglich die Produktbildung unterdrücken. Wenn die Radikalfänger nach der Anwendung einer hohen Dosis verbraucht sind, steigt die Produktbildung an. In der Lebensmittelbestrahlung ist generell mit einem linearen Anstieg der Wirkungen bei steigender Dosis zu rechnen (DIEHL, 1995).

3.2.4 Einfluss der Dosisleistung

Dosisleistung ist die Strahlendosis, die pro Zeiteinheit absorbiert wird. Die Dosisleistung eines γ -Strahlers liegt gewöhnlich unter 36 kGy/h. In diesem Bereich wurden keine Auswirkungen der Dosisleistung auf die Reaktionen in Lebensmitteln festgestellt. Es entstehen die gleichen radiolytischen Produkte, ungeachtet ob die Probe mit einer niedrigen oder hohen Dosisleistung bestrahlt wurde. Die praktischen Erfahrungen zeigen, dass in der Lebensmittelbestrahlung die Auswirkung der Dosisleistung von geringer Bedeutung sind (DIEHL, 1995).

3.2.5 Einfluss der Temperatur während der Bestrahlung

Die Temperatur während der Bestrahlung beeinflusst stark das Ausmaß der radiolytischen Veränderungen. Gefrieren kann einen hemmenden Effekt auf die Bildung der Radiolyseprodukte haben. Die Reaktivität der radiolytisch gebildeten freien Radikale lässt aufgrund der eingeschränkten Mobilität in den tiefgefrorenen Materialien nach (KRAJNIK et al., 1995). Die Diffusion ist unter diesen Bedingungen sehr eingeschränkt, so dass sich die freien Radikale nicht bewegen können und dadurch auch keine Reaktionspartner finden können. Wenn sich das tiefgefrorene Material aufwärmt, sind die freien Radikale in ihrer Mobilität nicht mehr behindert, und verschwinden durch eine Reaktion miteinander oder mit anderen Substanzen

(DIEHL, 1995). Die Reaktivität der freien Radikale (H , OH , e^-_{aq}), die während der Radiolyse von Wasser entstehen, ist von dem Aggregatzustand und der Temperatur abhängig. Die Effektivität der strahleninduzierten chemischen Veränderungen wird als G-Wert angegeben. Der G-Wert stellt die Menge von Atomen, Molekülen oder Ionen dar, die bei 100 eV absorbierter Energie in einem Bestrahlungssystem entstehen. Der G-Wert des OH-Radikals ebenso wie der G-Wert des solvatisierten Elektrons sinkt mit der Temperaturerniedrigung stark ab (Tabelle 3). 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 (GARRISON, 1981, TAUB et al., 1978). Wasserstoffradikale werden nur zu einem geringen Anteil bei der Radiolyse des Wassers gebildet. Ihr Anteil an den Reaktionen ist daher so gering, dass dieser im Allgemeinen zu vernachlässigen ist (ARMSTRONG und SWALLOW, 1969). Der protektive Effekt des Gefrierens kann eine wichtige Rolle in der Lebensmittelbestrahlung spielen. So ist z.B. die sensorische Qualität des Fleisches, das mit einer hohen Bestrahlungsdosis bestrahlt wird, im tiefgefrorenen Zustand besser als von Fleisch, welches bei RT bestrahlt wird (DIEHL, 1995).

Tabelle 3: G-Werte der primären Radikale in wässrigen Systemen (TAUB et al., 1978)

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

3.3 Veränderung der Lebensmittel während des Tieffrierens

Der Hauptbestandteil aller leichtverderblichen Lebensmittel ist Wasser. In Geweben kommt es entweder als freies Wasser oder teilweise als an die Zellen gebundenes Wasser vor und verhält sich damit beim Gefrieren verschieden. In der Biochemie spricht man von intrazellulärem (Gesamtheit der Flüssigkeit innerhalb der Zellen), extrazellulärem (Wasser des Blutplasma, der Gewebeflüssigkeit und des Bindegewebes) sowie transzellulärem Wasser (Wasser des Verdauungstraktes). Als Lösungsmittel für ionendispers gelöste Salze sowie für die Vielzahl löslicher organischer Stoffe und schließlich als Dispersionsmittel für Kolloide ist es untrennbar mit allen Lebensprozessen verbunden.

Der flüssige Anteil der Lebensmittel beginnt, je nach der Konzentration der in der Gewebeflüssigkeit gelösten Stoffe, bei Temperaturen zwischen $-0,5^{\circ}\text{C}$ und etwa -3°C zu gefrieren. In der verbleibenden Flüssigkeit reichern sich die Inhaltsstoffe an und führen zu einer Senkung des Gefrierpunktes. Durch das Absinken der Temperatur werden weitere Teile der Flüssigkeit ausgefroren. Die Konzentration der gelösten Stoffe im noch nicht ausgefrorenen Wasseranteil steigt damit an (HERRMANN, 1970). Die stärksten und raschesten chemischen Gefrieränderungen treten meist im Temperaturbereich bis -5°C auf, in dem der größte Teil des Wassers ausfriert. In diesem Bereich treten für die Zelle abnorm hohe, die Eiweißdenaturierung fördernde Salzkonzentrationen, Veränderungen des pH-Wertes und Verschiebung der Ionengleichgewichte auf. Der Gefrierprozeß ist erst bei etwa -30°C abgeschlossen. Der bei dieser Temperatur noch nicht ausgefrorene Wasseranteil ist fest an die Proteine oder an die Kohlenhydrate gebunden, so dass er auch bei sehr tiefen Temperaturen nicht gefriert. Man nennt ihn daher auch das gebundene oder das nicht gefrierbare Wasser. Aus dem Vergleich der in verschiedenen Lebensmitteln im Temperaturbereich von -40°C bis -70°C maximal ausgefrorenen Wassermenge mit ihrem Gesamtwassergehalt, stellte man fest, dass bei den meisten Produkten 0,3 bis 0,4 kg Wasser je kg Trockensubstanz nicht gefrieren (GUTSCHMIDT, 1964). Dieser Wasseranteil ist vom Anfangsgehalt weitgehend unabhängig (HERRMANN, 1970).

Beim Gefrieren kommt es zur Denaturierung der Proteine. Proteine erleiden als Folge des Tiefgefriervorganges eine Veränderung der räumlichen Verteilung im Sinn einer Aggregation der Eiweißpartikel, wobei z.B. die Aggregation und Vernetzung von Proteinmolekülen über die Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken von Wichtigkeit für die Gefrierdenaturierung sind. Damit sind meist verminderte Wasserbindungsfähigkeit der Eiweißstoffe sowie Änderungen der Viskosität oder der Oberflächenspannung verbunden. Im Gegensatz zu den Proteinen werden die ionendispers gelösten Stoffe (Salze, Kohlenhydrate usw.) durch den Gefriervorgang in ihrer Struktur nicht verändert. Mineralstoffe, wie Phosphor, Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und Eisen sind ein wesentlicher Bestandteil des lebenden Protoplasmas und für die Aufnahme der Nahrung durch den Organismus und den geordneten Ablauf der Lebensvorgänge unentbehrlich. Natrium- und Chlorid-Ionen tragen zur Regelung des osmotischen Druckes der Körperflüssigkeit und zur

Normalisierung der Verdauungsfunktionen bei (GUTSCHMIDT, 1964). Aus den Lipiden werden enzymatisch freie Fettsäuren freigesetzt. Ihre Bildung ist temperaturabhängig und bei tieferer Temperatur langsamer als bei höheren. Enzyme werden durch den Tiefgefriervorgang in der Regel nicht zerstört. Bei einer Temperaturerhöhung können sie wieder voll aktiv sein. Enzyme des Fettverderbs, z.B. Lipasen und Lipoxydasen sind auch bei tiefen Temperaturen noch aktiv und führen zur Bildung von Fettabbauprodukten (Aldehyde, Ketone, Säuren, Peroxide) und zur Spaltung von Phosphatiden (HERRMANN, 1970).

4 Material

4.1 Garnelen

Garnelen gelten wegen ihres Aromas als eine Delikatesse. 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 Geißelgarnelen besitzen den größten Marktanteil. Sie werden aufgrund ihres Lebensraumes als Tiefsee- bzw. Kaltwasser-Garnelen bezeichnet. Krebstiere werden zunehmend in Aquakulturanlagen in Südostasien, Südamerika und den Südstaaten der USA gezüchtet. 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 sind in frischem Zustand besonders leicht verderblich und werden zumeist schon auf den Fangsschiffen gekocht und ggf. konserviert. Aufgrund der hohen Verderblichkeit werden Garnelen in vielen Ländern zur Konservierung mit γ -Strahlen behandelt. Für einen Bestrahlungsnachweis über freie Aminosäure-Radiolyseprodukte ist der Gehalt an freien Aminosäuren in den Garnelen von Bedeutung (Tabelle 5). Die Zusammensetzung des essbaren Anteils von Garnelen ist in Tabelle 4 zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 4: Zusammensetzung verschiedener Garnelenarten in g/100g Frischgewicht (SOUCI et al., 1994, TAKADA et al., 1988)

	Nordseegarnelen (<i>Crangon crangon</i>)	Black Tiger Garnelen (<i>Penaeus monodon</i>)	Tiefseegarnelen (<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 5: Freie Aminosäuren in Nordseegarnelen (WEBER und VAN MARREWIJK, 1972), Black Tiger Garnelen und Tiefseegarnelen (TAKADA et al., 1988) in mg/kg Frischgewicht

Aminosäure	Nordseegarnelen (<i>Crangon crangon</i>)	Black Tiger Garnelen (<i>Penaeus monodon</i>)	Tiefseegarnelen (<i>Penaeus indicus</i>)
Phenylalanin	84	140	80
Tyrosin	105	190	70

Der Gehalt freier Aminosäuren ist in den meisten Crustaceen mehrfach höher als in den Geweben von Wirbeltieren (CLAYBROOK, 1983). Dieser Aminosäurepool dient vor allem Krustentieren aus salzhaltigen Gewässern zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts (CLAYBROOK, 1983, WEBER und VAN MARREWIJK, 1972). Die Crustaceen weisen hohe Anteile an freie Aminosäuren Arginin, Prolin, Alanin, Glycin und Glutamin auf. Phenylalanin und Tyrosin sind dagegen in Geweben und Körperflüssigkeiten von Crustaceen zu etwa 1% und 2% des Gesamtgehaltes an freie Aminosäuren vorhanden (CLAYBROOK, 1983). Freie Aminosäuren unterliegen innerhalb einer Gattung starken Schwankungen. Selbst bei einem Individuum schwankt der Gehalt beim Wechsel des physiologischen Zustandes (z.B. Häutungszustand der Crustaceen) (ULRICH, 1990).

Nordseegarnelen (*Crangon crangon*) kommen sowohl geschält oder ungeschält, als auch gekühlt oder tiefgefroren (glasiert oder unglasiert) in den Handel. Die importierten Garnelen wie z.B. Black Tiger Garnelen oder Tiefseegarnelen werden fast ausschließlich tiefgefroren vertrieben (glasiert oder unglasiert). Für die Untersuchungen wurden kommerziell erhältliche Nordseegarnelen (*Crangon crangon*) verwendet. Ungeschälte, gekühlte Nordseegarnelen wurden auf dem Markt gekauft, per Hand geschält und anschließend bei -18 °C tiefgefroren. Außerdem wurden tiefgekühlte glasierte Nordseegarnelen im Supermarkt gekauft. Weiterhin wurden im Supermarkt tiefgekühlte glasierte und unglasierte Black Tiger Garnelen (*Penaeus monodon*) und Tiefseegarnelen (*Penaeus indicus* und *Penaeus merguensis*) gekauft und untersucht. Die Garnelen wurden in die Polyethylen-(PE)-Beuteln verpackt, eingefroren, bestrahlt und anschließend im tiefgefrorenen Zustand aufbewahrt. Die Proben wurden erst vor der Analyse wieder aufgetaut. Der zur Bestrahlung bei Raumtemperatur vorgesehene Anteil der Proben wurde erst kurz vor der Bestrahlung aufgetaut und direkt danach wieder eingefroren.

4.1.1 Glasieren

Garnelen und andere Meeresfrüchte, die als Tiefkühlware in den Handel kommen, werden meist mit Wasser „glasier“t. Unter Glasieren versteht man das Überziehen des im unverpackten Zustand gefrorenen Gutes mit einer Eisschicht durch Eintauchen in Eiswasser. Durch die Glasur erhält das Gefriergut einen natürlichen Schutz gegen Austrocknung. Dadurch werden Gewichtsverluste, die Ausbildung von Ranzigkeit, Farb- und Geschmacksverluste sowie Gefrierbrand besser vermieden (GUTSCHMIDT, 1964).

4.2 Hühnerbrustfleisch

Unter Hühnerbrustfleisch versteht man das von Fett und Knochen befreite Brustmuskelfleisch von Hähnchen. Tabelle 6 zeigt die durchschnittliche Zusammensetzung von Hühnerbrustfleisch. In Tabelle 7 ist der Gehalt von freien Aminosäuren Tyr und Phe dargestellt. Im Vergleich zu Garnelen besitzt Hühnerbrustfleisch hohe Anteile an den Aminosäuren Lysin und Histidin. Die Gehalte an freien Aminosäuren liegen ca. um den Faktor 5 niedriger als bei Garnelen. Aufgrund der häufigen mikrobiellen Kontamination von Hühnerfleisch, vor allem mit Salmonellen, wird in vielen Ländern (z.B. Frankreich, Niederlande) eine γ -Bestrahlung zum Zwecke der Abtötung pathogener Mikroorganismen durchgeführt. Für die Untersuchungen wurde frisches Hühnerbrustfleisch im Supermarkt gekauft, in die Polyethylen-(PE)-Beuteln verpackt, bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, bestrahlt und anschließend im tiefgefrorenen Zustand aufbewahrt. Die Proben wurden erst vor der Analyse wieder aufgetaut. Der zur Bestrahlung bei Raumtemperatur vorgesehene Anteil der Proben wurde erst kurz vor der Bestrahlung aufgetaut und direkt danach wieder eingefroren.

Tabelle 6: Zusammensetzung von Hühnerbrustfleisch in g/100g Frischgewicht (SOUCI et al., 1994)

	Hühnerbrustfleisch
Wasser	75,0
Protein	22,8
Fett	0,9
Mineralstoffe	1,2

Tabelle 7: Freie Aminosäuren im Hühnerbrustfleisch (MILLER et al., 1965) in mg/kg Frischgewicht

Aminosäure	Hühnerbrustfleisch
Phenylalanin	33,4
Tyrosin	50,6

4.3 Bestrahlungsanlagen und -bedingungen

Die Bestrahlung der Proben bei RT mit den Zieldosen von 1, 3, 5 und 10 kGy erfolgte in einer Blutbestrahlungsanlage IBL-437C (CIS-Isotopendiagnostik) der Firma Beiersdorf AG mit einer ^{137}Cs -Strahlenquelle und einer Dosisleistung von 0,7 kGy/h. Diese Anlage wird zu mikrobiologischen Forschungszwecken eingesetzt.

Die Bestrahlung der Proben im gefrorenen Zustand bei -4 °C bis -18 °C mit den Zieldosen von 1, 3, 5 und 10 kGy erfolgte in einer kommerziellen Bestrahlungsanlage für Lebensmittel der Firma GAMMASTER International B.V., Ede, Niederlande, mit einer ^{60}Co -Strahlenquelle und einer Dosisleistung von 1,2 kGy/h.

Die Bestrahlung der Proben bei RT und im gefrorenen Zustand bei -3 °C bis -18 °C mit den Dosen von 1, 3, 5 und 10 kGy erfolgte in einer kommerziellen Bestrahlungsanlage der Firma GAMMASTER Deutschland GmbH mit einer ^{60}Co -Strahlenquelle und einer Dosisleistung von 2 und 4 kGy/h.

Die gefrorenen Proben wurden entweder vor der Bestrahlung aufgetaut (Bestrahlung bei RT) oder während der Bestrahlung mit Kühlelementen bei niedrigen Temperaturen von -3 °C bis -18 °C gehalten (Bestrahlung im gefrorenen Zustand). Die von den Proben absorbierte Dosis wurde in Falle der ^{137}Cs -Anlage mit „Amber Perspex“ und bei der ^{60}Co -Anlage mit „Red Perspex“ Dosimetern gemessen. Die Dosimeter wurden zwischen den zu bestrahlenden Proben verteilt. Je nach Strahlendosis verfärbten sich die Messplättchen aus Polyacrylmetacrylat, und die absorbierte Dosis wurde photometrisch bestimmt. Die genaue Strahlendosis wurde mittels einer Kalibrierkurve berechnet, die gegen genormte Alanin-Dosimeter aufgenommen wurde.

5 Methodenentwicklung zur Bestimmung von o-Tyrosin

Die Bestimmung von o-Tyrosin wird schon seit vielen Jahren mit Hilfe der RP-HPLC durchgeführt (CHUAQUI-OFFERMANN et al., 1993, HELLE et al., 1993, MISCHKE et al., 1993, ZOLLER et al., 1993, MEIER et al., 1993, BERNWIESER und SONTAG, 1995, KRACH und SONTAG, 1997, HEIN et al., 2000). Da o-Tyr fluoresziert, ist eine einfache und selektive Detektion unter Einsatz eines FI-Detektors ohne weitere Derivatisierung möglich. Dabei ist die Empfindlichkeit der Detektion vom pH-Wert abhängig. Es wurde eine Reihe von Verfahren veröffentlicht (ISHIMITSU et al., 1986, MEIER et al., 1989, CHUAQUI-OFFERMANN und McDOUGALL, 1991a, MISCHKE et al., 1993, HEIN et al., 2000), in derer o-Tyr mittels FI-Detektion bestimmt wurde. Die UV-Detektion zeigte sich für die Bestimmung von o-Tyr als weder empfindlich noch selektiv genug (HEIN et al., 2000). Zur Identifizierung von o-Tyr kann weiterhin ein massenselektiver Detektor mit Elektrospray-Ionisation (AP-ESI) eingesetzt werden.

5.1 Optimierung der chromatographischen Bedingungen

Zur Entwicklung einer HPLC-Methode zur Bestimmung von o-Tyr wurde von der Methode von HEIN et al. (2000) ausgegangen. Ein isokratischer Lauf erfolgte auf einer Nucleosil 120 3C18 250 × 4 mm Säule bei einer Temperatur von 35 °C und 0,1% TFA als mobile Phase. Bei der Überprüfung dieses Trennsystems zeigte sich, dass die Bestimmung des in den Proben im Spurenbereich vorhandenen o-Tyr mit dem Eluenten 0,1% TFA (pH=1,8) nicht gewährleistet wurde. Aus diesem Grunde sollte das Trennsystem durch die Wahl einer geeigneten mobilen und stationären Phase verbessert werden.

Als mobile Phasen wurden 0,1% TFA (pH=1,8), Ammoniumformiatpuffer (NH₄formiat) (pH=4) und Ammoniumacetatpuffer (pH=4) getestet. Aufgrund der besten Trennleistung und erhöhter Empfindlichkeit der Bestimmung wurde statt 0,1% TFA ein NH₄formiat-Puffer verwendet (pH=4). Mit dem NH₄formiat-Puffer sollte des Weiteren die stationäre Phase des Trennsystems für die Bestimmung der Tyrosin-Isomere optimiert werden. Für diese Optimierung wurde das

Standardgemisch von p-Tyr, α -Methyl-p-Tyr (interner Standard) und o-Tyr verwendet. Die Eignung von verschiedenen RP C18 Säulen für die Bestimmung von Tyr-Isomeren wurde geprüft (Abbildung 3).

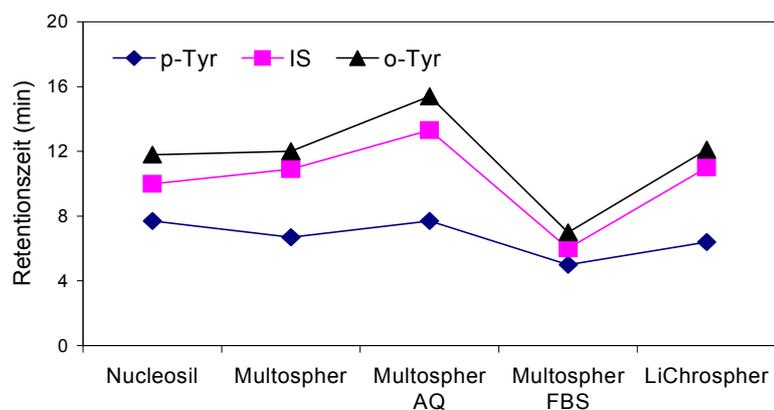


Abbildung 3: Selektivität des Trennsystems bei verschiedenen stationären Phasen, NH_4 formiat-Puffer pH 4 (Chromatographiebedingungen siehe 13.3)

Die Trennleistung wurde von den verschiedenen Phasen unterschiedlich beeinflusst. Dieser Einfluss wird insbesondere bei der Multospher FBS Säule deutlich, da es sich um eine schwermetallarme Spezialsäule handelt, deren C18-Oberfläche durch Quervernetzungen weniger polare Eigenschaften besitzt als die übrigen Säulenmaterialien. Die optimalen Eigenschaften zur Trennung der Tyr-Isomere zeigte die Multospher AQ Säule. Diese schwermetallarme Spezialphase weist eine hydrophile Oberfläche auf und ist deswegen zur Trennung hydrophiler Substanzen geeignet. Der Vorteil dieser Säule beruht darauf, dass Wasser ohne Zusatz von organischen Lösungsmitteln als Eluent verwendet werden kann. Für die weiteren Untersuchungen wurde wegen der guten Trennung der Tyr-Isomere die Säule Multospher AQ 120 5C18 250 \times 4 mm als stationäre Phase verwendet. Als Beispiel ist in Abbildung 63 das Chromatogramm von Tyr-Isomeren und Phe dargestellt.

Interner Standard

In älteren Arbeiten (ISHIMITSU et al., 1989, IBE et al., 1991) wurde α -Methyl-p-Tyr als interner Standard genutzt (Abbildung 4). α -Methyl-p-Tyr liegt mit einer Retentionszeit von 14 min zwischen den Retentionszeiten des Großteils der Matrix und des o-Tyr. Darüber hinaus ist seine Fluoreszenzresponse dem o-Tyr sehr ähnlich. α -Methyl-p-Tyr wird für die Optimierung und Validierung des Verfahrens als interner Standard verwendet.

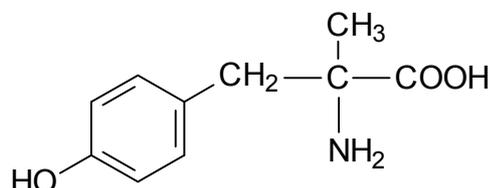


Abbildung 4: Strukturformel von α -Methyl-p-Tyr

5.2 Optimierung der Detektion

Sowohl die hydroxylierten Radiolyseprodukte o- und p-Tyr, als auch Phe und α -Methyl-p-Tyr sind aromatische Substanzen (π -Elektronensystem des Grundgerüsts), die fluoreszierende Eigenschaften besitzen und sich daher fluorimetrisch bestimmen lassen. Ein massenselektiver Detektor mit Elektrospray-Ionisation (AP-ESI) könnte bei diesen Substanzen ebenfalls eingesetzt werden.

5.2.1 Fluoreszenzdetektion (FLD)

Als Detektionsmethode für Tyr-Isomere wird von zahlreichen Autoren (ISHIMITSU et al., 1986, CHUAQUI-OFFERMANN und McDOUGALL, 1991a, HEIN et al., 2000) die FI-Detektion bei einer Anregungswellenlänge von 275 nm und einer Emissionswellenlänge von 305 nm beschrieben. Darüber hinaus sollten die Anregungs- und Emissionswellenlängen überprüft werden.

Überprüfung der Anregungs- und Emissionswellenlängen von o-Tyrosin

Zur Überprüfung der Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden für o-Tyr die Anregungs- und Emissionsspektren aufgenommen (Anhang 13.5, Abbildung 57 und 58). Dabei wurde der Einfluss des pH-Wertes im Bereich von 1,5 bis 9,3 auf das Anregungs- und Emissionsmaximum untersucht. Für den Analyten ergab sich ein Anregungs- und Emissionsmaximum von $\lambda_{\text{Ex}} = 272$ nm und $\lambda_{\text{Em}} = 297$ nm. Diese Wellenlängen liegen nur etwas unter denen in der Literatur verwendeten Wellenlängen (HEIN et al., 2000) und stellen keinen signifikanten Unterschied dar. Deswegen wurde die Wellenlängenkombination einer Anregung von $\lambda_{\text{Ex}} = 275$ nm und einer Emission bei $\lambda_{\text{Em}} = 305$ nm beibehalten. Eine Abhängigkeit des Anregungsmaximums und des Emissionsmaximums vom pH-Wert konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 5).

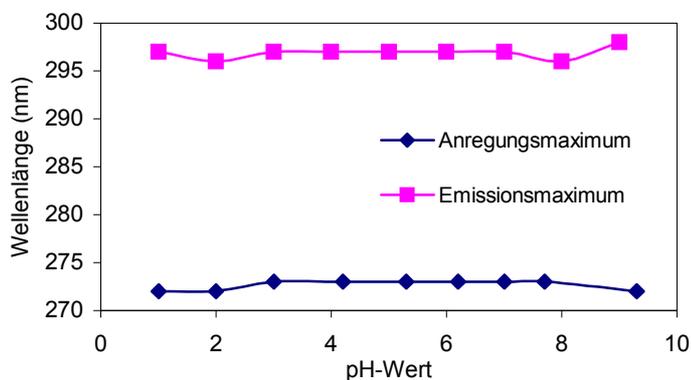


Abbildung 5: Einfluss des pH-Wertes auf das Anregungs- und Emissionsmaximum

Optimierung der Fluoreszenzintensität

Die fluoreszierenden Eigenschaften der Tyr-Isomere sind vom pH-Wert abhängig. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des pH-Wertes des Puffers auf die Fluoreszenzintensität des o-Tyr und dadurch auch auf die Empfindlichkeit der Detektion untersucht. Dafür wurden die o-Tyr-Lösungen im Phosphatpuffer mit pH-Werten zwischen 1,5 und 9,3 fluorimetrisch vermessen ($\lambda_{\text{Ex}} = 275 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 305 \text{ nm}$). Dabei wurde festgestellt, dass die Fluoreszenzintensität im pH-Bereich von 4-5 ihr Maximum erreicht (Abbildung 6).

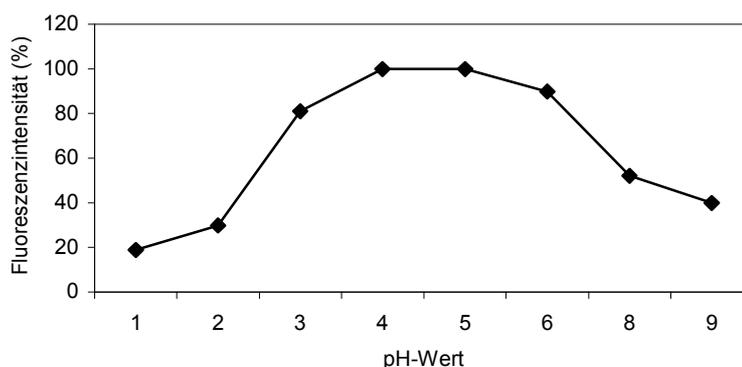


Abbildung 6: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des o-Tyr vom pH-Wert

Zur Übertragung der Ergebnisse, die mit Phosphatpuffer erreicht wurden, auf die getesteten mobilen Phasen wurde wie folgt verfahren. Eine o-Tyr-Lösung in dem von HEIN et al. (2000) verwendeten Eluenten 0,1% TFA (pH 1,8) wurde ebenso fluorimetrisch vermessen ($\lambda_{\text{Ex}} = 275 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 305 \text{ nm}$). Ebenfalls wurde o-Tyr in einer Lösung von 0,005 mol/L NH_4 formiat bei pH 3, 4 und 4,5 untersucht. Die maximale Fluoreszenzintensität wurde bei einer o-Tyr-Lösung im NH_4 formiat-Puffer bei pH 4

gemessen, ebenso wie im Phosphatpuffer bei pH 4. Bei einem pH-Wert von 1,8, was dem pH-Wert des bis jetzt verwendeten Eluenten 0,1% TFA entspricht, waren nur noch 33% der maximalen Fluoreszenzintensität messbar (Abbildung 7). Die Empfindlichkeit der Bestimmung hat sich bei der Verwendung von 0,005 mol/L NH₄formiat-Puffer (pH 4,0) als wässrige Komponente im Eluenten im Vergleich zu 0,1% TFA (pH 1,8) deutlich verbessert. Die Verwendung eines 0,005 mol/L NH₄formiat-Eluenten mit einem pH-Wert von 4 erwies sich für die weiteren Untersuchungen als optimal (Abbildung 7).

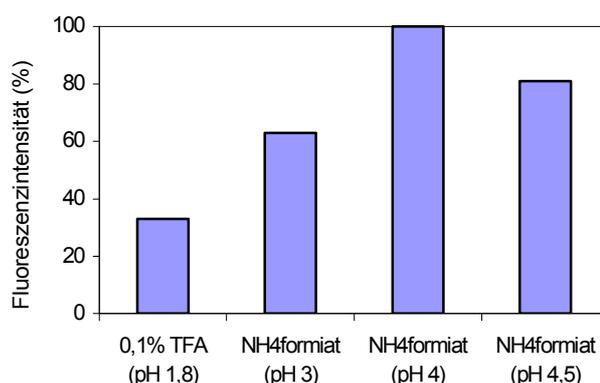


Abbildung 7: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des o-Tyr vom pH-Wert

Überprüfung der Anregungs- und Emissionswellenlängen von Phe

Zur Überprüfung der von ISHIMITSU et al. (1986) verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen ($\lambda_{\text{Ex}} = 258 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 288 \text{ nm}$) für Phe wurden von einer Phe-Lösung im Wasser die Anregungs- und Emissionsspektren aufgenommen (Anhang 13.5, Abbildung 59 und 60). Für den Analyten ergab sich ein Anregungs- und Emissionsmaximum von $\lambda_{\text{Ex}} = 258 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{Em}} = 288 \text{ nm}$. Diese Wellenlängen stimmen mit den in der Literatur angegebenen Wellenlängen überein.

5.2.2 Massenselektive Detektion (MSD)

Zur Absicherung des Nachweisverfahrens für o-Tyr mittels HPLC/FLD wurde eine HPLC Methode mit massenspektrometrischer Detektion entwickelt und optimiert. Es handelte sich dabei um eine AP-ESI-Methode (Atmospheric Pressure Electrospray Ionization), eine schonende Methode für höher molekulare, polare Substanzen mit leicht ionisierbaren Gruppen. Nach der Ionisierung und Überführung in ein Vorvakuum können die Moleküle durch Kollision mit Stickstoffatomen auf dem

energetisch günstigsten Weg in Molekülbruchstücke zerlegt werden (Collision Induced Dissociation, CID), wenn die aufgenommene Energie das zur Fragmentierung notwendige Maß überschreitet. Dadurch entstehen geladene Fragmentationen, die in einem elektrischen Feld beschleunigt und in einem Magnetfeld entsprechend ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/z -Wert) getrennt werden. Auf diese Weise kann ein Massenspektrum registriert werden, hier beispielhaft für o-Tyr dargestellt (Abbildung 68). Im Massenspektrum jeder Substanz treten typische Ionen in einem charakteristischen Verteilungsmuster auf. Das Signal mit der höchsten Massenzahl kann entweder das protonierte Molekül $[M^H]^+$ oder einen Addukt dieser Substanz mit Bestandteilen des Eluenten darstellen. Für o-Tyrosin ergab sich das protonierte Molekülion m/z 182 $[M^H]^+$, der das größte Signal darstellt. Die übrigen charakteristischen Fragmentationen mit einer kleineren Masse sind die Molekülbruchstücke m/z 165 $[M^{NH_2}]^+$ und m/z 136 $[M^{COOH}]^+$. In Tabelle 8 sind für o-Tyr als auch den α -Methyl-p-Tyr charakteristische Molekül- und Fragmentationen gezeigt.

Tabelle 8: Substanzspezifisches Ionenmuster für o-Tyr und α -Methyl-p-Tyr bei der positiven Ionisierung

Charakteristische Molekül- und Fragmentationen	Massenzahl (m/z)	
	o-Tyr	α -Methyl-p-Tyr
$[M^H]^+$ Molekülion	182	196
$[M^{NH_2}]^+$ Fragmention	165	179
$[M^{COOH}]^+$ Fragmention	136	150

Einfluss des Puffers

Puffer als Eluenten besitzen einen erheblichen Einfluss auf die Ionisierbarkeit der Analyten und damit auf die Empfindlichkeit der massenspektrometrischen Messung (TEMESI und LAW, 1999). Zur Optimierung der Empfindlichkeit wurden Wasser und die Puffer NH_4 formiat, NH_4 acetat sowie TFA untersucht. Ein Einfluss des Acetonitrils als Modifier wurde ebenfalls untersucht. In Abbildung 8 ist der Einfluss der

Puffersubstanz auf die Empfindlichkeit der Detektion als Signal-Rausch-Verhältnis (S/N-Verhältnis) dargestellt. Die größte Empfindlichkeit wurde mit einem Eluenten aus NH₄formiat (pH 3) und Acetonitril als Modifier erreicht.

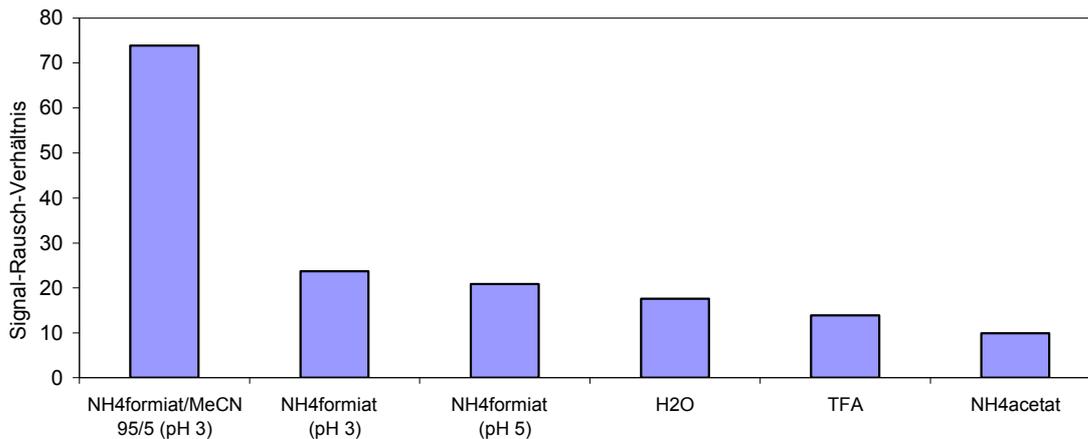


Abbildung 8: S/N-Verhältnis für o-Tyr in Abhängigkeit von der Puffersubstanz (AP-ESI-positiv-MSD, FIA-Analyse, Scan, 80 V Fragmentorspannung, weitere Detektorbedingungen 13.3.2)

Weitere Optimierungen

Es wurden mit Hilfe der FIA die Detektoreinstellungen wie Fragmentorspannung, Trocknungsgasfluss (Dry Gas Flow, 8-13 L/min), Versprühungsdruck (Nebulizer Pressure, 40-60 psig) und die Kapillarspannung (Capillary Voltage 3000-6000 V) hinsichtlich einer optimalen Ionisierung überprüft. Ergebnisse dieser Optimierung sind in Anhang 13.3.2 in Tabelle 9 und in Anhang 13.17 in Abbildung 69 dargestellt.

5.3 Entwicklung eines Clean-up

Ziel dieses Verfahrens war es, o-Tyr aus den proteinreichen Lebensmitteln selektiv zu isolieren. Als Modelllebensmittel dienten Nordseegarnelen. Zur Abtrennung von Störsubstanzen, wie Proteinen und restlichen Zellbestandteilen, standen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Hierzu zählten neben der Fällung mit Lösungsmitteln wie Acetonitril (RICHARDS und BEATTIE, 1995) oder Aceton (CARTEL, 1996, HEIN et al., 2000) auch die Deproteinierungsmethoden unter Einsatz von Perchlorsäure (EIJIRO et al., 1993, YAMASHITA et al., 1993), Trichloressigsäure (RALSTON und STREIN, 1997) oder Essigsäure (SIPPEL, 1998). Zur weiteren Abtrennung von Matrixbestandteilen sollte eine Reinigung des entproteinierten Extraktes über einen Kationenaustauscher (SPE) geprüft werden (ISHIMITSU et al., 1989). Für die o-Tyr-Analytik wurden außerdem Reinigungs- bzw. Isolierungsschritte an RP-Festphasen

durchgeführt (CHUAQUI-OFFERMANN und McDOUGAL, 1991a, MISCHKE et al., 1993).

5.3.1 Deproteinierung

Zur Deproteinierung der Nordseegarnelen wurde die Acetonfällung nach HEIN et al. (2000) herangezogen. Hierbei lag die Wiederfindung für o-Tyr bei 65%. Bei Überprüfung der Methode zeigte sich, dass durch die Acetonfällung die störenden Proteine nicht vollständig entfernt werden konnten. Außerdem erwies sich die Methode durch die erforderliche Lyophilisierung und anschließende Verdampfung des Acetons als umständlich und zeitintensiv. Aus diesem Grunde wurde die Deproteinierung mit Perchlorsäure, Trichloressigsäure und Essigsäure getestet. Hierzu wurde Garnelenfleisch mit o-Tyr-Standardlösung und Säure versetzt. Nach Homogenisierung des Untersuchungsmaterials wurde dieses zentrifugiert, membranfiltriert und in die HPLC injiziert (HPLC-Bedingungen siehe 13.3.1). Die Wiederfindungen für o-Tyr und die Variationskoeffizienten CV der jeweiligen Methoden sind in Tabelle 25 zusammengefasst. Die Verwendung von Perchlorsäure als Fällungsmittel erwies sich schließlich aufgrund der sehr guten WFR bei dieser Problemstellung für die weiteren Untersuchungen als optimal.

5.3.2 Homogenisierung

Zur Isolierung der nicht proteingebundenen Aminosäuren müssen die Zellstrukturen des Gewebes zerstört und die Aminosäuren daraus extrahiert werden. Die Zellzerstörung wird auf mechanische Weise durchgeführt. HEIN et al. (2000) führte die Homogenisierung des Garnelenfleisches mit einem Küchenmixer durch. Für diese Art Homogenisierung wurde aber größere Menge des Untersuchungsmaterials benötigt. Dies konnte sich jedoch bei weiteren Untersuchungen der Handelsproben als problematisch erweisen. Aus diesem Grunde wurde eine schnelle und einfache Methode zur Homogenisierung von kleineren Mengen der Probe mit der Hilfe eines Ultraturrax entwickelt. Hierbei wurde Krabbenfleisch (ca. 2 g) direkt in ein Zentrifugengefäß gegeben, mit α -Methyl-p-Tyr- und o-Tyr-Standardlösung, Perchlorsäure sowie Wasser versetzt und mit einem Ultraturrax homogenisiert, zentrifugiert, membranfiltriert und in die HPLC injiziert (HPLC-Bedingungen siehe 13.3.1).

Eine weitere von zahlreichen Autoren (MEIER et al., 1989, MISCHKE et al., 1993, ZOLLER et al., 1993) beschriebene Methode der Homogenisierung beruht auf dem Verreiben des Fleisches nach Tieffrieren im flüssigen Stickstoff. Die Eignung dieser Methode für die Isolierung der Tyr-Isomere wurde auch geprüft und mit der Ultraturrax-Methode verglichen. Das pulverisierte Garnelenfleisch wurde mit α -Methyl-p-Tyr- und o-Tyr-Standardlösung, Perchlorsäure sowie Wasser versetzt und anschließend zentrifugiert. Der entproteinierte Extrakt wurde membranfiltriert und in die HPLC injiziert (HPLC-Bedingungen siehe 13.3.1).

Die Wiederfindungen für o-Tyr sowie α -Methyl-p-Tyr und die Variationskoeffizienten CV der beiden Methoden sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Die Homogenisierung mit Ultraturrax war der Aufarbeitung mit Stickstoff überlegen. Auch der Umgang mit flüssigem Stickstoff, der nicht in jedem Labor vorhanden ist, erwies sich als wenig praktikabel und umständlich. Für die weiteren Untersuchungen wurde die Ultraturrax-Methode angewendet.

5.3.3 Isolierung des o-Tyr mittels Festphasenextraktion

Aufgrund der Koelution von o-Tyr mit unbekanntem Störsubstanzen, die selbst nach Optimierung des Trennsystems und der Probenaufarbeitung nicht verhindert werden konnte, war die selektive Bestimmung des im Spurenbereich vorhandenen o-Tyr nicht gewährleistet. Im Folgenden wurde daher versucht, durch einen vorausgehenden Reinigungsschritt eine selektive Isolierung des o-Tyr aus der Probenmatrix zu erreichen.

Bei dem untersuchten o-Tyr handelt es sich um eine amphotere Substanz, die je nach pH-Wert als Kation oder Anion vorliegt. Folglich sollte die selektive Isolierung des o-Tyr aus der Probenmatrix durch Einsatz eines Kationenaustauschers oder eines stark basischen Anionenaustauschers möglich sein. Durch die Vorreinigung an einer C18 SPE können anorganische Salze sowie organische Säuren entfernt werden, die sonst bei den Ionenaustauschern zur Erschöpfung ihrer Kapazität (zu einem Durchbruch) führten.

C18-Festphasenextraktion

Die Tyr-Isomere lassen sich sehr gut an einer RP-18 HPLC-Säule trennen. Zur Vermeidung von Störpeaks durch die Matrix sollte folglich eine Reinigung des entproteinierten Extraktes und eine selektive Isolierung der Tyr-Isomere aus der Probenmatrix mit Hilfe von RP-Festphasen versucht werden.

Zur Extraktion der Tyr-Isomere wurden die C18- und die C18 OH-Säule der Firma Varian und eine weitere C18 ec-Säule von Firma Isolute getestet. Zunächst wurden mit einer Standardmischung die idealen Bedingungen für Tyr-Isomere auf den C18-Säulen ermittelt. Nach der Konditionierung der C18-Säulen wurden in Wasser (pH 3,5 - Simulation des Probenextraktes) gelöste Analyten aufgetragen. Anschließend wurde mit Wasser gewaschen und mit einer Mischung von Wasser und MeOH im Verhältnis 85/15 v/v (pH 3,5) eluiert. Die Probenaufgabelösungen, Waschlösungen und Eluate wurden mittels HPLC/FI vermessen, und die Wiederfindungsraten wurden durch Einpunktkalibrierung mit einer externen Standardlösung bestimmt. Bei der Isolierung der Tyr-Isomere auf der C18 ec-Säule kam es schon bei der Probenaufgabe und beim Waschen zu einem vollständigen Durchbruch. Auf der C18 OH-Säule traten für beide Analyten Verluste beim Waschen auf. Die WFR für o-Tyr lag unter den angewandten Bedingungen bei 80% und für α -Methyl-p-Tyr bei 75%. Die besten Ergebnisse wurden mit der C18 Säule ermittelt. Weder bei der Probenaufgabe noch beim Waschschrift war ein Durchbruch erkennbar. Die WFR für o-Tyr betrug 100% und für α -Methyl-p-Tyr 94% (Durchführung und Ergebnisse siehe Anhang 13.7.3, Tabelle 26).

Zur Übertragung dieser Methode auf eine Lebensmittelmatrix wurde ein aufgearbeiteter Extrakt aus Garnelen mit einer o-Tyr- und α -Methyl-p-Tyr-Standardlösung dotiert und anschließend über die C18 Säule gegeben (Durchführung und Ergebnisse siehe Anhang 13.7.3). Es wurde eine zufriedenstellende Isolierung des o-Tyr erreicht. Die WFR für o-Tyr lag unter den angewandten Bedingungen bei der Bond Elut C18 Säule bei 97% für o-Tyr und bei 91% für α -Methyl-p-Tyr (Tabelle 27). Die C18 SPE ist daher zur Isolierung von Tyr-Isomeren aus Nordseegarnelen geeignet. Die Verwendung der C18-Phase zur Reinigung der Probenmatrix erwies sich weiterhin als sinnvoll, da dadurch der Rest

der lipophilen Substanzen, sowie Kohlenhydrate und Mineralstoffe effektiv abgetrennt werden konnten.

Polymer-Festphasenextraktion

Wegen des sehr guten Adsorptionsvermögens gegenüber polaren und aromatischen Substanzen wurde die Eignung der SPE-Polymerphase auf der Basis von Ethylvinylbenzol-Divinylbenzol-Copolymeren (besitzt eine sehr große spezifische Oberfläche und die 10-fache Kapazität herkömmlicher C18 Festphasen) für eine Abtrennung von Störkomponenten aus dem Garnelenfleisch und selektive Isolierung der Tyr-Isomere getestet.

Zuerst wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Elution untersucht. Hierzu wurde eine Standardlösung bestehend aus α -Methyl-p-Tyr und o-Tyr mit Perchlorsäure auf einen pH von 3,5 eingestellt (Simulation des Probenextraktes) und auf die konditionierte Festphase gegeben. Nach einem Waschschrift mit Wasser wurden die Tyr-Isomere mit einer Mischung von Wasser/Methanol im Verhältnis 85/15 v/v bei unterschiedlichem pH von 2, 3,5 und 7,5 eluiert. Die Eluate wurden mittels HPLC/Fluorimetrie vermessen, und die Wiederfindungsraten wurden durch Einpunktkalibrierung mit einer externen Standardlösung bestimmt. o-Tyr wurde bei der Probenaufgabe und beim Waschen auf der Säule vollständig retardiert und ließ sich am besten bei pH 3,5 mit einer WFR von 78% eluieren (Ergebnisse siehe Anhang 13.7.3, Tabelle 26 und 28). Ein anderer Verlauf des Einflusses des pH-Wertes auf die Elution wurde beim α -Methyl-p-Tyr (IS) festgestellt (Abbildung 9). Bei pH 3,5 ließ sich α -Methyl-p-Tyr von der Lichrout EN-Säule mit einer WFR von 71% eluieren.

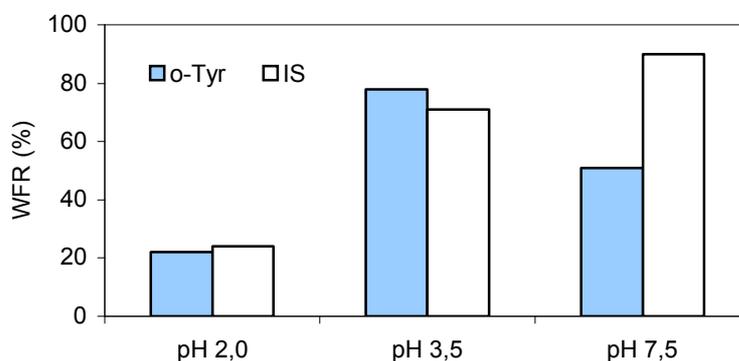


Abbildung 9: Einfluss des pH-Wertes auf die Elution des o-Tyr und IS, Lichrout EN

Da durch pH-Modifizierung nur eine Wiederfindung bei der o-Tyr-Standardlösung von 78% erreicht werden konnte, wurde der Einfluss des Methanolanteiles im Elutionspuffer auf die Elution von o-Tyr aus der Polymersäule getestet. Es war zu vermuten, dass durch den erhöhten Methanolanteil die polaren Wechselwirkungen des o-Tyr mit dem Sorbens unterbunden werden und o-Tyr sich vollständig eluieren lässt. Es zeigte sich aber, dass eine Erhöhung des Methanolanteiles bis zu 30% in der Elutionslösung keinen Einfluss auf die Elution der Tyr-Isomere aus der Polymerphase besitzt.

Die Polymerphase wurde daraufhin mit einer dotierten Matrix getestet. Nach einem Waschschrift wurden die Tyr-Isomere mit einer Mischung von Wasser und MeOH im Verhältnis 85/15 v/v (pH 3,5) eluiert. Es ergab sich nur eine geringe WFR für o-Tyr von 48% und für α -Methyl-p-Tyr von 50% (Tabelle 27). Bei der Probenaufgabe und beim Waschen ist es zu einem Durchbruch der beiden Analyten gekommen. Eine zufriedenstellende Isolierung der Tyr-Isomere aus den Nordseegarnelen mittels der Polymerphase wurde daher nicht erreicht.

Kationenaustauscher

o-Tyr weist im sauren Milieu eine positive Ladung auf (beide funktionellen Gruppen liegen protoniert vor). Aufgrund der positiven Ladung bietet sich zur Isolierung des o-Tyr ein Kationenaustauscher an. Mit einer o-Tyr und α -Methyl-p-Tyr-Standardlösung wurde das Clean-up-Verfahren mittels der Kationenaustauscher verschiedener Hersteller und unterschiedlicher Spezifikation auf die Eignung für die Tyr-Isomere untersucht und optimiert.

Die Versuche wurden an Kationenaustauschern mit einer Propylsulfonsäure-Gruppe (PRS) und einer Benzolsulfonsäure-Gruppe (SCX) durchgeführt. Die PRS-Kationenaustauscher liegen in einer Na^+ -Form vor, während die SCX-Kationenaustauscher in einer H^+ -Form geliefert werden. Nach der Konditionierung des Kationenaustauschers und Überführung in die H^+ -Form wurden in Wasser (pH 3,5 - Simulation des Probenextraktes) gelöste Analyten aufgetragen. Anschließend wurde mit einer Mischung von Wasser und MeOH im Verhältnis 85/15 v/v gewaschen und mit NH_4 formiat-Puffer (pH 3) eluiert. Untersucht wurden nicht nur die Eluate, sondern auch die Probenaufgabelösungen sowie die Waschlösungen.

Die Wiederfindungsraten wurden durch Einpunktkalibrierung mit einer externen Standardlösung bestimmt. Eine zufriedenstellende Isolierung des o-Tyr gelang nicht, da es schon beim Waschen bei allen getesteten Kationenaustauschern zu einem Durchbruch kam. Die WFR für o-Tyr lagen unter den angewandten Bedingungen bei ca. 60 bis 67%. Bei Isolierung des α -Methyl-p-Tyr trat auf allen Kationenaustauschern bereits bei der Probenaufgabe und beim Waschen ein Durchbruch. Die WFR für α -Methyl-p-Tyr lag bei 22 bis 30% (Tabelle 29) (Durchführung und Ergebnisse siehe Anhang 13.7.4).

Zur Übertragung dieser Methode auf eine Lebensmittelmatrix wurde ein Extrakt aus Garnelen mit einer o-Tyr- und α -Methyl-p-Tyr-Standardlösung dotiert, auf einer C18 Festphase gereinigt und anschließend über das Kationenaustauscher gegeben (Durchführung siehe Anhang 13.7.3 und 13.7.4). Die Eluate wurden mittels HPLC/FI vermessen, und die Wiederfindungsraten wurden durch Einpunktkalibrierung mit einer externen Standardlösung bestimmt. Die WFR für o-Tyr betrug 60% und für α -Methyl-p-Tyr 20% (Tabelle 30). Diese Methode war daher zur Isolierung der Tyr-Isomere aus Garnelen nicht geeignet.

Anionentauscher

Des Weiteren wurde ein Clean-up-Verfahren auf einem stark basischen Anionenaustauscher getestet. o-Tyr weist in einem saueren Milieu eine positive Ladung auf und sollte deswegen vom Anionenaustauscher (positiv geladen) nicht retardiert werden.

Die Versuche wurden an einem Anionenaustauscher mit einer Trimethylaminopropyl-Gruppe (SAX) durchgeführt. Der SAX-Anionenaustauscher liegt in einer Cl⁻-Form vor. Der Einfluss des pH-Wertes der Aufgabelösung auf die Retention der o-Tyr-Ionen wurde untersucht. Dafür wurde eine Standardlösung bestehend aus o-Tyr und α -Methyl-p-Tyr auf einen pH von 2,0, 4,5 und 11,0 eingestellt, auf den konditionierten Anionenaustauscher gegeben und langsam durch die Säule filtriert (Durchführung siehe Anhang 13.7.5). Filtrierte Lösungen wurden mittels HPLC/FI vermessen, und die Wiederfindungsraten wurden durch Einpunktkalibrierung mit einer externen Standardlösung bestimmt. Aufgrund der mehrfachen (ionischen, polaren) Wechselwirkungen wurden ca. 45% des o-Tyr als auch des α -Methyl-p-Tyr trotz ihrer

positiven Ladung im saueren Milieu (pH 2) auf dem starken Anionenaustauscher retardiert (siehe Tabelle 31 und 32). Auch diese Methode ist daher nicht zur Isolierung des o-Tyr aus Garnelen geeignet.

5.4 Validierung

Die entwickelte HPLC/FLD Methode wurde für o-Tyr, α -Methyl-p-Tyr, Phe und p-Tyr validiert. Die Validierung für o-Tyr wurde ebenfalls mit HPLC/MSD Methode durchgeführt. Zur Validierung mit der HPLC/FLD Methode (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 13.3.1) wurden für die Grundkalibrierung Standardlösungen von o-Tyr und dem internen Standard mit sechs Konzentrationsstufen und Standardlösungen von Phe und p-Tyr mit vier Konzentrationsstufen je dreimal vermessen. Die Auswertung erfolgte anhand einer linearen Regression (siehe Anhang 13.4, Abbildung 41-44). Die Verfahrenskennndaten sind in den Tabellen 10 und 11 zusammengefasst. Der Verfahrensvariationskoeffizient betrug für o-Tyr 2,5%, für α -Methyl-p-Tyr 2,2%, für Phe 1,6% und für p-Tyr 2,4%. Die Nachweisgrenze - berechnet über das Signal-Rausch-Verhältnis (3:1) - betrug für o-Tyr 12,4 $\mu\text{g/L}$.

Für die Matrixkalibrierung wurden Nordseegarnelen mit o-Tyr- und α -Methyl-p-Tyr-Standardlösungen und Tiefseegarnelen mit Phe-Standardlösung dotiert und jeweils drei Proben mit fünf und vier Konzentrationsstufen mittels der entwickelten Methode aufgearbeitet (siehe Anhang 13.8 und 13.9). Die ermittelten Verfahrenskennndaten sind in Anhang 13.4 dargestellt (siehe Tabelle 12 und 13, Abbildung 45-49). Die Wiederfindung für o-Tyr betrug 97% mit einem Verfahrensvariationskoeffizienten von 9%. Für den α -Methyl-p-Tyr ergab sich eine WFR von 93% mit einem Verfahrensvariationskoeffizienten von 7%. Die Nachweisgrenze - berechnet über das Signal-Rausch-Verhältnis (3:1) - betrug für o-Tyr 31 $\mu\text{g/kg}$. Die Wiederfindung für Phe betrug 97% mit einem Verfahrensvariationskoeffizienten von 17%. Eine Matrixkalibrierung für p-Tyr wurde nicht durchgeführt.

Für das entwickelte Referenzsystem – HPLC/MSD (HPLC-Bedingungen siehe 13.3.2) wurde eine Grundkalibrierung durchgeführt. Hierzu wurde o-Tyr-Standardlösung mit sechs Konzentrationsstufen je dreimal vermessen (SIM, m/z 136, 165 und 182, weitere Detektoreinstellungen siehe Anhang 13.3.2, Tabelle 9). Die Auswertung erfolgte anhand einer linearen Regression (siehe Anhang 13.4,

Tabelle 14, Abbildung 50). Die Nachweisgrenze – berechnet über das Signal-Rausch-Verhältnis (3:1) - lag bei 21 µg/L.

5.5 Diskussion

Es wurde ein Verfahren zur Bestimmung des nicht proteingebundenen o-Tyr entwickelt, optimiert und validiert. Dieses entwickelte Verfahren ist schneller und einfacher als die Methode von HEIN et al. (2000) zur Bestimmung von nicht proteingebundenem o-Tyr. Im Vergleich zur Methode von KRACH et al. (1997) beinhaltet dieses Verfahren einen zusätzlichen Reinigungsschritt mittels Festphasenextraktion. Zu den wichtigsten zu lösenden Aufgaben bei der Methodenentwicklung gehörte eine Erhöhung der Empfindlichkeit der Detektion gegenüber o-Tyr. Bei der Optimierung der Empfindlichkeit wurde von der Tatsache ausgegangen, dass die fluoreszierenden Eigenschaften des o-Tyr vom pH-Wert abhängig sind. Die Untersuchungen des Einflusses des pH-Wertes des Puffers auf die Fluoreszenzintensität des o-Tyr und dadurch auch auf die Empfindlichkeit der Detektion ergaben, dass die Fluoreszenzintensität des o-Tyr im pH-Bereich von 4-5 ihr Maximum erreicht hat. Bei einem pH-Wert von 1,8, was dem pH-Wert des von HEIN et al. (2000) verwendeten Eluenten 0,1% TFA entspricht, waren dagegen nur noch 33% der maximalen Fluoreszenzintensität messbar. Eine optimale Empfindlichkeit wurde bei der Verwendung eines NH₄formiat-Eluenten bei einem pH-Wert von 4 erreicht. Die Verwendung des α-Methyl-p-Tyr als IS erwies sich als nur bei den Nordseegarnelen als geeignet. Bei Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen sowie bei Hühnerbrustfleisch trat eine Koelution des IS mit den störenden Peaks auf. Durch das entwickelte Verfahren konnte eine sehr gute WFR für o-Tyr von 97% im Vergleich zur WFR von 65%, die für o-Tyr in Nordseegarnelen von HEIN et al. (2000) ermittelt wurde. In anderen Publikationen zuvor wurde eine vollständige Validierung des Verfahrens nie beschrieben. Die Verwendung von Perchlorsäure als Extraktions- und Fällungsmittel erwies sich ebenfalls wie Trichloressigsäure (KRACH et al., 1997) im Vergleich zu der umständlichen und zeitintensiven Deproteinierungsmethode mit der Anwendung der Acetonfällung (HEIN et al., 2000) als optimal. Eine selektive Isolierung des im Spurenbereich vorhandenen o-Tyr aus der Probenmatrix wurde unter dem Einsatz einer C18 SPE erreicht. Eine Koelution von o-Tyr mit unbekanntem Störsubstanzen konnte damit verhindert werden.

6 Methodenentwicklung zur Bestimmung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure

6.1 Optimierung der chromatographischen Bedingungen

Zur Entwicklung einer HPLC-Methode wurde von der Methode von KLEEBERG (2002) zur Bestimmung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure (3,4-HPPA) ausgegangen. Ein isokratischer Lauf erfolgte auf einer Multospher 100 RP 5C18 250 × 4 mm Säule bei 30 °C Säulentemperatur mit der mobilen Phase aus Essigsäure/MeCN im Verhältnis 87/13 v/v (pH 3,5).

Der Eluent aus Essigsäure (pH 3,5) zeigte sich als instabil, da schon beim Entgasen des Eluenten die flüchtige Essigsäure entweicht und der pH-Wert steigt. Da die Fluoreszenzeigenschaften der 3,4-HPPA vom pH-Wert abhängig sind, war ein stabiler Puffer erforderlich. Dabei erwies sich der NH₄formiat-Puffer 0,005 mol/L (pH 3,5) als optimal. Als Beispiel ist in Abbildung 70 ein Chromatogramm von HPPA-Isomeren dargestellt.

Interner Standard

Die Auswahl des internen Standards richtete sich nach folgenden Kriterien. Ein IS sollte gegenüber den Analyten bezüglich seiner chemischen Struktur und des Verhaltens bei einer Behandlung ähnlich sein und bei chromatographischen Trennsystemen weder mit dem Analyten noch Matrixbestandteilen koeluiieren. Außerdem sollte dieser ein HPPA-Grundgerüst besitzen und fluoreszieren. Die Retentionszeit sollte im günstigsten Fall in einem Bereich von 19 bis 30 min liegen.

3-(4-Methoxyphenyl)-propionsäure

3-(4-Methoxyphenyl)-propionsäure (Abbildung 10) weist eine lange Retentionszeit von 45 min auf und liegt damit weit hinter der Retentionszeit von 3,4-HPPA. Sowohl die spätere Retentionszeit als auch wesentlich schlechtere Fluoreszenzresponse sprechen gegen diese Substanz als IS.

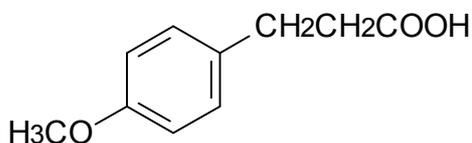


Abbildung 10: Strukturformel von 3-(4-Methoxyphenyl)-propionsäure

3-(2-Hydroxyphenyl)-propionsäure

Da bei 3,4-HPPA die Hydroxygruppe in der para-Position vorliegt, kann man davon ausgehen, dass eine Substanz mit der Hydroxygruppe in der ortho-Position ähnliche Eigenschaften aufweist und wahrscheinlich ähnlich wie bei Tyr-Isomeren erst nach der 3,4-HPPA eluiert. 3-(2-Hydroxyphenyl)-propionsäure (Abbildung 11) lag mit einer Retentionszeit von 30 min hinter den Retentionszeiten des Großteils der Matrix und der 3,4-HPPA, koeluierte aber mit einem Teil der Matrix, der erst nach 30 min eluierte.

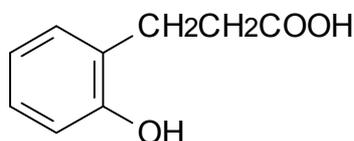


Abbildung 11: Strukturformel von 3-(2-Hydroxyphenyl)-propionsäure

3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure

Die 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure (Abbildung 12) mit einer Hydroxygruppe in meta-Position eluierte zwischen 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure und 3-(2-Hydroxyphenyl)-propionsäure. Sowohl die Retentionszeit von 23 min als auch die Fluoreszenzresponse sprachen für diese Substanz als IS. Außerdem ist sie nicht in der Matrix vorhanden. 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure ist als interner Standard sehr gut geeignet und wird für die Optimierung und Validierung des Verfahrens verwendet.

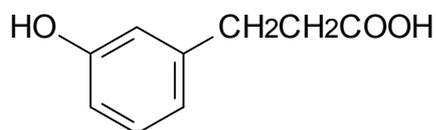


Abbildung 12: Strukturformel von 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure

6.2 Optimierung der Detektion

3,4-HPPA ist eine aromatische Substanz (π -Elektronensystem des Grundgerüsts), die fluoreszierende Eigenschaften besitzt. Eine einfache und selektive Detektion unter Einsatz eines FI-Detektors ist daher möglich.

Die Detektion von 3,4-HPPA erfolgte mittels Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 276 nm und einer Emissionswellenlänge von 310 nm (KLEEBERG, 2002). Bei der Überprüfung dieser Methode zeigte sich, dass die Detektion von 3,4-HPPA in den unbestrahlten Proben im Bereich der Nachweisgrenze liegt. Da die fluoreszierenden Eigenschaften der HPPA-Isomere vom pH-Wert abhängig sind, sollte der Einfluss des pH-Wertes des Puffers auf die Fluoreszenzintensität des Analyten und dadurch auch auf die Empfindlichkeit der Detektion untersucht werden. Darüber hinaus sollten die Anregungs- und Emissionswellenlängen überprüft werden.

Überprüfung der Anregungs- und Emissionswellenlängen von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure

Zur Überprüfung der von KLEEBERG, 2002 verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen von $\lambda_{\text{Ex}} = 276$ nm und $\lambda_{\text{Em}} = 310$ nm wurden für 3,4-HPPA die Anregungs- und Emissionsspektren aufgenommen (Anhang 13.5, Abbildung 61 und 62). Für den Analyten ergab sich ein Anregungs- und Emissionsmaximum von $\lambda_{\text{Ex}} = 277$ nm und $\lambda_{\text{Em}} = 309$ nm. Diese Wellenlängen stimmen mit den von KLEEBERG, 2002 verwendeten Wellenlängen gut überein und stellen keinen signifikanten Unterschied dar. Deswegen wurde die in der Literatur beschriebene Wellenlängenkombination einer Anregung von $\lambda_{\text{Ex}} = 276$ nm und einer Emission bei $\lambda_{\text{Em}} = 310$ nm beibehalten.

Optimierung der Fluoreszenzintensität

Zur Optimierung der Fluoreszenzintensität wurden die 3,4-HPPA-Lösungen im NH_4 formiat-Puffer mit pH-Werten zwischen 3,0 und 6,0 fluorimetrisch vermessen ($\lambda_{\text{Ex}} = 276$ nm, $\lambda_{\text{Em}} = 310$ nm). Dabei wurde festgestellt, dass die Fluoreszenzintensität im pH-Bereich von 3 bis 6 zunimmt (Abbildung 13). Bei einem pH-Wert von 3,5, was dem pH-Wert des verwendeten Eluenten 0,005 mol/L NH_4 formiat-Puffer entspricht, sind gegenüber pH-Wert 6 nur 25% der Fluoreszenzintensität messbar.

Die Empfindlichkeit der Bestimmung könnte durch die Verwendung von 0,005 mol/L NH_4 formiat-Puffer (pH 6,0) deutlich verbessert werden. Bei pH 6 kommt es aber zu einer deutlichen Verkürzung der Retentionszeiten und dadurch zu einer Koelution mit der Matrix. Als optimal erwies sich deswegen die Verwendung eines 0,005 mol/L NH_4 formiat-Eluenten bei einem pH-Wert von 3,5.

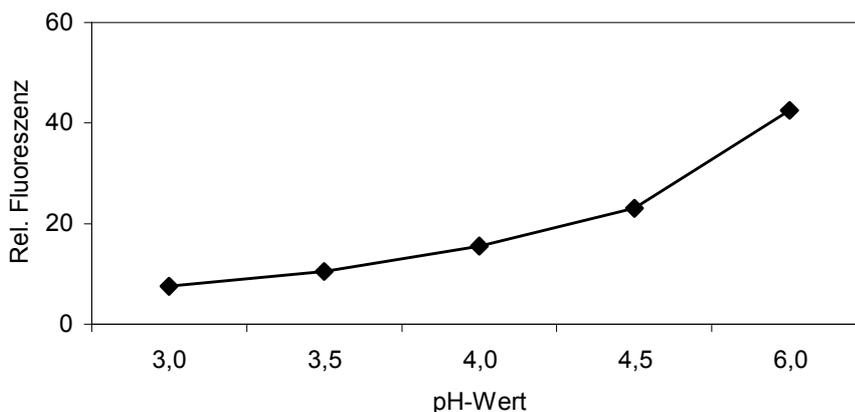


Abbildung 13: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der 3,4-HPPA vom pH-Wert

6.3 Entwicklung eines Clean-up

Ziel dieses Verfahren war es, 3,4-HPPA aus den proteinreichen Lebensmitteln selektiv zu isolieren. Als Modelllebensmittel dienten Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerbrust. Zur Abtrennung von Störsubstanzen, wie Proteinen und restlichen Zellbestandteilen, standen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Hierzu zählten neben der Fällung mit Lösungsmittel wie Aceton (CARTEL, 1996, HEIN et al., 2000) auch die Deproteinierungsmethoden unter Einsatz von Perchlorsäure (EIJIRO et al., 1993, YAMASHITA et al., 1993), Essigsäure (SIPPEL, 1998) oder Salzfällungen mit ZnSO_4 und NaOH (BLANCHARD, 1981) oder $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ (BOLLAG und EDELSTEIN, 1991).

Um 3,4-HPPA bestimmen zu können, war neben einer selektiven Isolierung eine Anreicherung aus der Probenmatrix erforderlich. KLEEBERG (2002) isolierte 3,4-HPPA mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether. Mit dieser Methode wurde nur eine Wiederfindung von 59% für 3,4-HPPA erreicht. BARTOLOME et al. (1997) isolierten 3,4-HPPA mit Ethylacetat, BAKER et al. (1987) führten eine Extraktion mit Dichlormethan durch. Daher sollte versucht werden, in Anlehnung auf

diese Methoden die Flüssig-Flüssig-Extraktion für die 3,4-HPPA zu verbessern und zu optimieren.

Zur weiteren Abtrennung von Matrixbestandteilen und Anreicherung sollte eine Reinigung des entproteinierten Extraktes über eine RP C18 Festphase und anschließend ein Anionenaustauscher geprüft werden (GROSSI, 1989).

6.3.1 Deproteinierung

Für die Deproteinierung unter Einsatz von Aceton, Perchlorsäure, Essigsäure oder ZnSO_4 und NaOH und $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ wurde Fleisch mit 3,4-HPPA-Standardlösung und Fällungsreagenz versetzt, mit einem Ultraturrax homogenisiert, zentrifugiert, membranfiltriert und in die HPLC injiziert (HPLC-Bedingungen siehe 13.3.3). Es wurde ebenfalls eine Fällung mit Perchlorsäure unter Zugabe von MeOH (5%) und N,N-Dimethylformamid (5%) getestet, um eine bessere Extraktion von 3,4-HPPA zu erreichen.

Die Wiederfindungen für 3,4-HPPA der jeweiligen Methoden sind in Anhang 13.13 in Tabelle 46 zusammengefasst. Die Verwendung von Perchlorsäure mit MeOH-Zusatz als Fällungsmittel erwies sich schließlich aufgrund der sehr guten WFR von 95% bei dieser Problemstellung für die weiteren Untersuchungen als optimal. Mit Aceton konnte auch eine sehr gute WFR von 99% für 3,4-HPPA erreicht werden, jedoch die störenden Fette nicht entfernt werden.

6.3.2 Isolierung und Anreicherung der 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion

Im Folgenden wurde versucht, durch Flüssig-Flüssig-Extraktion die 3,4-HPPA aus der Probenmatrix selektiv zu isolieren und anzureichen. Es wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether, Dichlormethan und Ethylacetat durchgeführt (siehe Anhang 13.13.2). Die Wiederfindungen für 3,4-HPPA bei den jeweiligen Methoden sind in Tabelle 47 zusammengefasst. Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether konnte eine WFR für 3,4-HPPA von 59% erreicht werden, bei Dichlormethan war es 64% und bei Ethylacetat 56%. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion zeigte sich als umständlich und zeitintensiv, sowie mit niedrigen WFR. Daher wurde versucht, die 3,4-HPPA mittels SPE zu isolieren und anzureichern.

6.3.3 Isolierung und Anreicherung der 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure mittels Festphasenextraktion

Da es sich bei der untersuchten 3,4-HPPA um eine Säure handelt, sollte folglich die selektive Isolierung der 3,4-HPPA aus der Probenmatrix durch Einsatz eines Anionenaustauschers möglich sein. Durch die Vorreinigung an einer C18 SPE können anorganische Salze sowie organische Säuren entfernt werden, die sonst bei Ionenaustauschern zur Erschöpfung ihrer Kapazität (zu einem Durchbruch) führen.

C18-Festphasenextraktion

Die 3,4-HPPA lässt sich sehr gut an einer RP-18 HPLC-Säule trennen. Zur Vermeidung von Störpeaks durch die Matrix sollte folglich eine Reinigung des entproteinierten Extraktes und eine selektive Isolierung und Anreicherung der 3,4-HPPA aus der Probenmatrix mit Hilfe von RP-Festphasen versucht werden. Hierzu wurde C18 Säule zunächst mit einer Standardlösung bestehend aus 3,4-HPPA und 3,3-HPPA getestet.

Nach der Konditionierung der C18 Säule wurden in Wasser (pH 3,5 - Simulation des Probenextraktes) gelöste Analyten aufgetragen. Anschließend wurde mit Wasser gewaschen und mit wässriger Ammoniaklösung 0,05 mol/L eluiert. Die Eluate wurden mittels HPLC/FI vermessen, und die Wiederfindungsraten wurden durch Einpunktkalibrierung mit einer externen Standardlösung bestimmt. Die WFR für 3,4-HPPA betrug 95% und für 3,3-HPPA 90% (Durchführung und Ergebnisse siehe Anhang 13.13.3, Tabelle 48).

Anionenaustauscher

Nach der Konditionierung des stark basischen Anionenaustauschers (SAX) mit Essigsäure wurden die in wässriger Ammoniaklösung vorliegenden Analyten aufgetragen. Anschließend wurde mit Wasser gewaschen und mit Essigsäure/MeOH eluiert. Die Eluate wurden mittels HPLC/FI vermessen, und die Wiederfindungsraten wurden durch Einpunktkalibrierung mit einer externen Standardlösung bestimmt. Die WFR für 3,4-HPPA betrug 98% und für 3,3-HPPA 100% (Durchführung und Ergebnisse siehe Anhang 13.13.4, Tabelle 49).

Kopplung von C18- und SAX-SPE

Nachdem die einzelnen Parameter der Probenaufgabe, der Waschschrift und die Elution für die beiden Festphasenextraktionen optimiert waren, sollte nun eine Kombination beider Clean-up-Schritte erfolgen. Mit diesem Verfahren sollte die 3,4-HPPA aus den Lebensmitteln isoliert und angereicht werden. Zur Übertragung der Methode auf eine Lebensmittelmatrix wurde ein Extrakt aus Garnelen mit einer 3,4-HPPA und 3,3-HPPA-Standardlösung dotiert und anschließend über das gekoppelte Säulensystem von C18- und SAX-SPE gegeben (Durchführung siehe Anhang 13.13.3, 13.13.4 und 13.15). Mit dem entwickelten Verfahren gelang eine zufriedenstellende Isolierung und Anreicherung der beiden Analyten. Bei der Überprüfung der C18 Festphasen konnte eine hohe Kapazität ermittelt werden. Bis zu 25 mL des deproteinierten Probenextraktes konnten auf die SPE C18 Phase gegeben werden, ohne dass Verluste des Analyten auftraten. Der Eluat aus der C18 Phase wurde direkt auf den Anionenaustauscher gegeben. Die Analyten wurden mit einer sauren methanolischen Lösung eluiert. Anschließend wurde Methanol im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Dabei konnte eine Anreicherung um Faktor 50 erreicht werden, der für die Bestimmung von 3,4-HPPA erforderlich war. Die WFR lagen für 3,4-HPPA unter den angewandten Bedingungen bei 77% und für 3,3-HPPA bei 72% (Tabelle 50). Diese Methode ist daher zur Isolierung der 3,4-HPPA aus Garnelen und Hühnerbrust gut geeignet.

6.4 Validierung

Das entwickelte Verfahren wurde für 3,4-HPPA und 3,3-HPPA validiert. Für die Grundkalibrierung wurden Standardlösungen von 3,4-HPPA und des internen Standards mit fünf Konzentrationsstufen je dreimal vermessen. Die Auswertung erfolgte anhand einer linearen Regression (siehe Anhang 13.4, Abbildung 51 und 52, Tabelle 15). Der Verfahrensvariationskoeffizient für 3,4-HPPA betrug 1,4%. Für die 3,3-HPPA berechnete sich der Verfahrensvariationskoeffizient zu 1,8%. Die Nachweisgrenze - berechnet über das Signal-Rausch-Verhältnis (3:1) - betrug für 3,4-HPPA 6,2 µg/L.

Für die Matrixkalibrierung wurden Nordseegarnelen mit 3,4-HPPA und 3,3-HPPA Standardlösungen dotiert, jeweils fünf Proben mit drei Konzentrationsstufen und mittels der entwickelten Methode aufgearbeitet (siehe Anhang 13.14). Die ermittelten

Verfahrenskenndaten sind in Anhang 13.4 in Tabelle 16 und 17 und den Abbildungen 53-56 dargestellt. Die Auswertung erfolgte anhand des IS. Die WFR von 3,4-HPPA lag bei 77% und konnte mit Hilfe des IS auf 107% korrigiert werden. Unter dem Einsatz von IS verbesserte sich auch der Verfahrensvariationskoeffizient der 3,4-HPPA von 16% bis auf 11%. Die WFR des IS lag bei 72% mit einem Verfahrensvariationskoeffizienten von 17%. Die Nachweisgrenze - berechnet über das Signal-Rausch-Verhältnis (3:1) - betrug für 3,4-HPPA 0,3 µg/kg.

6.5 Diskussion

In Anlehnung an eine Methode von GROSSI (1989) wurde zur Anreicherung der 3,4-HPPA eine SPE Methode entwickelt. Bei der Überprüfung der C18 Festphasen konnte eine hohe Kapazität ermittelt werden. Bis zu 25 mL des deproteinierten Probenextraktes konnten auf die SPE C18 Phase gegeben werden, ohne dass Verluste des Analyten auftraten. Dabei konnte eine Anreicherung um Faktor 50 erreicht werden, der für die Bestimmung von 3,4-HPPA erforderlich ist. KLEEBERG (2002) gelang diese Anreicherung um Faktor 50 mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion. Durch die Kopplung von SPE C18 mit Anionenaustauscher konnte eine schnelle und einfache Anreicherungs-methode für 3,4-HPPA entwickelt, optimiert und validiert werden. Die sehr aufwendigen Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethoden (KLEEBERG, 2002, BARTOLOME et al., 1997, BAKER et al., 1987) konnten somit ersetzt werden. Zur Quantifizierung von 3,4-HPPA wurde 3,3-HPPA als interner Standard angewendet. Durch die Methode zur Bestimmung von 3,4-HPPA wurde eine WFR von 77% erreicht. Mit Anwendung von IS verbesserte sich die WFR auf 107±11%. KLEEBERG (2002) konnte für 3,4-HPPA lediglich eine WFR von 60% erreichen.

7 Bestimmung von Phenylalanin und p-Tyrosin in proteinreichen Lebensmitteln

Der Gehalt an freiem Phenylalanin, dem o-Tyrosin-Precursor, sowie der Gehalt an freiem p-Tyrosin, dem Precursor von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure wurde in proteinreichen Lebensmitteln ebenfalls bestimmt. Dafür wurden unbestrahlte und mit Dosen von 1 bis 11 kGy gefrorene sowie bei RT bestrahlte Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerbrust auf ihren Phe- und p-Tyr-Gehalt untersucht (Probenaufarbeitung, HPLC- und Bestrahlungsbedingungen siehe Anhang 13.10, 13.3.1 und 13.6). In Abbildung 14 sind die Phe- und p-Tyr-Gehalte in den untersuchten Lebensmitteln dargestellt (Einzelergebnisse siehe Anhang 13.11, Tabelle 33). Die Berechnung der Phe-Gehalte erfolgte anhand einer Matrixkalibrierung. Die p-Tyr-Gehalte wurden anhand einer externen Kalibrierung ausgewertet.

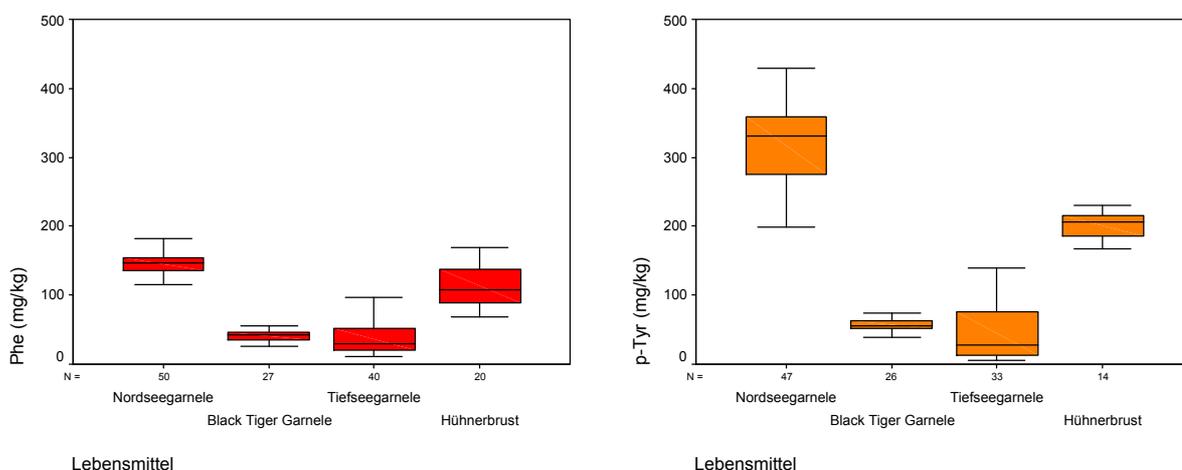


Abbildung 14: Phe- und p-Tyr-Gehalte in verschiedenen Lebensmitteln (Median, Interquartilbereich – Box, Fehlerbalken – Spannweite)

Die Lebensmittel unterscheiden sich signifikant hinsichtlich ihres Phe-Gehaltes (univariate Varianzanalyse, Post-Hoc-Test nach Scheffé, $\alpha = 0,05$). In den Nordseegarnelen und der Hühnerbrust lag der mittlere Phe-Gehalt bei 147 und 122 mg/kg. Die zweite homogene Gruppe stellten Black Tiger Garnelen und Tiefseegarnelen mit viel geringerem mittleren Phe-Gehalt von 41 und 39 mg/kg dar. Bei p-Tyr war eine ähnliche Verteilung der Gehalte wie beim Phe zu beobachten. Im Gegensatz zu Phe gab es bei p-Tyr drei Gruppen. Die Gehalte in Black Tiger

Garnelen und Tiefseegarnelen waren nicht unterscheidbar ($\alpha = 0,05$). Hühnerbrust mit p-Tyr-Gehalt von 206 mg/kg stellte die zweite homogene Gruppe dar. In den Nordseegarnelen wurde ein mittlerer p-Tyr-Gehalt von 322 mg/kg bestimmt, der signifikant höher war als p-Tyr-Gehalte in anderen Lebensmitteln (univariate Varianzanalyse, Post-Hoc-Test nach Scheffé, $\alpha = 0,05$). Die p-Tyr-Gehalte in Black Tiger Garnelen und Tiefseegarnelen von 57 und 45 mg/kg entsprachen ungefähr den Phe-Gehalten. Dagegen war der p-Tyr-Gehalt in den Nordseegarnelen und in Hühnerbrust etwa doppelt so hoch wie der Phe-Gehalt.

Eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass die Konzentration der freien Aminosäuren Phe und p-Tyr artspezifisch sehr verschieden ist. Dieses Ergebnis stimmt mit ULRICH (1990) überein. Die Befunde an den freien Aminosäuren Phe und Tyr in Nordseegarnelen und Hühnerbrust sind wesentlich höher als es von WEBER und VAN MARREWIJK (1972) und von MILLER et al. (1965) berichtet wurde (siehe Tabelle 5 und 7). Wenn in älteren Publikationen für bestimmte Organismen und Gewebe eine geringere Zahl angegeben wird, kann dies allerdings an der nicht ausreichenden Empfindlichkeit der früher benutzten papier- und dünnschichtchromatographischen Methoden liegen (ULRICH, 1990). Im Gegenteil dazu wurden von TAKADA et al. (1988) (siehe Tabelle 5) in Black Tiger Garnelen wesentlich höhere und in Tiefseegarnelen leicht höhere Phe- und p-Tyr-Gehalte festgestellt als in eigenen Untersuchungen. Zahlreiche innere und äußere Faktoren führen zur Veränderung des Spektrums der freien Aminosäuren. Tiefgreifende Veränderungen im Pool der freien Aminosäuren beobachtet man aber auch beim Wechsel des physiologischen Zustands (z.B. im Häutungszyklus der Crustaceen) in Zeiten erhöhter Proteinbiosynthese und als Folge eines Parasitenbefalls. Auf Veränderungen der inneren Bedingungen sind auch die jahresrhythmischen und tagesrhythmischen Schwankungen im Aminosäurepool zurückzuführen. Zu den äußeren Bedingungen, die Konzentration und Spektrum der freien Aminosäuren beeinflussen können, gehören Temperatur, Sauerstoffgehalt und Osmolalität (ULRICH, 1990).

Der Aminosäurepool dient vor allem Krustentieren aus salzhaltigen Gewässern zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts (CLAYBROOK, 1983, WEBER und VAN MARREWIJK, 1972). Die unterschiedlichen Gehalte an freien Aminosäuren

in Nordseegarnelen im Vergleich zu Black Tiger und Tiefseegarnelen könnte eventuell auch auf die verschiedenen Lebensbedingungen (Salinität der Gewässer) zurückgeführt werden. HUONG et al. (2001) untersuchte Veränderungen der freien Aminosäuren in Riesen Süßwasser Garnelen (*Macrobrachium rosenbergii*), die unterschiedlich salzigen Lösungen ausgesetzt wurden. Bei erhöhter Salinität ist die gesamte Konzentration der freien Aminosäuren stark gestiegen. Untersuchungen der einzelnen Aminosäurekonzentrationen zeigten, dass dieser Anstieg auf den spezifischen Änderungen von Glycin, Arginin, Alanin, Prolin und Lysin beruhte. Der größte Anstieg wurde bei Alanin beobachtet, dessen Konzentration unter erhöhter Salinität um das 6-fache im Vergleich zu niedrigerer Salinität und frischem Wasser gestiegen ist. Die anderen Aminosäuren sind um das 2,5-fache gestiegen.

Nicht nur freie Aminosäuren, sondern auch die unterschiedlichen Aktivitäten der Enzyme wie Lipoxygenase, Catalase, Superoxid Dismutase, Glutathion Peroxidase sowie unterschiedliche Gehalte an Antioxidantien in einigen Fischen, Garnelen und anderen Weichtieren weisen deutlich auf artspezifische Unterschiede hin (RUDNEVA, 1999).

In Abbildung 15 und 16 sind die Phe- und p-Tyr-Gehalte in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis dargestellt (Einzelergebnisse siehe Anhang 13.11, Tabelle 34 und 35). Zwischen dem Phe-Gehalt in unbestrahlten sowie mit den Dosen von 1 bis 10 kGy bestrahlten Proben war kein signifikanter Unterschied zu beobachten ($\alpha = 0,05$, univariate Varianzanalyse, Post-Hoc-Test nach Scheffé). Ebenfalls wie bei Phe war auch bei p-Tyr-Gehalt in unbestrahlten sowie mit den Dosen von 1 bis 10 kGy bestrahlten Proben kein signifikanter Unterschied zu beobachten ($\alpha = 0,05$).

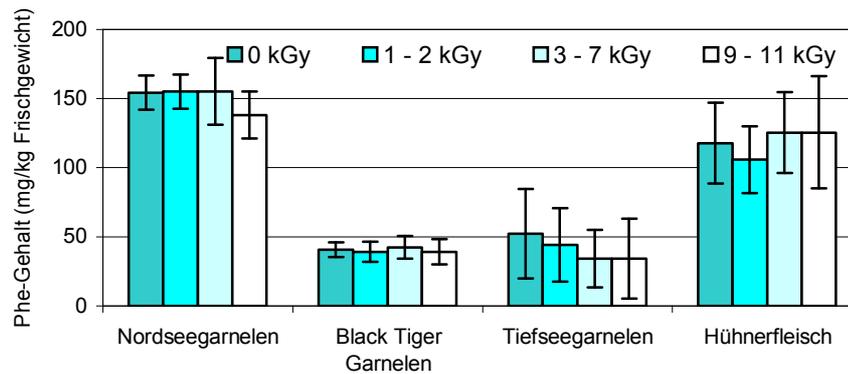


Abbildung 15: Phe-Gehalte (mg/kg Frischgewicht) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis $n \geq 3$, Fehlerbalken-Standardabweichung

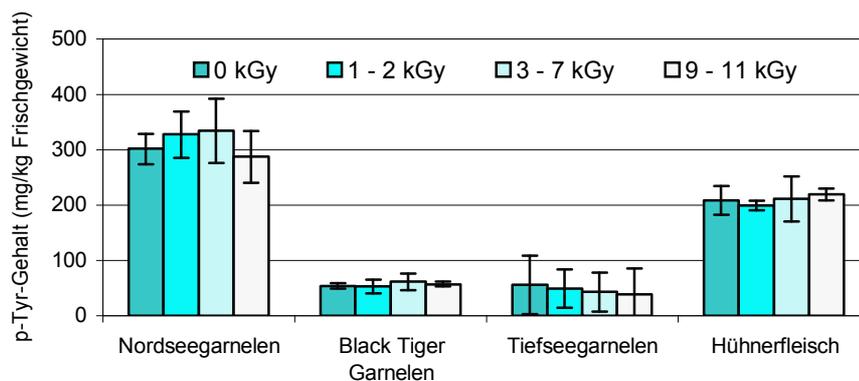


Abbildung 16: p-Tyr-Gehalte (mg/kg Frischgewicht) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis $n \geq 3$, Fehlerbalken-Standardabweichung

8 Bestimmung von o-Tyrosin in γ -bestrahlten proteinreichen Lebensmitteln

Die Validierung des Verfahrens zum Nachweis einer Bestrahlung mittels o-Tyrosin umfasste Untersuchungen von verschiedenen Faktoren, die einen Einfluss auf die Bildung von o-Tyr während der Bestrahlung aufweisen könnten. Es wurden folgende Parameter untersucht:

- Einfluss der Lebensmittelmatrix: Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen
Tiefseegarnelen, Hühnerbrust
- Bedingungen während der Bestrahlung: Bestrahlungsdosis (1, 3, 5, 10 kGy)
Dosisleistung (^{60}Co , 2 und 4 kGy/h)
Temperatur (RT, $\sim -18\text{ }^\circ\text{C}$)
- biologische Variabilität: o-Tyr-Hintergrundgehalte in unbestrahlten Proben
Gehalt des Precursors Phe, Gehalt an p-Tyr
- Einfluss der Verarbeitung der Lebensmittel vor der Bestrahlung: glasiert/
nicht glasiert

8.1 Einfluss der Temperatur

8.1.1 Bestimmung von o-Tyrosin bei RT bestrahlten proteinreichen Lebensmitteln

Es wurden unbestrahlte und mit Dosen von 1 bis 11 kGy bei RT bestrahlte Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerbrust auf ihren o-Tyr-Gehalt untersucht (Probenaufarbeitung, HPLC- und Bestrahlungsbedingungen siehe Anhang 13.10, 13.3.1 und 13.6). Dazu wurden zwei Bestrahlungsversuche auf unterschiedlichen Bestrahlungsanlagen durchgeführt. Die Bestrahlung erfolgte zum einen in einer Blutbestrahlungsanlage der Firma Beiersdorf mit einer ^{137}Cs -Strahlenquelle. Zum anderen wurde eine kommerzielle Bestrahlungsanlage der Firma GAMMASTER mit einer ^{60}Co -Strahlenquelle verwendet. Als Beispiele sind in den Abbildungen 64-67 die Chromatogramme der mit 5 kGy bestrahlten

Nordseegarnelen und Hühnerbrust und einer unbestrahlten Kontrollprobe dargestellt. In den Abbildungen 17 und 18 sind die o-Tyr-Gehalte in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis aus den beiden Bestrahlungsversuchen dargestellt (Einzelerggebnisse siehe Anhang 13.12, Tabelle 36 und 37). Es wurde jeweils eine 4-fache und eine 6-fache Bestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Berechnung der o-Tyr-Gehalte erfolgte bei Nordseegarnelen mittels α -Methyl-p-Tyr als interner Standard. o-Tyr-Gehalte bei Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerbrust wurden anhand einer Matrixkalibrierung berechnet. Zur Absicherung der Ergebnisse erfolgte zusätzlich eine Abschätzung der Gehalte in unbestrahlten Proben sowie in bestrahlten Black Tiger Garnelen mittels HPLC/MS (HPLC/MSD-Bedingungen siehe Anhang 13.3.2, Einzelergbnisse siehe Anhang 13.12.5, Tabelle 45).

Die o-Tyr-Gehalte nahmen bei allen untersuchten Lebensmitteln, die bei RT bestrahlt wurden, mit steigender Bestrahlungsdosis annähernd linear zu. In dem ersten Bestrahlungsversuch wurden ungefähr gleich große Gehalte von o-Tyr in bestrahlten Nordseegarnelen und Black Tiger Garnelen bestimmt (siehe Abbildung 17). Sie lagen zwischen 99 und 846 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht. Die o-Tyr-Gehalte in bestrahlten Tiefseegarnelen waren dagegen mit 49–475 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wesentlich niedriger. In der Hühnerbrust waren die niedrigsten o-Tyr-Gehalte zu finden. Sie lagen bei 52–288 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Der zweite Bestrahlungsversuch bestätigte die Ergebnisse für Black Tiger Garnelen und Hühnerbrust (siehe Abbildung 18). In Nordseegarnelen konnten niedrigere o-Tyr-Gehalte zwischen 107–480 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bestimmt werden, was ungefähr 60% des o-Tyr-Gehaltes aus dem ersten Bestrahlungsversuch entspricht. Dagegen konnten in Tiefseegarnelen höhere o-Tyr-Gehalte zwischen 146–867 $\mu\text{g}/\text{kg}$ gefunden werden, die ungefähr doppelt so hoch im Vergleich zu den o-Tyr-Gehalten aus dem ersten Bestrahlungsversuch waren.

Die o-Tyr-Gehalte in den bei RT bestrahlten Lebensmitteln waren ab einer Bestrahlungsdosis von 3 kGy signifikant höher als die Hintergrundwerte der unbestrahlten Proben ($\alpha = 0,05$, univariate Varianzanalyse, Post-Hoc-Test nach Scheffé).

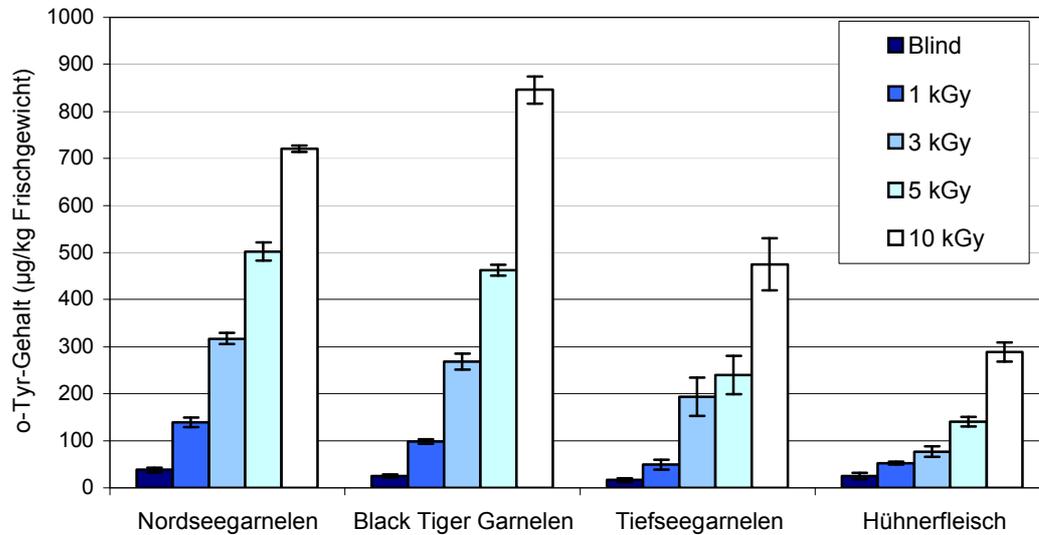


Abbildung 17: o-Tyr-Gehalte ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht) in bei RT bestrahlten Proben in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis, $n=4$, Fehlerbalken-Standardabweichung, ^{137}Cs -Strahlenquelle

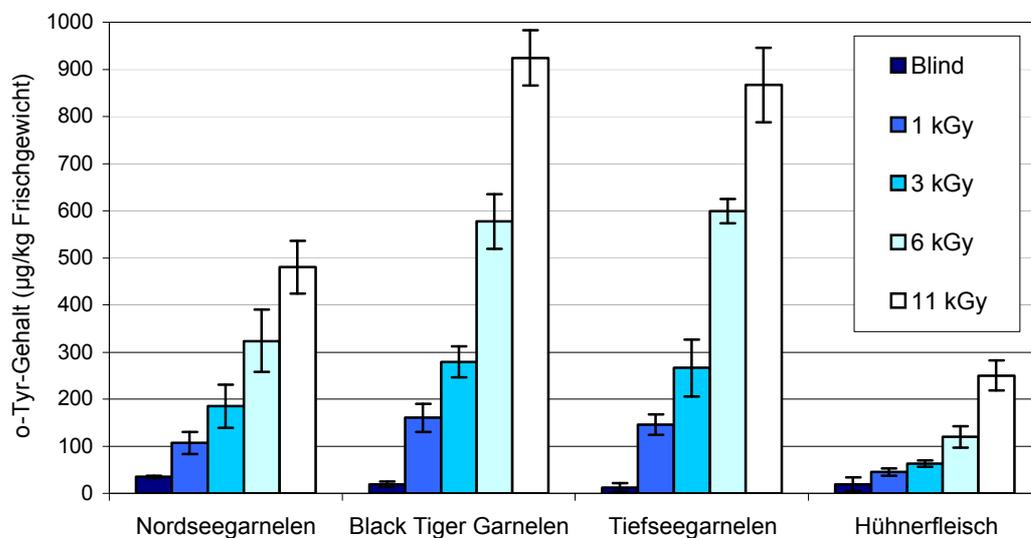


Abbildung 18: o-Tyr-Gehalte ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht) in bei RT bestrahlten Proben in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis, $n=6$, Fehlerbalken-Standardabweichung, ^{60}Co -Strahlenquelle

Es wurde eine proportionale Abhängigkeit zwischen der Bestrahlungsdosis und dem o-Tyr-Gehalt im Bereich von 0-10 kGy festgestellt. Der Anstieg des o-Tyr-Gehaltes verlief in Abhängigkeit von der aufgenommenen Energiedosis annähernd linear – es wurden $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ o-Tyr in Nordseegarnelen pro kGy gebildet. HEIN et al. (2000) stellte über den betrachteten Dosisbereich eine höhere Bildungsrate von $120 \mu\text{g}/\text{kg}$ pro kGy fest. Dagegen berichtete KRACH et al. (1997) über eine Konzentration von $26 \mu\text{g}/\text{kg}$ pro kGy. Eigene Untersuchungen zeigten die niedrigste Bildungsrate

für Hühnerbrust, nämlich 22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pro kGy. Im Vergleich dazu bildete sich o-Tyr in bestrahlten Black Tiger Garnelen und Tiefseegarnelen mit 105 und 95 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pro kGy. Auch bei der Untersuchung von proteingebundenem o-Tyr in bestrahltem Hühnerfleisch wurde dieser Zusammenhang von MEIER et al. (1993) ermittelt. Die Bildungsrate betrug etwa 55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pro kGy. In bestrahlten Garnelen konnte MISCHKE et al. (1993) ebenfalls einen linearen Anstieg des Gehaltes an proteingebundenem o-Tyr feststellen. Die Bildungsrate lag bei 103 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pro kGy. Da es sich dabei um proteingebundenes o-Tyr handelt, lassen sich die Ergebnisse nicht vergleichen.

Ein Vergleich der Ergebnisse nach FL- und MS-Detektion zeigte ungefähr gleich große Werte für unbestrahlte Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerbrust sowie die bestrahlten Black Tiger Garnelen. Aufgrund der höheren Nachweisgrenze im Vergleich zur FLD war es nicht möglich, o-Tyr-Gehalte in unbestrahlten Nordseegarnelen zu bestimmen.

8.1.2 Bestimmung von o-Tyrosin in gefrorenen bestrahlten proteinreichen Lebensmitteln

Zur Bestimmung von o-Tyr in gefrorenen bestrahlten proteinreichen Lebensmitteln wurden zwei Bestrahlungsversuche mit ^{60}Co -Strahlenquellen in kommerziellen Bestrahlungsanlagen der Firma GAMMASTER durchgeführt. Dafür wurden unbestrahlte und mit Dosen von 1 bis 10 kGy im gefrorenen Zustand bestrahlte Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerbrust auf ihren o-Tyr-Gehalt untersucht (Probenaufarbeitung, HPLC- und Bestrahlungsbedingungen siehe Anhang 13.10, 13.3.1 und 13.6). In Abbildung 19 und 20 sind die o-Tyr-Gehalte aus den beiden Bestrahlungsversuchen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis dargestellt (Einzelergebnisse siehe Anhang 13.12, Tabelle 38 und 39). Bei gefrorenen bestrahlten Proben wurden jeweils 4-fache und 6-fache Bestimmungen durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Berechnung der o-Tyr-Gehalte erfolgte anhand einer Matrixkalibrierung.

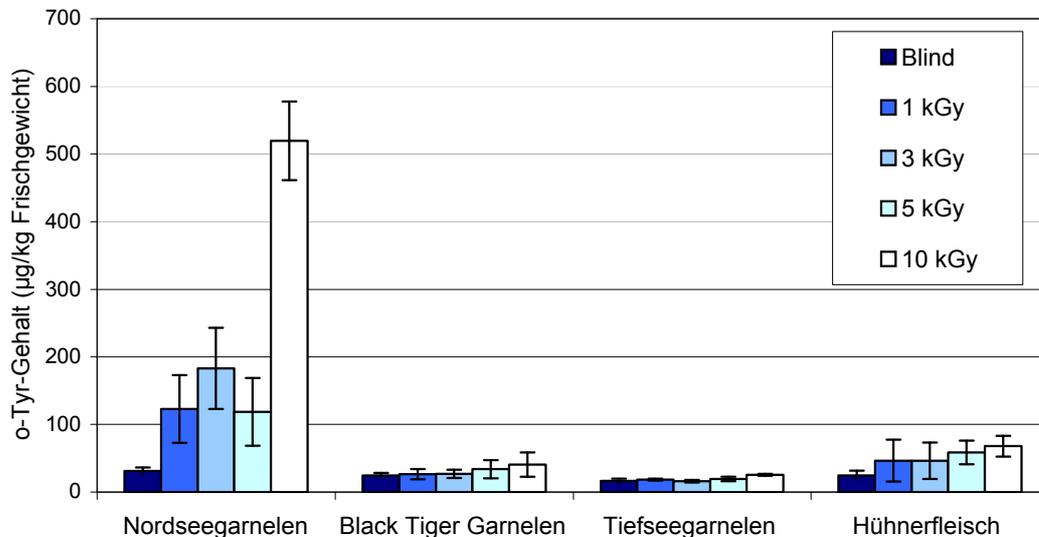


Abbildung 19: o-Tyr-Gehalte ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht) in gefrorenen bestrahlten Proben in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis, $n=4$, Fehlerbalken-Standardabweichung

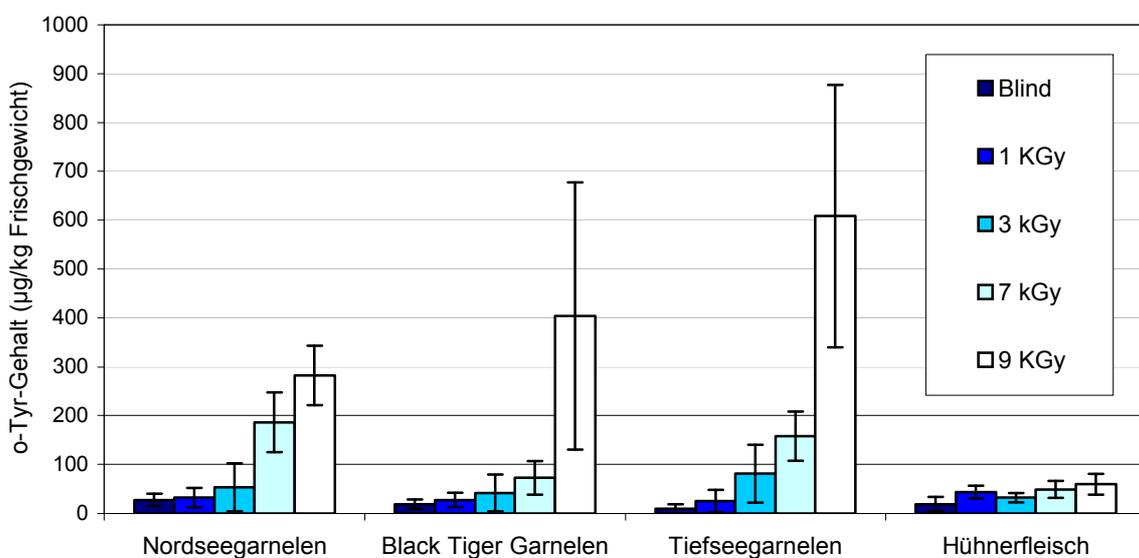


Abbildung 20: o-Tyr-Gehalte ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht) in gefrorenen bestrahlten Proben in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis, $n=6$, Fehlerbalken-Standardabweichung

Aus den Ergebnissen der beiden Bestrahlungsversuche geht hervor, dass sich in gefrorenen bestrahlten Lebensmitteln weniger oder überhaupt kein o-Tyr bildet im Vergleich zu den bei RT bestrahlten Lebensmitteln. Bei Nordseegarnelen konnte in beiden Bestrahlungsversuchen eine wiederholte Bildung von o-Tyr festgestellt werden. Es konnte allerdings keine proportionale Abhängigkeit zwischen der Bestrahlungsdosis und dem o-Tyr-Gehalt im Bereich von 0-10 kGy nachgewiesen

werden, so wie es bei den bei RT bestrahlten Proben der Fall war. Die mittleren o-Tyr-Gehalte in gefrorenen bestrahlten Nordseegarnelen lagen beim ersten Versuch zwischen 123 und 520 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht. Es konnte ab einer Bestrahlungsdosis von 3 kGy ein signifikanter Unterschied ($\alpha = 0,05$, univariate Varianzanalyse, Post-Hoc-Test nach Scheffé) im Vergleich zu den unbestrahlten Proben festgestellt werden. Beim zweiten Versuch waren geringere Mengen von o-Tyr zu finden. Der o-Tyr-Gehalt betrug 33–282 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Ein signifikanter Unterschied zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Nordseegarnelen ergab sich erst ab einer Bestrahlungsdosis von 7 kGy ($\alpha = 0,05$). In Black Tiger Garnelen und Tiefseegarnelen konnte im ersten Versuch keine Bildung von o-Tyr nachgewiesen werden ($\alpha = 0,05$). Im zweiten Versuch kam es jedoch bei höheren Bestrahlungsdosen zur o-Tyr Bildung. Der o-Tyr-Gehalt lag bei 28–404 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Black Tiger Garnelen und bei 26–609 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für Tiefseegarnelen. Ein signifikanter Unterschied ($\alpha = 0,05$) zu den unbestrahlten Proben konnte erst ab einer Bestrahlungsdosis von 9 kGy festgestellt werden. In dem gefrorenen bestrahlten Hühnerfleisch konnte in beiden Bestrahlungsversuchen keine Bildung von o-Tyr nachgewiesen werden ($\alpha = 0,05$).

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse aus den beiden Bestrahlungsversuchen lässt sich sagen, dass ein Nachweis der erfolgten Bestrahlung über o-Tyr bei gefrorenen Nordseegarnelen ab einer Bestrahlungsdosis von 7–9 kGy unter den angewandten Bedingungen möglich sein könnte. Die Bestrahlung von Garnelen und Hühnerfleisch ist in vielen Ländern mit Dosen von 2–7 kGy zugelassen (IAEA, 2000, WHO, 1998). Ein möglicher Nachweis ab einer Dosis von 7–9 kGy wäre also nicht sinnvoll. Ein Einsatz von o-Tyr als Bestrahlungsmarker ist demnach für Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerfleisch bei der Bestrahlung im gefrorenen Zustand nicht möglich.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Bestrahlungsversuche lassen sich womöglich auf die verschiedenen Temperaturen während der Durchführung der Bestrahlung zurückführen. Besonders bei höheren Bestrahlungsdosen war es sehr schwierig, während der Bestrahlung die Temperatur mit den Kühlelementen mehrere Stunden unter $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu halten. Hinzu kam noch die zusätzliche Erwärmung durch die Strahlungsquelle. Die Proben tauten nach einigen Stunden teilweise auf.

Im ersten Bestrahlungsversuch waren die Temperaturen während der Bestrahlung niedriger als im zweiten Bestrahlungsversuch (siehe Anhang 13.6, Tabelle 19, 21 und 23). Die Zunahme der Gehalte an o-Tyr bei höheren Bestrahlungsdosen in Black Tiger Garnelen und Tiefseegarnelen könnte dadurch erklärt werden. Eine Ausnahme stellte die Hühnerbrustprobe dar. Auch bei leicht erhöhten Temperaturen während des zweiten Bestrahlungsversuches hat sich kein o-Tyr gebildet. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Hühnerbrustproben in größeren Stücken bei der Bestrahlung vorlagen als die Garnelen und dadurch nicht so schnell auftauen konnten.

Die o-Tyr-Bildung in den gefrorenen Lebensmitteln während der Bestrahlung mit höheren Dosen kann vermutlich auf die erhöhte Temperatur zurückgeführt werden. Die Tatsache aber, dass sich o-Tyr bei Nordseegarnelen auch bei sehr niedrigen Temperaturen und niedrigen Dosen gebildet hat, kann offensichtlich dadurch erklärt werden, dass der Wasseranteil in diesem Lebensmittel nicht ganz eingefroren ist und als Medium für die Reaktionen dient. Aufgrund der in der Gewebeflüssigkeit gelösten Stoffe wie Salze, Kohlenhydrate, Säuren und anderen organischen Stoffen gefriert bei sehr tiefen Temperaturen (unter -70°C) in tierischen Lebensmitteln ein bestimmter Wasseranteil nicht. Der nicht ausgefrorene Wasseranteil ist fest an die Proteine oder an die Kohlenhydrate gebunden. Man nennt es daher auch das gebundene oder das nicht gefrierbare Wasser (GUTSCHMIDT, 1964). Dieser Wasseranteil ist vom Anfangsgehalt weitgehend unabhängig (HERRMANN, 1970). Vergleicht man den Wassergehalt der einzelnen untersuchten Lebensmittel (Tabelle 4 und 6), so kommt man zu dem Ergebnis, dass dieser nur wenig unterschiedlich ist. Im Hühnerfleisch war der Wassergehalt am niedrigsten und betrug 75%. In Nordseegarnelen war der Wasseranteil genauso groß wie bei Black Tiger Garnelen, nämlich 78%. Tiefseegarnelen enthalten 82% Wasser.

Auch Mineralstoffe haben auf den Gefrierprozess einen Einfluss. Auf ihre Anwesenheit ist es mit zurückzuführen, dass der ungebundene Anteil des Wassers im Lebensmittel nicht bei $\pm 0^{\circ}\text{C}$, sondern erst bei einer tieferen Temperatur zu gefrieren beginnt und mit fallender Temperatur nach und nach ausfriert (GUTSCHMIDT, 1964). Vergleicht man die Gehalte an Mineralstoffen in den verschiedenen Lebensmitteln (siehe Tabelle 4 und 6), so stellt man fest, dass sie

ungefähr gleich sind. Nordseegarnelen weisen den höchsten Gehalt von 14 g Mineralstoffen pro kg Frischgewicht auf. Dies könnte vielleicht erklären, warum sich o-Tyr in gefrorenen Nordseegarnelen gebildet hat. Im Hühnerfleisch waren dagegen geringfügig weniger Mineralstoffe vorhanden, nämlich 12 g/kg. Eine Bildung von o-Tyr konnte aber nicht festgestellt werden. In Black Tiger Garnelen wurden 11 g Mineralstoffe pro kg ermittelt. Tiefseegarnelen weisen die geringsten Mineralstoffgehalte aus der ganzen Gruppe auf und zwar 8 g/kg.

8.2 Einfluss der Dosisleistung

Zur Ermittlung des möglichen Einflusses der Dosisleistung auf die Bildung von o-Tyr wurden mit Dosen von 1 bis 9 kGy und einer Dosisleistung von 2 oder 4 kGy/h im gefrorenen Zustand und bei RT bestrahlte Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerbrust auf ihren o-Tyr-Gehalt untersucht (Probenaufarbeitung, HPLC- und Bestrahlungsbedingungen siehe Anhang 13.10, 13.3.1 und 13.6). In den Abbildungen 21-28 sind die o-Tyr-Gehalte jeweils für die betreffende Dosisleistung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis dargestellt (Einzelergebnisse siehe Anhang 13.12.2, Tabelle 40 und 41). Es wurde jeweils eine 3-fache Bestimmung durchgeführt.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede ($\alpha = 0,05$, univariate Varianzanalyse, Post-Hoc-Test nach Scheffé) zwischen den o-Tyr-Gehalten bei einer Dosisleistung von 2 kGy und 4 kGy ermittelt werden, weder bei gefrorenen noch bei RT bestrahlten Lebensmitteln. Die Dosisleistung zeigte daher keinen Einfluss auf die Bildung von o-Tyr während der Bestrahlung. Die Untersuchungen von KRAJNIK et al. (1995) bestätigten dieses Ergebnis. Diese haben im Bereich von 3,6 kGy/h bis zu 14,4 kGy/h keinen Einfluss der Dosisleistung auf die Bildung von o-Tyr in wässriger Lösung festgestellt.

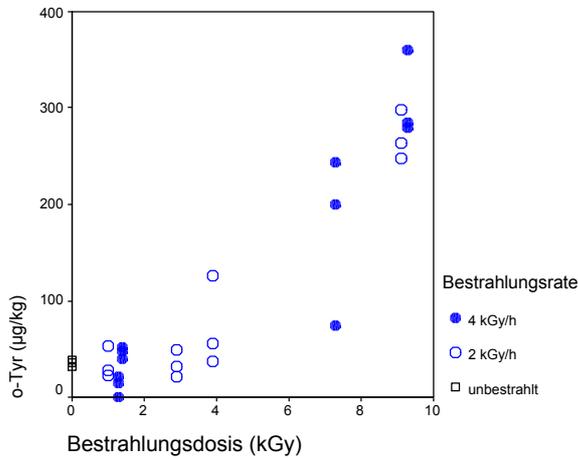


Abbildung 21: o-Tyr-Gehalte in gefrorenen bestrahlten Nordseegarnelen bei verschiedenen Dosisleistungen

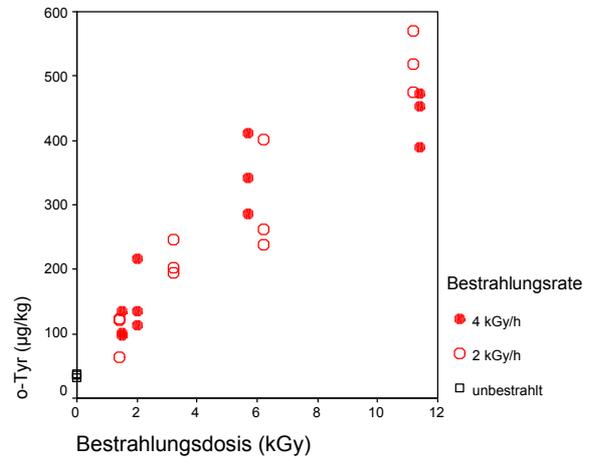


Abbildung 22: o-Tyr-Gehalte in bei RT bestrahlten Nordseegarnelen bei verschiedenen Dosisleistungen

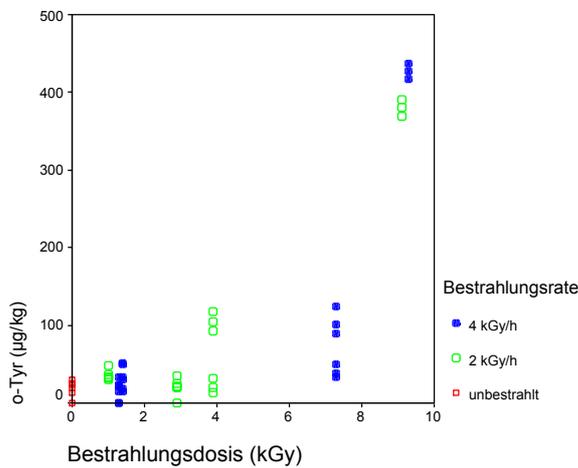


Abbildung 23: o-Tyr-Gehalte in gefrorenen bestrahlten Black Tiger Garnelen bei verschiedenen Dosisleistungen

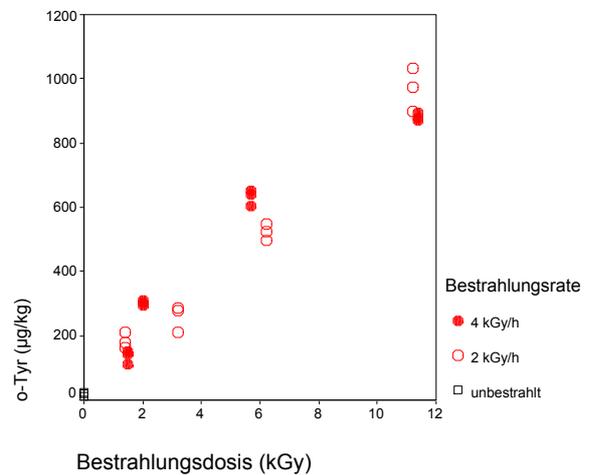


Abbildung 24: o-Tyr-Gehalte in bei RT bestrahlten Black Tiger Garnelen bei verschiedenen Dosisleistungen

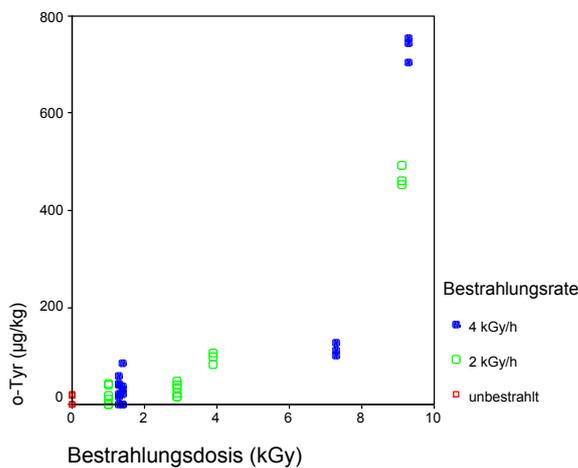


Abbildung 25: o-Tyr-Gehalte in gefrorenen bestrahlten Tiefseegarnelen bei verschiedenen Dosisleistungen

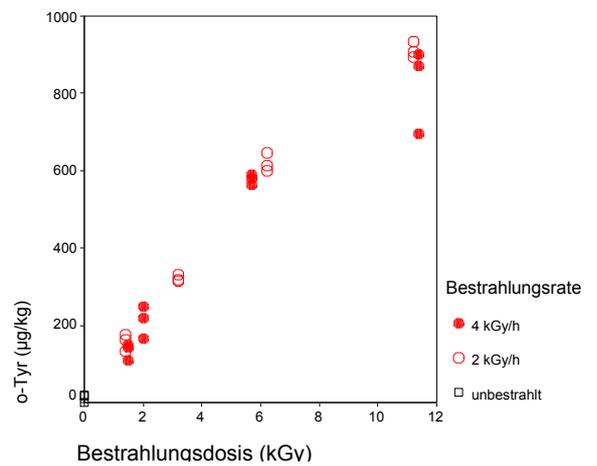


Abbildung 26: o-Tyr-Gehalte in bei RT bestrahlten Tiefseegarnelen bei verschiedenen Dosisleistungen

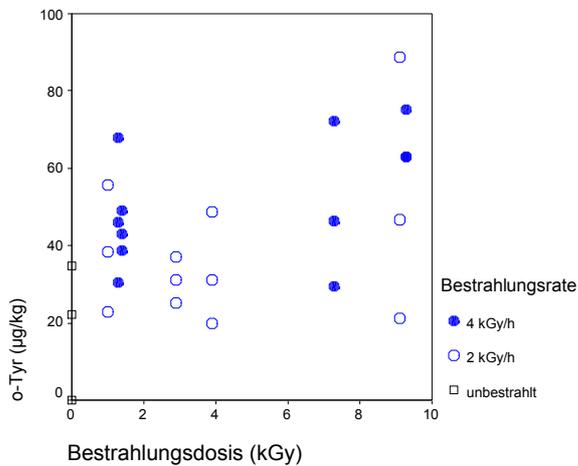


Abbildung 27: o-Tyr-Gehalte in gefrorener bestrahlter Hühnerbrust bei verschiedenen Dosisleistungen

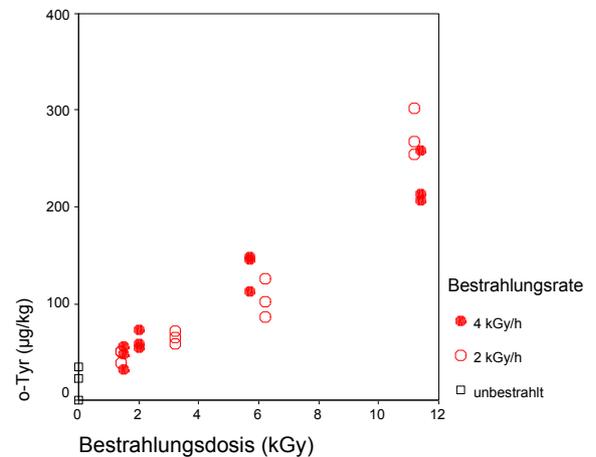


Abbildung 28: o-Tyr-Gehalte in bei RT bestrahlter Hühnerbrust bei verschiedenen Dosisleistungen

8.3 Einfluss der Verarbeitung der Lebensmittel vor der Bestrahlung - Glasierung

Zur Ermittlung des möglichen Einflusses der Glasierung auf die Bildung von o-Tyr wurden mit Dosen von 1 bis 9 kGy gefroren bestrahlte, glasierte und unglasierte Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen und Tiefseegarnelen auf ihren o-Tyr-Gehalt untersucht (Probenaufarbeitung, HPLC- und Bestrahlungsbedingungen siehe Anhang 13.10, 13.3.1 und 13.6). In den Abbildungen 29-31 sind die o-Tyr-Gehalte in glasierten sowie unglasierten Proben in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis dargestellt (Einzelergebnisse siehe Anhang 13.12.3, Tabelle 42). Es wurde jeweils eine 6-fache Bestimmung durchgeführt.

In den glasierten sowie in unglasierten bestrahlten Nordseegarnelen konnten ähnliche o-Tyr-Gehalte ermittelt werden (Abbildung 29), die keinen signifikanten Unterschied aufwiesen ($\alpha = 0,05$, univariate Varianzanalyse, Post-Hoc-Test nach Scheffé). Dagegen waren bei Black Tiger Garnelen und Tiefseegarnelen Unterschiede zwischen den glasierten und unglasierten Proben festzustellen (siehe Abbildung 30 und 31). In den glasierten mit 3 und 5 kGy bestrahlten Black Tiger Garnelen konnten im Vergleich zu den unglasierten Proben leicht erhöhte o-Tyr-Gehalte gemessen werden. In den bei 10 kGy bestrahlten glasierten Proben war aber der o-Tyr-Gehalt 5-fach höher als in den unglasierten.

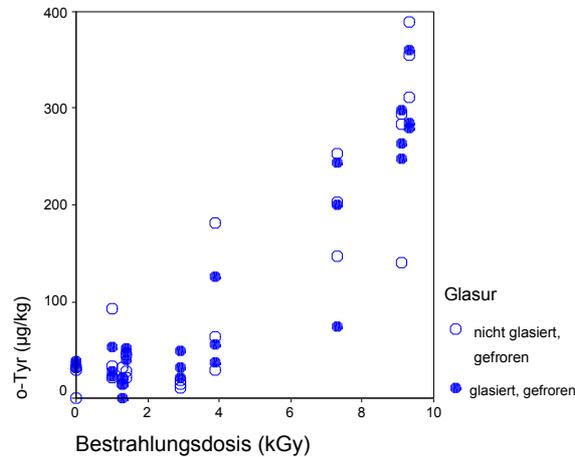


Abbildung 29: o-Tyr-Gehalte in gefrorenen glasierten und unglasierten Nordseegarnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Im Gegensatz dazu konnten in den glasierten mit 3 und 5 kGy bestrahlten Tiefseegarnelen etwas niedrigere o-Tyr-Gehalte als im Vergleich zu den unglasierten Proben gefunden werden. Genauso wie bei Black Tiger Garnelen stellte auch hier die Bestrahlungsdosis von 10 kGy eine Ausnahme dar. Die bei 10 kGy bestrahlten glasierten Tiefseegarnelen wiesen einen 2-fach höheren o-Tyr-Gehalt auf als die unglasierten Proben.

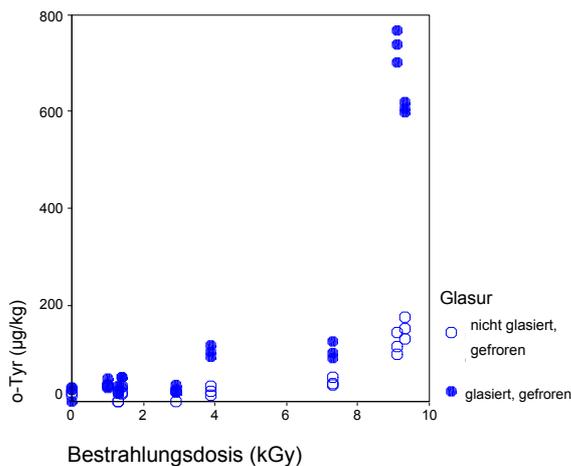


Abbildung 30: o-Tyr-Gehalte in gefrorenen glasierten und unglasierten Black Tiger Garnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

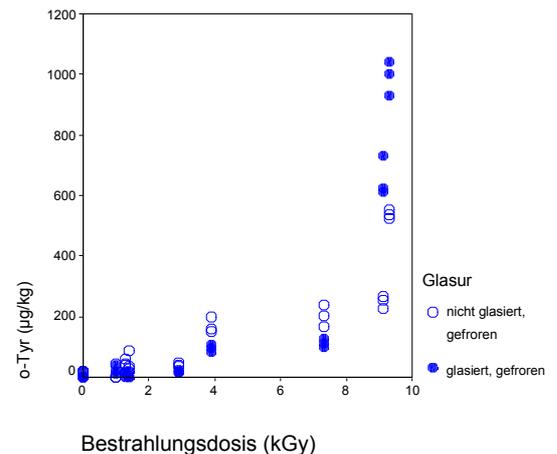


Abbildung 31: o-Tyr-Gehalte in gefrorenen glasierten und unglasierten Tiefseegarnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Der Grund für die großen Schwankungen zwischen den o-Tyr-Gehalten in den mit der Dosis von 10 kGy bestrahlten unglasierten und glasierten Black Tiger Garnelen sowie Tiefseegarnelen ist nicht bekannt. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass es sich bei den Proben jeweils um unterschiedliche Chargen handelte.

Möglicherweise könnte dieser Befund auch damit erklärt werden, dass viele verschiedene Faktoren kombiniert wirksam die Bildung von o-Tyr beeinflussen können. Nicht zuletzt können auch die höchst komplexen Reaktionen, die bei der γ -Bestrahlung in Lebensmitteln auftreten, eine Rolle dabei spielen.

8.4 o-Tyrosin-Hintergrundgehalte in unbestrahlten Proben

In unbestrahlten Garnelen- und Hühnerbrustfiletproben konnten ähnliche o-Tyr-Hintergrundgehalte im Konzentrationsbereich von 10 bis 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht nachgewiesen werden. Zwischen den o-Tyr-Gehalten in einzelnen unbestrahlten Lebensmitteln konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($\alpha = 0,05$). Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von HEIN et al. (2000) und KRACH et al. (1997) überein. In unbestrahlten Garnelen konnten sie eindeutig einen o-Tyr-Hintergrundgehalt von 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nachweisen. Auch MEIER et al. (1993) berichtete von einem geringen Hintergrundgehalt – unabhängig von der Art der untersuchten Lebensmittel und der angewandten Methode. CHUAQUI-OFFERMANN und McDOUGALL (1991b) stellten fest, dass die Bildung der Hintergrundgehalte an o-Tyr unabhängig von der Lagerungszeit und –temperatur sowie von der mikrobiellen Belastung der Probe ist. o-Tyr wird nicht nur durch ionisierende Strahlung gebildet. Vielmehr bildet sich o-Tyr überall dort, wo reaktive Sauerstoffspezies wie das Hydroxyl-Radikal mit Phe in Berührung kommen. Jedes Lebewesen ist von jeher einem gewissen Strahlungspegel aus natürlichen Quellen ausgesetzt. Die natürliche äußere Strahlungsexposition stammt von der kosmischen Strahlung, vom Radon-Gas in der Luft und von den radioaktiven Elementen im Erdreich.

8.5 Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Phenylalanin und der strahleninduzierten Bildung von o-Tyrosin

Eine Korrelation zwischen dem Phe-Gehalt und einer Bildung von o-Tyr ist in Abbildung 32 und 33 dargestellt (Einzelergebnisse siehe Anhang 13.12.4, Tabelle 43 und 44). Auf der x-Achse ist der Gehalt an Phe dargestellt. Die Fehlerbalken (horizontal) geben die Standardabweichung an. Auf der y-Achse ist die Bildung von o-Tyr in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht pro kGy aufgetragen. Die einzelnen Stufen sind jeweils für die Bestrahlungsdosis dargestellt. Aus der Abbildung 32 ist ersichtlich, dass sich

z.B. während der Bestrahlung bei RT in Black Tiger Garnelen nur ca. 100 μg o-Tyr aus 40 mg Phe bildete, was einem Verhältnis von 1/400 entsprach. Bei Tiefseegarnelen war die Bildungsrate ähnlich und entsprach ungefähr 1/500. Dagegen hat sich in Nordseegarnelen nur 1/3000 o-Tyr aus dem ursprünglichen Phe gebildet, was sechsmal weniger war als bei Tiefseegarnelen. In Hühnerbrust konnte noch weniger o-Tyr aus dem Phe umgesetzt werden und zwar 1/5000. Das war zehnmal weniger als bei Tiefseegarnelen.

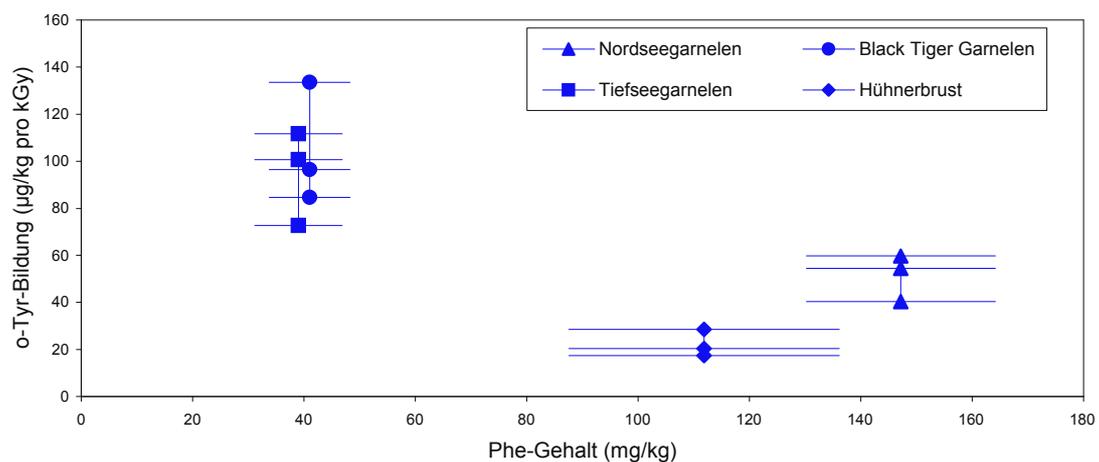


Abbildung 32: o-Tyr-Bildung in $\mu\text{g}/\text{kg}$ pro kGy in Abhängigkeit vom Gehalt des Precursors Phe im jeweiligen Lebensmittel, Bestrahlung bei RT

In Abbildung 33 ist die Korrelation zwischen Phe und der Bildung von o-Tyr in gefrorenen bestrahlten Lebensmitteln dargestellt. Aus dieser Abbildung geht hervor, dass sich in gefrorenen bestrahlten Lebensmitteln weniger o-Tyr bildet als bei RT bestrahlten Lebensmitteln. So wurde beispielsweise bei Black Tiger Garnelen eine Umsatzrate von 1/3000 ermittelt im Vergleich zu 1/400 bei RT. Das ist um den Faktor 7,5 weniger. Bei Tiefseegarnelen war es 1/1000, in Nordseegarnelen 1/5000 und in Hühnerbrust mit 1/5600 noch weniger. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich zusammenfassend sagen, dass keine Abhängigkeit zwischen dem Phe-Gehalt und der strahleninduzierten Bildung von o-Tyr während der Bestrahlung bei den untersuchten proteinreichen Lebensmitteln festgestellt wurde. Die Bildungsrate von o-Tyr ist jedoch von der Lebensmittelmatrix abhängig.

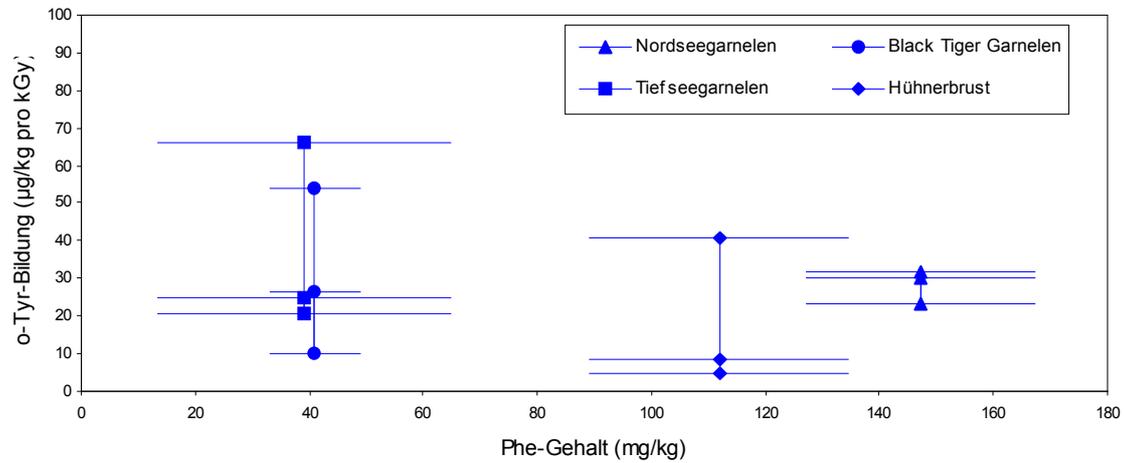


Abbildung 33: o-Tyr-Bildung in $\mu\text{g}/\text{kg}$ pro kGy in Abhängigkeit vom Gehalt des Precursors Phe im jeweiligen Lebensmittel, Bestrahlung im gefrorenen Zustand

9 Bestimmung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure in γ -bestrahlten proteinreichen Lebensmitteln

Es wurden unbestrahlte und mit Dosen von 1 bis 9 kGy bestrahlte gefrorene Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerbrust auf ihren 3,4-HPPA-Gehalt untersucht (Probenaufarbeitung, HPLC- und Bestrahlungsbedingungen siehe Anhang 13.15, 13.3.3 und 13.6). Als Beispiel sind in Abbildung 71 und 72 die Chromatogramme von mit 3 kGy bestrahlten gefrorenen Nordseegarnelen und einer unbestrahlten Kontrollprobe dargestellt. In Abbildung 34 sind die 3,4-HPPA-Gehalte in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis gezeigt (Einzelergebnisse siehe Anhang 13.16, Tabelle 51). Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Berechnung der 3,4-HPPA Gehalte erfolgte mittels 3,3-HPPA als internem Standard.

Die 3,4-HPPA-Gehalte nahmen bei allen untersuchten Lebensmitteln, die im gefrorenen Zustand bestrahlt waren, mit steigender Bestrahlungsdosis annähernd linear zu. Ungefähr gleich große Gehalte wurden in den gefrorenen bestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen und in Hühnerbrust bestimmt. Sie lagen zwischen 1,0 und 25,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht. Die 3,4-HPPA-Gehalte in Tiefseegarnelen waren dagegen mit 2,7–9,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ viel niedriger. In unbestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen und Hühnerbrustfiletproben konnten ähnliche 3,4-HPPA-Hintergrundgehalte im Konzentrationsbereich von 0,2 bis 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht nachgewiesen werden. Höhere Blindwerte von 1,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht wurden in den Tiefseegarnelen gemessen.

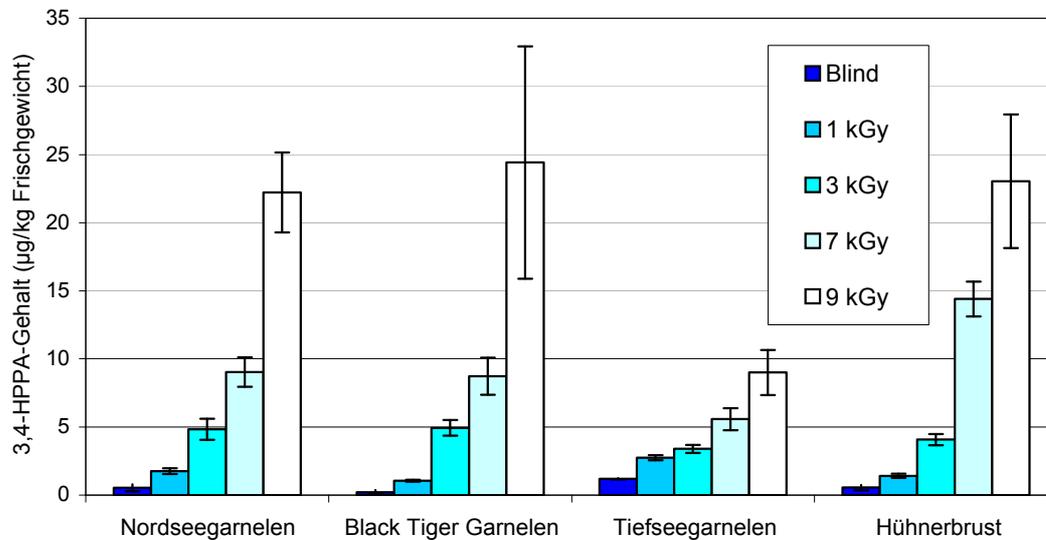


Abbildung 34: 3,4-HPPA-Gehalte ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht) in gefrorenen bestrahlten Proben in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis, $n=2$, Fehlerbalken-Standardabweichung

Bei den gefrorenen bestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen und beim Hühnerfleisch konnte bereits ab einer Bestrahlungsdosis von 3 kGy ein signifikanter Unterschied ($\alpha = 0,05$, univariate Varianzanalyse, Post-Hoc-Test nach Scheffé) zu den unbestrahlten Proben festgestellt werden. Bei den Tiefseegarnelen konnten aufgrund der hohen Blindwerte und der geringeren 3,4-HPPA-Gehalte in den bestrahlten Proben signifikante Unterschiede erst ab einer Bestrahlungsdosis von 7 kGy festgestellt werden ($\alpha = 0,05$).

Die 3,4-HPPA-Gehalte zwischen 1 und 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in den gefrorenen bestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen sowie im Hühnerfleisch bestätigten die Ergebnisse von KLEEBERG (2002). In den Tiefseegarnelen wurden viel geringere Gehalte gefunden, die ebenfalls gut mit den Werten von KLEEBERG (2002) korrespondieren. Auch die bestimmten Blindwerte, insbesondere die erhöhten bei Tiefseegarnelen, stimmen mit den von KLEEBERG (2002) ermittelten Werten überein. KLEEBERG (2002) untersuchte ebenfalls Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerfleisch, die bei Raumtemperatur bestrahlt wurden. Die Gehalte in den bei Raumtemperatur bestrahlten Proben waren nur geringfügig niedriger. Somit konnte gezeigt werden, dass die 3,4-HPPA-Gehalte unabhängig von der Bestrahlungstemperatur sind.

9.1 Zusammenhang zwischen dem Gehalt an p-Tyrosin und der strahleninduzierten Bildung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure

Eine Korrelation zwischen dem Gehalt des Precursors p-Tyr und einer Bildung von 3,4-HPPA ist in Abbildung 35 dargestellt (Einzelergebnisse siehe Anhang 13.11 Tabelle 33 und Anhang 13.16 Tabelle 52). Auf der x-Achse ist der p-Tyr-Gehalt dargestellt. Die horizontalen Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Auf der y-Achse ist die Bildung von 3,4-HPPA in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht pro kGy aufgetragen. Die einzelnen Stufen sind jeweils für die Bestrahlungsdosis dargestellt. Aus der Abbildung 35 ist ersichtlich, dass sich z.B. während der Bestrahlung in Nordseegarnelen nur ca. $1,6 \mu\text{g}/\text{kg}$ pro kGy 3,4-HPPA aus 322 mg p-Tyr bildete, was ungefähr einem Verhältnis von $1/200\,000$ entsprach. Bei Hühnerbrust war es etwa $1/125\,000$. Dagegen hat sich in Black Tiger Garnelen und Tiefseegarnelen $1/30\,000$ 3,4-HPPA aus dem ursprünglichen p-Tyr gebildet, was fünfmal mehr als bei Nordseegarnelen und viermal mehr als bei Hühnerbrust war. Zwischen dem p-Tyr-Gehalt und der strahleninduzierten Bildung von 3,4-HPPA wurde bei den untersuchten proteinreichen Lebensmitteln somit keine Abhängigkeit festgestellt. Die Bildungsrate von 3,4-HPPA ist jedoch von der Lebensmittelmatrix abhängig.

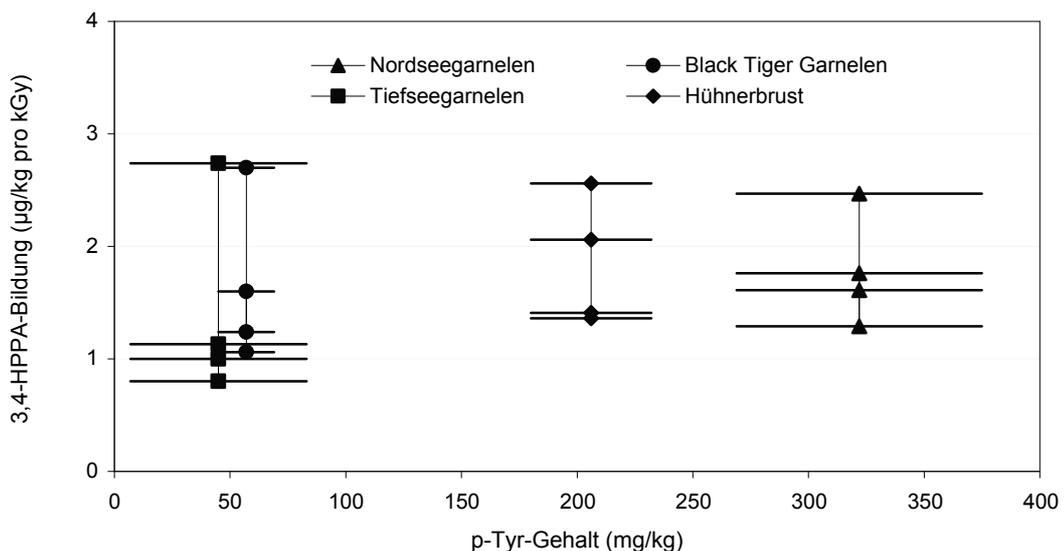


Abbildung 35: 3,4-HPPA-Bildung in $\mu\text{g}/\text{kg}$ pro kGy in Abhängigkeit vom Gehalt des Precursors p-Tyr im jeweiligen Lebensmittel, Bestrahlung im gefrorenen Zustand

10 Diskussion

Bewertung der Bestrahlungsmarker o-Tyrosin und 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure

Die strahleninduzierte Bildung der Aminosäure-Radiolyseprodukte o-Tyrosin und 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure wurde in unterschiedlichen Lebensmitteln, bei verschiedenen Temperaturen während der Bestrahlung und bei verschiedenen Bestrahlungsdosen untersucht und ihre Eignung als Bestrahlungsmarker bewertet.

Die Untersuchungen zeigten, dass o-Tyr nur bei Bestrahlung bei Raumtemperatur proportional zu der Bestrahlungsdosis gebildet wurde. Dagegen wurde 3,4-HPPA sowohl bei Bestrahlung bei Raumtemperatur (KLEEBERG, 2002) als auch im gefrorenen Zustand in annähernd linearer Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis gebildet. Eine Korrelation zwischen dem 3,4-HPPA- und o-Tyr-Gehalt in den gefrorenen bestrahlten Lebensmitteln in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis ist in Abbildungen 36-39 für vier verschiedene Lebensmittel dargestellt. Während der 3,4-HPPA-Gehalt in allen Lebensmitteln mit zunehmender Dosis annähernd linear anstieg, war eine strahleninduzierte Bildung von o-Tyr erst ab einer Dosis von 9 kGy nachweisbar. In gefrorener bestrahlter Hühnerbrust konnte keine Bildung von o-Tyr nachgewiesen werden. Dabei lagen die o-Tyr-Gehalte in den gefrorenen bestrahlten Lebensmitteln im Durchschnitt etwa 2 – 40-fach höher als die 3,4-HPPA-Gehalte.

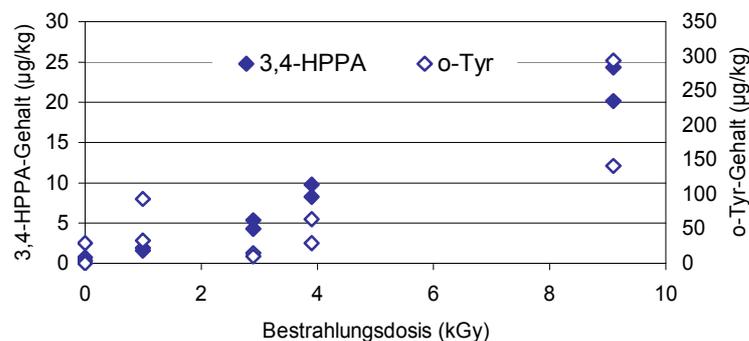


Abbildung 36: 3,4-HPPA- und o-Tyr-Gehalte in unbestrahlten und gefrorenen bestrahlten Nordseegarnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

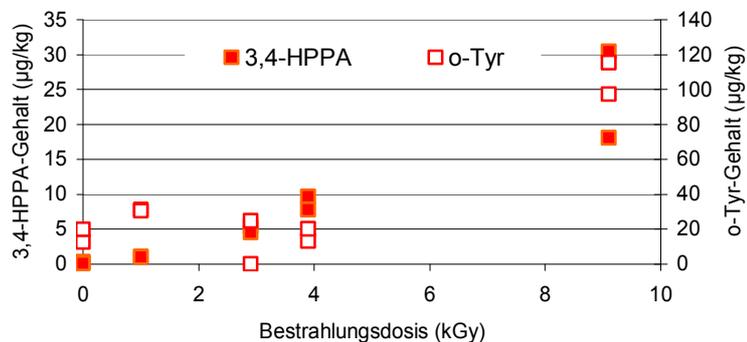


Abbildung 37: 3,4-HPPA- und o-Tyr-Gehalte in unbestrahlten und gefrorenen bestrahlten Black Tiger Garnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

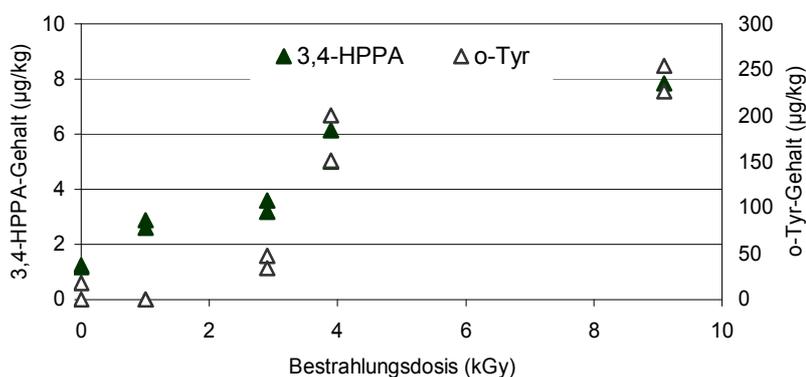


Abbildung 38: 3,4-HPPA- und o-Tyr-Gehalte in unbestrahlten und gefrorenen bestrahlten Tiefseegarnelen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

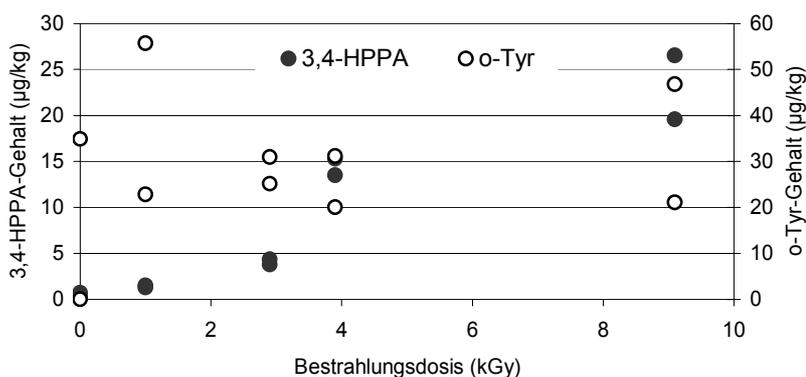


Abbildung 39: 3,4-HPPA- und o-Tyr-Gehalte in unbestrahlter und gefrorener bestrahlter Hühnerbrust in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Beide Bestrahlungsmarker wiesen generell unterschiedliche Bildungsraten aus ihren Precursoramino säuren auf (Mol Radiolyseprodukt/Mol Precursoramino säure). Bei o-Tyr zeigten sich bei allen gefrorenen bestrahlten Lebensmitteln höhere Bildungsraten. So wurde beispielsweise bei Nordseegarnelen eine Bildungsrate

für o-Tyr aus Phe von 1/5000 ermittelt. Im Vergleich dazu betrug die Bildungsrate für 3,4-HPPA aus p-Tyr 1/200 000. Die Bildungsrate für o-Tyr war also 40-fach höher als die von 3,4-HPPA. Bei Tiefseegarnelen war die Bildungsrate für o-Tyr annähernd 30-fach, in Hühnerbrust ungefähr 20-fach und in Black Tiger Garnelen etwa 10-fach höher. Die unterschiedlichen Gehalte an Radiolyseprodukte o-Tyr und 3,4-HPPA und somit auch die Bildungsraten in bestrahlten Lebensmitteln sind vermutlich auf die verschiedenen Mechanismen ihrer Bildung während der Bestrahlung zurückzuführen. Bei der Bestrahlung wässriger Lösungen von aromatischen Aminosäuren treten im Wesentlichen die Hydroxylierungsreaktionen am aromatischen Ring auf. o-Tyr wird aus der Aminosäure Phe durch Hydroxylierung gebildet. Dagegen wird die Bildung der 3,4-HPPA durch reduktive Desaminierung des p-Tyr erklärt (KLEEBERG, 2002, STADTMAN und BERLETT, 1991). Diese spielt bei aromatischen Aminosäuren eine untergeordnete Rolle (GETOFF, 1992, MASKOS et al., 1992, SOLAR et al., 1984, GARRISON, 1968), was durch die deutlich geringeren Bildungsraten für 3,4-HPPA im Vergleich zu o-Tyr bestätigt werden konnte. Im Wesentlichen kommt es zur Desaminierung durch die Reaktion des bei der Radiolyse des Wassers entstehenden solvatisierten Elektrons mit der Aminosäure.

Sowohl die radiolytische Bildung von o-Tyr als auch die von 3,4-HPPA ist von der Lebensmittelmatrix abhängig. Hierbei ist eine ähnliche Verteilung der Bildungsraten der beiden Bestrahlungsmarker in den einzelnen Lebensmitteln zu verzeichnen (siehe Abbildung 33 und 35). Eine Korrelation zwischen den beiden Bestrahlungsmarkern in gefrorenen bestrahlten Lebensmitteln ist in Abbildung 40 dargestellt. Jedes Lebensmittel weist eine unterschiedliche und spezifische Korrelation zwischen o-Tyr und 3,4-HPPA auf. Berechnet man die Ausgleichsgeraden für jedes Lebensmittel, dann ergibt die Steigung der Geraden das Verhältnis von o-Tyr zu 3,4-HPPA. Stark voneinander unterscheiden sich vor allem Tiefseegarnelen mit einem Verhältnis von o-Tyr zu 3,4-HPPA von 30:1 und Hühnerbrust mit einem Verhältnis von 2:1. In den Tiefseegarnelen waren viel höhere Gehalte an o-Tyr festzustellen und viel niedrigere Gehalte an 3,4-HPPA als in dem Hühnerfleisch. Ein ähnlicher Verlauf war bei Nordseegarnelen und Black Tiger Garnelen zu verzeichnen, die mit den o-Tyr- und 3,4-HPPA-Werten ungefähr dazwischen liegen. Dabei lag das Verhältnis von o-Tyr zu 3,4-HPPA

bei Nordseegarnelen bei 9:1. Bei Black Tiger Garnelen war es etwas weniger, nämlich 3:1.

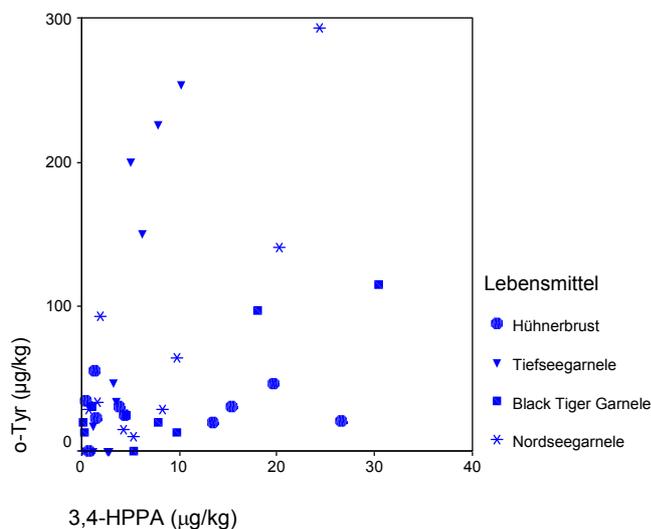


Abbildung 40: Korrelation zwischen den 3,4-HPPA- und o-Tyr-Gehalten in unbestrahlten und gefrorenen bestrahlten Lebensmitteln

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Bildung von o-Tyr stark von der Bestrahlungstemperatur abhängig ist. Dagegen konnte KLEEBERG (2002) nachweisen, dass 3,4-HPPA unabhängig von der Bestrahlungstemperatur gebildet wird. Der Einfluss der Temperatur während der Bestrahlung auf die radiolytische Bildung von o-Tyr wurde in diesem Umfang bis jetzt in wenigen Studien untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bestätigen die von CHUAQUI-OFFERMANS et al. (1993). Diese zeigten mit der Untersuchung von bestrahltem Hühnerfleisch bei unterschiedlichen Temperaturen, dass zwischen 0,4 °C und 20 °C keine Hemmung der Bildung von o-Tyr erfolgt. Sobald die Temperatur aber unter 0 °C sinkt, ist eine deutliche Hemmung der o-Tyr-Bildung festzustellen. Auch die Untersuchungen von KRAJNIK et al. (1995) haben gezeigt, dass bei der Bestrahlung von gefrorenen Phe-Lösungen kein o-Tyr entsteht. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse von 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. Wenn das tiefgefrorene Material auftaut, sind die freien Radikale in ihrer Mobilität nicht mehr behindert, und diese können miteinander oder mit anderen Substanzen reagieren (DIEHL, 1995). Die Reaktivität der freien Radikale (H, OH, e^-_{aq}), die während der Radiolyse von Wasser entstehen, ist vom Aggregatzustand und der

Temperatur abhängig. Der G-Wert des OH-Radikals sinkt mit der Temperaturenniedrigung stark ab. Dadurch lässt sich die Temperaturabhängigkeit der o-Tyr-Bildung erklären. Wenn die 3,4-HPPA-Bildung jedoch nur über die reduktive Desaminierung ablaufen würde, müsste sich eine Temperaturabhängigkeit der Bildungsrate zeigen, da der G-Wert des solvatisierten Elektrons ebenso wie der G-Wert des Hydroxylradikals bei Temperaturenniedrigung stark absinkt (siehe Tabelle 3). Daher ist es möglich, dass noch andere Reaktionsmechanismen zur Bildung von 3,4-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 (GARRISON, 1981, TAUB et al., 1978).

Die meisten Arbeitsgruppen haben o-Tyr als Marker zum Nachweis der Bestrahlung jedoch nur bei Raumtemperatur in proteinreichen Lebensmitteln (z.B. Garnelen, Geflügelprodukten, Eiprodukten) untersucht und angewendet (CHUAQUI-OFFERMANS und MCDUGALL, 1991, MEIER et al., 1993, MISCHKE et al., 1993, KRACH et al., 1997, HEIN et al., 2000). Laut eigenen Untersuchungen wäre der Einsatz von o-Tyr als Bestrahlungsmarker demnach für alle untersuchten Lebensmittel bei einer Bestrahlung bei RT möglich. Handelsüblich wird aber die Bestrahlung von proteinreichen Lebensmitteln nicht bei RT durchgeführt, da es zu einer erheblichen Beeinträchtigung der sensorischen Qualität (Geschmack und Aroma) der Lebensmittel kommen kann. Proteinreiche Lebensmittel wie Fleisch sollten daher meistens im gefrorenen Zustand bei $-30^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ bestrahlt werden (GARRISON, 1981). Allerdings werden bei niedrigen Temperaturen höhere Bestrahlungsdosen benötigt, um den gleichen bioziden Effekt zu erreichen. KLEEBERG (2002) konnte jedoch zeigen, dass auch bei gefrorenen bestrahlten Nordseegarnelen schon bei geringen Bestrahlungsdosen deutlich sensorische Veränderungen auftreten, die die Verbraucherakzeptanz negativ beeinflussen können.

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 3,4-HPPA-Gehaltes bis zu einer Bestrahlungsdosis von 10 kGy festgestellt werden. Dagegen kam es zu einer o-Tyr-Bildung erst bei höheren Bestrahlungsdosen von 9 kGy oder gar nicht. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit

zeigen, ist ein Nachweis der erfolgten Bestrahlung über o-Tyr bei gefrorenen proteinreichen Lebensmitteln nicht möglich. Dagegen ist die 3,4-HPPA als Bestrahlungsmarker für proteinreiche Lebensmittel ab einer Bestrahlungsdosis von 3 kGy geeignet. Dabei ist der Einflussfaktor der Lebensmittelmatrix zu beachten.

11 Zusammenfassung - Summary

11.1 Zusammenfassung

Lebensmittel können zur Konservierung mit γ -Strahlen behandelt werden. Dieses Verfahren ist weltweit in 41 Ländern erlaubt und wird in 26 Staaten auch kommerziell genutzt. Garnelen und Hühnerfleisch als leicht verderbliche Lebensmittel dürfen mit Dosen von 3 kGy bis zu 7 kGy bestrahlt werden. In Deutschland dürfen bestrahlte Lebensmittel nicht in den Verkehr gebracht werden, einzig für Trockengewürze ist die Bestrahlung zugelassen. Zur Einhaltung der rechtlichen Regelungen und zur Kontrolle der Lebensmittelbestrahlung sind zahlreiche Nachweismethoden für eine erfolgte Bestrahlung entwickelt worden. Bis heute gibt es jedoch keine etablierte Methode für proteinreiche und gleichzeitig fettarme Lebensmittel (z.B. Garnelen, Hühnerbrust). Eine Möglichkeit zum Nachweis für eine erfolgte Bestrahlung in proteinreichen Lebensmitteln bietet die Untersuchung strahleninduzierter Veränderungen an den aromatischen Aminosäuren. Die Eignung der Aminosäure-Radiolyseprodukte *o*-Tyrosin oder 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure als Bestrahlungsmarker wurde untersucht.

Es wurde ein Verfahren zum Nachweis der γ -Bestrahlung in Garnelen und Hühnerbrust über *o*-Tyr entwickelt und validiert. *o*-Tyr wurde aus dem homogenisierten Probenmaterial mit Perchlorsäure extrahiert und der Extrakt wurde mittels C18-SPE gereinigt. Die Analyse erfolgte mittels HPLC und FL-Detektion. Die Methode ergab eine WFR für *o*-Tyr von 97%. Zur Quantifizierung wurde α -Methyl-*p*-Tyr als interner Standard verwendet. Die Zuverlässigkeit des Verfahrens wurde mittels HPLC/MSD überprüft.

Um die Eignung des *o*-Tyr für die Identifizierung der bestrahlten proteinreichen Lebensmittel zu überprüfen, wurden die Einflussfaktoren auf die radiolytische Bildung von *o*-Tyr, wie Bestrahlungsbedingungen (Dosis, Temperatur, Dosisleistung), biologische Variabilität (Lebensmittelmatrix, Hintergrundgehalte in unbestrahlten Proben, Gehalt des Precursors Phenylalanin, Gehalt an *p*-Tyrosin) und Verarbeitung der Lebensmittel vor der Bestrahlung (Glasierung) untersucht. Die Untersuchungen zeigten, dass die Temperatur während der Bestrahlung einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung von *o*-Tyr hat. Während der *o*-Tyr-Gehalt in den bei

Raumtemperatur bestrahlten Lebensmitteln mit der Bestrahlungsdosis proportional anstieg, bildete sich in den gefrorenen bestrahlten Lebensmitteln o-Tyr erst bei höheren Bestrahlungsdosen oder gar nicht. Die Dosisleistung oder Glasierung hatte dagegen keinen Einfluss auf die Bildung von o-Tyr. Die biologische Variabilität ist bei der Bildung von o-Tyr auch von Bedeutung. Bei allen untersuchten Lebensmitteln waren matrixabhängige Unterschiede festzustellen. In den Lebensmitteln wurden signifikant unterschiedliche Phe- und p-Tyr-Gehalte festgestellt. Trotz der biologischen Variabilität konnten in unbestrahlten Lebensmitteln ähnliche o-Tyr Hintergrundgehalte nachgewiesen werden. Zwischen der strahleninduzierten Bildung von o-Tyr und dem Gehalt an Phe in Lebensmitteln konnte kein Zusammenhang ermittelt werden. Bei allen untersuchten Lebensmitteln war eine Bestrahlung im nicht gefrorenen Zustand durch den o-Tyr-Gehalt nachweisbar (o-Tyr-Gehalt > 50 µg/kg, ab einer Bestrahlungsdosis von 1 kGy). Ein Einsatz von o-Tyr als Bestrahlungsmarker ist demnach für gefrorene bestrahlte Garnelen und Hühnerfleisch nicht möglich.

Als ein weiterer Bestrahlungsmarker wurde 3,4-HPPA untersucht. Eine einfache und schnelle Methode zur Bestimmung von 3,4-HPPA in Garnelen und Hühnerbrust wurde entwickelt, optimiert und validiert. Zur Isolierung der 3,4-HPPA wurde nach Proteinfällung mit Perchlorsäure und MeOH eine zweistufige SPE an einer C18-Phase mit nachfolgendem Anionenaustausch an einer SAX-Phase durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels HPLC und FL-Detektion. Die Methode ergab eine WFR für 3,4-HPPA 77%. Mit Hilfe des internen Standards der 3,3-HPPA konnte die WFR auf 107±11% verbessert werden.

Die 3,4-HPPA-Gehalte in gefrorenen bestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen und Hühnerfleisch stiegen mit der Bestrahlungsdosis an. Obwohl in allen Proben geringe Blindwerte gemessen werden konnten, waren signifikante Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben ab einer Dosis von 3 kGy feststellbar. In den Tiefseegarnelen waren die strahleninduzierten 3,4-HPPA-Gehalte geringer, wodurch sich ein signifikanter Unterschied erst ab der Bestrahlungsdosis von 7 kGy ergab. 3,4-HPPA eignet sich daher als Bestrahlungsmarker für Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen und Hühnerfleisch. Zwischen der strahleninduzierten Bildung von 3,4-HPPA und dem Gehalt an p-Tyr

in Lebensmitteln konnte kein Zusammenhang ermittelt werden. Da 3,4-HPPA im Vergleich zu o-Tyr unabhängig von der Bestrahlungstemperatur gebildet wird, ist ein Bestrahlungsnachweis auch bei gefrorenen bestrahlten Lebensmitteln möglich. Dabei ist der Einfluss der biologischen Variabilität der verschiedenen Lebensmittel zu beachten.

11.2 Summary

Food irradiation is in use in 41 countries to prevent food from bacterial spoilage and pathogenic germs. For example the highly perishable shrimps and chicken meat can be irradiated up to the doses of 3 kGy to 7 kGy. In Germany the trade of radiation preserved food is prohibited with one exception. Herbs and spices can be irradiated to a maximum dose of 10 kGy. To meet the official food surveillance demands, reliable detection methods for irradiated food have been developed. Although numerous methods have been published, none of them has been validated for protein-rich and low-fat food as shrimp or chicken meat. To distinguish irradiated food from non-irradiated food the radiation induced amino acid changes have to be analyzed. The determination of the radiolysis products o-Tyr and 3,4-HPPA could be a possible way to distinguish irradiated food from non-irradiated.

The HPLC method for qualitative and quantitative determination of non-protein bound o-Tyr in the three different types of shrimps (brown shrimps, black tiger shrimps, deep sea shrimps) and chicken meat has been developed and validated. For this purpose the o-Tyr was extracted from non-irradiated as well as irradiated samples with perchloric acid, purified on a SPE C18-cartridge and then separated isocratically on an RP-C18 column and detected by FLD (275/305 nm). The quantification of o-Tyr was based on the use of α -methyl-p-Tyr as internal standard. The recovery rate of o-Tyr was 97%. The reliability of the results was verified by an HPLC/MS Method.

To check the suitability of o-Tyr for the identification of irradiated protein-rich food, the influence factors on the radiolytic formation of o-Tyr as conditions of radiation (dose, temperature, rate), biological variability (food matrix, o-Tyr-backgroundlevel, content of Phe and p-Tyr) and processing of food (glaze cover) were investigated. The formation of o-Tyr was dependent on irradiation

temperature, dose and food matrix. Whereas the content of o-Tyr increased linearly with dose at ambient temperature irradiated food, there was mostly no formation of o-Tyr in the frozen irradiated samples. In comparison dose rate or glaze cover has no influence on the formation of o-Tyr. The irradiation-induced formation of o-Tyr was also independent from Phe content. Between foods there were significant differences in the Phe- and p-Tyr contents. In all non-irradiated samples the similar o-Tyr-backgroundlevel was found. Significant differences to non-irradiated samples were obtained for samples irradiated at room temperature from doses of 1 kGy (o-Tyr content > 50 µg/kg). The use of o-Tyr as a radiation marker for irradiated frozen samples was not possible.

As a second radiation marker 3,4-HPPA was investigated. The HPLC method for qualitative and quantitative determination of 3,4-HPPA in the three different types of shrimps (brown shrimps, black tiger shrimps, deep sea shrimps) and in chicken meat has been developed and validated. For this purpose the 3,4-HPPA was extracted from non-irradiated as well as irradiated samples with perchloric acid and methanol, purified on a SPE C18-cartridge followed by anion-exchange on a SAX-cartridge and then separated isocratically on an RP-C18 column and detected by FLD (276/310 nm). The quantification of 3,4-HPPA was based on the use of 3,3-HPPA as internal standard. The recovery rate of 3,4-HPPA was $107 \pm 11\%$.

The content of 3,4-HPPA increased linearly with dose and was independent from irradiation temperature. The irradiation-induced formation of 3,4-HPPA was also independent from the p-Tyr content, but it was dependent on food matrix. Significant differences to non-irradiated samples were obtained for brown shrimps, black tiger shrimps and chicken meat irradiated at frozen state from doses of 3 kGy. 3,4-HPPA contents in deep sea shrimps were much lower, hence significant differences were only obtained for higher irradiation dose of 7 kGy. Therefore 3,4-HPPA represents an appropriate marker for detection of frozen irradiated brown shrimps, black tiger shrimps and chicken meat.

12 Literatur

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

BAKER, G. B., YERAGANI, V. K., DEWHURST, W. G., COUTTS, R. T., MACDONALD, R. N., WONG, T. F. J.: Simultaneous Analysis of Urinary 3- and 4-Hydroxyphenylacetic Acid, Homovanillic [4-Hydroxy-3-Methoxyphenylacetic] Acid and 5-Hydroxyindol-3-Ylacetic Acid Using Electron-Capture Gas Chromatography, *Biochem. Arch.*, 3(2), 257-264 (1987).

BARTOLOME, B., ESTRELLA, I., HERNANDEZ, T.: Changes in Phenolic Compounds in Lentils (*Lens culinaris*) During Germination and Fermentation, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 205, 290-294 (1997).

BERNWIESER, I., SONTAG, G.: Identification of Irradiated Chicken Meat, Determination of o- and m-Tyrosine by HPLC with an Electrode Array Detector, *Ernährung*, 19, 159-162 (1995).

BGVV: L 12.01.02-2 In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Beuth Verlag GmbH, Berlin (1998).

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

BLOUNT, B. C., DUNCAN, M. W.: Trace Quantification of the Oxidative Damage Products, m- and o-Tyrosine, in Biological Samples by Gas Chromatography - Electron Capture Negative Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Biochem.*, 244 (2), 270-276 (1997).

BÖGL, K. W., SCHREIBER, G. A.: Identification of Irradiated Foods, *Proceedings Euro Food Chem Vlij*, 154-157, Vienna (1995).

BOLLAG, D. M., EDELSTEIN, S. J.: Protein Methods, A John Wiley & Sons, Inc. Publication, New York (1991).

CARTEL, N. J.: Purification of Human Brain Metallothionein by Organic and RP-HPLC under Acidic Conditions, *J. Chromatogr. B*, 676, 150-164 (1996).

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

CHUAQUI-OFFERMANN, N., McDOUGALL, T.: Background Levels and Radiation Dose Yield of o-Tyrosine in Chicken Meat, *J. Food Prot.*, 54, 935-938 (1991b).

CHUAQUI-OFFERMANN, N., McDOUGALL, T., GUERRERO, A. M.: Validation of o-Tyrosine as a Marker for Detection and Dosimetry of Irradiated Chicken Meat, *J. Food Prot.*, 56, 47-50 (1993).

CLAYBROOK, D. L.: Nitrogen Metabolism in: BLISS, D. E.: The Biology of Crustacean, 163-213, Academic Press, New York (1983).

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION: Codex General Standard for Irradiated Foods and Recommended International Code of Practice for the Operation of Radiation Facilities Used for the Treatments of Foods, Food and Agriculture Organization of the United Nations (1984).

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

DEUTSCHE SEE GROSSVERBRAUCHER-SERVICE: Fachberater 3 - Krebs und Weichtiere, Band 3, Bremerhaven (1994).

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

DODD, N. J. F., SWALLOW, A. J., LEY, F. J.: Use of ESR to Identify Irradiated Food, *Radiat. Phys. Chem.*, 26, 451-453 (1985).

DODD, N. J. F.: Free Radicals and Food Irradiation, *Biochem. Soc. Symp.*, 247 (1995).

DRAGNIC, I. G., DRAGNIC, Z. O.: The Radiation Chemistry of Water, Academic Press, New York (1963).

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.htm> (1998).

EIJIRO, K., MASAOKI, K., YOSUKE, O.: Fluorimetric Determination of Tryptophan in Human Serum Using Phenylglyoxal, *Anal. Sci.*, 9, 25-27 (1993).

EU RICHTLINIE 1999/2/3/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENT UND DES RATES
<http://www.dainet.de/bfe/deutsch/themlist.htm>, (1999).

FURUTA, M., DOHMARU, T., KATAYAMA, T., TORATANI, H., TAKEDA, A.: Detection of Irradiated Frozen Deboned Seafood with the Level of Radiolytic H₂ and CO Gases as a Probe, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3928 (1997).

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).

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).

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

GLIDEWELL, S. M., DEIGHTON, N., GOODMAN, B. A., HILLMAN, J. R.: Detection of Irradiated Food: A Review, *J. Sci. Food Agric.*, 61, 281 (1993).

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

GROSSI, G. G.: Full Automation of Catecholamine Metabolite Determination by Column Switching and High Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, 465, 113-119 (1989).

GUTSCHMIDT, J.: Das Kühlen und Gefrieren von Lebensmitteln im Haushalt und Gemeinschaftsanlagen, DLG-Verlag, Frankfurt am Main (1964).

HAIRE, D. L., CHEN, G., JANZEN, E. G., FRAZER L., LYNCH, J. A.: Identification of Irradiated Foodstuffs: A Review of the Recent Literature, *Food Res. Int.*, 30, 249 (1997).

HART, R. J., WHITE, J. A., REID, W. J.: Technical Note: Occurrence of o-Tyrosine in Non-irradiated Foods, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 23, 643 (1988).

HEIDE, L., GUGGENBERGER, R., BÖGL, K. W.: Application of Thermoluminescence Measurements to Detect Irradiated Strawberries, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 2160-2163 (1990).

HEIN, W., SIMAT, T., STEINHART, H.: 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., KNOPFE, C., MISCHKE, J., GEBHARDT, G., BÖGEL, K. W., SCHREIBER, G. A.: ESR- und HPLC-Untersuchungen zum Nachweis der γ -Bestrahlung bei Eiern, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 197, 440-443 (1993).

HELLE, N., BALLIN, U., ETZEL, V., KRUSE, R.: Etablierung analytischer Methoden zur Identifizierung bestrahlter Fische und Krebstiere, *Arch. Für Lebensm. Hyg.*, 47, 13-21 (1996).

HERRMANN, K.: Tiefgefrorene Lebensmittel, Verlag Paul Parey, Berlin (1970).

HOEY, B. M., BUTLER, J.: The Repair of Oxidized Amino Acids by Antioxidants, *Biochim. Biophys. Acta*, 791, 212-218 (1984).

HOUEE-LEVIN, C.: Radiolysis of Proteins, *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 91, 1107 (1994).

HUONG, D. T., YANG, W. J., OKUNO, A., WILDER M. N.: Changes in Free Amino Acids in the Hemolymph of Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* Exposed to Varying Salinities: Relationship to Osmoregulatory Ability, *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 128 (2), 317-326 (2001).

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

IBE, F. I., GRINTER, R., MASSEY, R., HOMER, R.: Detection of o-Tyrosine in Irradiated Chicken by Reverse-Phase HPLC and Fluorescence Detection, *Food Addit. Contam.*, 8 (6), 787-792 (1991).

ISHIMITSU, S., FUJIMOTO, S., OHARA, A.: HPLC Determination of m- and o-Tyrosine in Rat Urine, *J. Chromatogr.*, 489, 377-383 (1989).

ISHIMITSU, S., FUJIMOTO, S., OHARA, A.: Determination of m-Tyrosine in Human Serum by HPLC with Fluorimetric Detection, *J. Chromatogr.*, 378, 222-225 (1986).

KARAM, L. R., SIMIC, M. G.: Detecting Irradiated Foods: Use of Hydroxyl Radical Biomarkers, *Anal. Chem.*, 60, 1117 (1988).

KARAM, L. R., SIMIC, M. G.: Mechanisms of Free Radical Chemistry and Biochemistry of Benzene, *Environ. Health Perspec.*, 82, 37 (1989).

KLEEBOERG, K. K.: Identifizierung von Aminosäure-Radiolyseprodukten und sensorische Veränderung in γ -bestrahlten Nordseegarnelen (*Crangon crangon*) und anderen eiweißreichen Lebensmitteln, Dissertation Universität Hamburg (2002).

KRACH, C., SONTAG, G., SOLAR, S., GETOFF, N.: Determination of o- and m-Tyrosine for Identification of Irradiated Shrimps, *Food Res. Tech.*, 204 (6), 417-419 (1997).

KRACH, C., SONTAG, G.: An Improved Method for Identification of Irradiated Chicken Meat, *Ernährung*, 21, 311-313 (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.*, 50a, 864 (1995).

LEEUWENBURGH, C., WAGNER, P., HOLLOSZY, J. O., SOHAL, R. S., HEINECKE, J. W.: Caloric Restriction Attenuates Dityrosine Cross-Linking of Cardiac and Skeletal Muscle Proteins in Aging Mice, *Arch. Biochem. Biophys.*, 346 (1), 74-80 (1997a).

LEEUWENBURGH, C., RASMUSSEN, J. E., HSU, F. F., MUELLER, D. M., HEINECKE, J. W.: MS Quantification of Markers for Protein Oxidation by Tyrosyl Radical, Copper, and Hydroxyl Radical in Low Density Lipoprotein Isolated From Human Atherosclerotic Plaques, *J. Biol. Chem.*, 272 (6), 3520-3526 (1997b).

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 (1992).

MEIER, W., BÜRGIN, R., FRÖHLICH, D.: Nachweis von bestrahltem Frischfleisch (Poulet) mittels o-Tyrosin, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 80, 22-29 (1989).

MEIER, W., HEDIGER, H., ARTHO, A., MEIER, E. J. M.: Determination of o-Tyrosine in Shrimps, Fish, Mussels and Egg-White, *SozEp-Heft*, 16, 88-93 (1993).

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).

MISCHKE, J., VÖHRINGER, M., HELLE, N., BÖGL, K. W., SCHREIBER, G. A.: Determination of o-Tyrosine in Irradiated Protein Containing Foods by HPLC, *SozEp-Heft*, 16, 94-98 (1993).

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

RICHARDS, M. P., BEATTIE, J. H.: Comparison of Different Techniques for the Analysis of Metallothionein Isoforms by Capillary Electrophoresis, *J. Chromatogr. B*, 669, 27-37 (1995).

RUDNEVA, I. I.: Antioxidant System of Black Sea Animals in Early Development, *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 122 (2), 265-271 (1999).

SCHREIBER, G. A., HELLE, N., BÖGL, K. W.: Detection of Irradiate Foods-Methods and Routine Application, *Internat. J. Radiat. Biol.*, 63, 105 (1993).

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).

SIPPEL, CH.: Entwicklung einer Clean-up Methode zur Bestimmung von Radiolyseprodukten des Tryptophans in Nordseegarnelen, Diplomarbeit Universität Hamburg (1998).

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, S. W., FACHMANN, W., KRAUT, H.: Die Zusammensetzung der Lebensmittel - Nährwert-Tabellen, 5. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1994).

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

STEVENSON, M. H.: Identification of Irradiated Foods, *Food Technol.*, 48, 141 (1994).

STEVENSON, M. H., STEWART, E. M.: Identification of Irradiated Food: The Current Status, *Radiat. Phys. Chem.*, 46, 653 (1995).

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).

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*, 1, 371-383, Vienna (1978).

TEMESI, D., LAW, B.: The Effect of LC Eluent Composition on MS Response using Electro spray Ionization, *LC-GC International*, 175-180 (1999).

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

ULRICH, K.: Vergleichende Biochemie der Tiere, G. Fischer, Stuttgart (1990).

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

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

WANG, D., VON SONNTAG, C.: Radiation Induced Oxidation of Phenylalanine, *Comm. Eur. Com. (Rep.) EUR 13331*, 207 (1991).

WANG, D., SCHUHMANN, H. P., VON SONNTAG, C.: Phenylalanine: Its OH⁻ and SO₄⁻ - Induced Oxidation and Decarboxylation. A Pulse Radiolysis and Product Analysis Study, *Z. Naturforsch.*, 48b, 761 (1993).

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

WHO: Wholesomeness of Irradiated Food, Report on a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee, *WHO Techn. Rep. Ser.*, 659, World Health Organization, Geneva (1981).

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

WHO: Food and Environmental Protection Newsletter, Supplement, 1 (1998).

YAMASHITA, K., OHTSUKA, N., KAGAWA, S., MATSUOKA, A.: Serotonin and 5-Hydroxyindole-3-Acetic Acid in Human Plasma and Rat Brain Determined by HPLC/FLD, *Clin. Chem.*, 39 (11), 2355-2356 (1993).

ZOLLER, O., SCHÖNI, D., ZIMMERLI, B.: Determination of o- and m-Tyrosine in Chicken Meat, *Comm. Eur. Com. (Rep.) EUR 14315*, 241-249 (1993).

13 Anhang

13.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Gefahren-Symbol	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	Promonta	F	11	9-16-23.2-33
Acetonitril gradient grade	Fluka	F,T	11-23/24/25	16-27-45
Ameisensäure 98%	Merck	C	35	23.2-26-45
Ammoniak 25%	Merck	C	36/37/38	2-26
Ammoniumsulfat	Merck	-	-	-
Dichlormethan	Merck	Xn	40	36/37-45
Diethylether	Merck	F+, R	12-19-22-66-67	9-16-29-33
Essigsäure 100%	Merck	C	10-35	2-23.2-96
Ethylacetat	Merck	F	11	16-23-29-33
3-(2-Hydroxyphenyl)-propionsäure	Lancaster	Xi	36/37/38	26-36
3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure	Lancaster	Xi	36/37/38	26-36
3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure	Lancaster	Xi	36/37/38	26-36
Methanol destilliert	Merck	F,T	11-23/25	7-16-24-25
3-(4-Methoxyphenyl)-propionsäure	Lancaster	-	-	22-24/25
N,N-Dimethylformamid	Merck	T	61-20/21-36	53-45
Natriumhydroxid	Merck	C	35	26-36/37/39-45
Perchlorsäure 60%	Merck	C,O	5-8-35	23.2-26-36/37/39-45
Phenylalanin, L-	Degussa	-	-	-
Salzsäure 37%	Merck	C	34-37	26-36/37/39-45
Stickstoff	Linde	-	-	-
Trichloressigsäure 100%	Merck	C	35	24/25-26-45
Trifluoressigsäure Uvasol 100%	Merck	C	20-35	9-26-27-28.1-45
L-m-Tyrosin	Sigma	Xn	-	-
L-o-Tyrosin	Sigma	-	-	-
L-p-Tyrosin	Sigma	-	-	-
α -Methyl-DL-p-Tyrosin	Sigma	-	-	-
Zinksulfat	Merck	-	36	24

Soweit nicht anders angegeben, wurden analysenreine Chemikalien und entmineralisiertes Wasser verwendet.

13.2 Geräte

13.2.1 HPLC/FLD Anlage

Pumpe:	Merck-Hitachi, L-6200 A Intelligent Pump
Probenaufgabe:	Merck-Hitachi L-655 A Auto Sampler
Detektor:	Merck-Hitachi F-1080 Fluoreszenz Detektor
Säulenthermostat:	LKB Bromma 2155
Degasser:	Uniflows Degasys DG-1310
Auswertesystem:	Bio-Tek Kontron Instruments, Kroma System 2000, Version 8.1

13.2.2 HPLC/FLD/MSD Anlage

Pumpe:	HP 1100 Series G 1312 A
Probenaufgabe:	HP 1100 Series G 1313 A
Detektor:	HP 1100 Series G 1314 A UV Detektor HP 1100 Series G 1321 A FL Detektor HP 1100 Series G 1946 A MS Detektor
Säulenthermostat:	HP 100 Series G 1316 A
Degasser:	HP 1100 Series G 1322 A
Auswertesystem:	HP HPLC/MS ChemStation, Version A.06.01

13.2.3 Weitere Geräte

Spektralfluorometer:	SFM 25, Bio-Tek Kontron Instruments
Zentrifuge:	Sigma 3 K 12
SPE-Box:	Supelco, Visiprep DL
Ultraturrax:	IKA-Labortechnik, T25
pH-Meter:	WTW, pH DIGI 520

13.3 HPLC-Bedingungen

13.3.1 Bestimmung von o-Tyrosin, p-Tyrosin und Phenylalanin mittels HPLC/FLD

Stationäre Phase: Multospher AQ 120-5 C18, 250 × 4 mm
mit Vorsäule Multospher AQ 120-5 C18, 20 × 4 mm

Mobile Phase: Eluent A: NH₄formiat 0,005mol/L (pH 4)
Eluent B: MeCN

Min	A (%)	B (%)
0	100	0
17	100	0
19	30	70
29	30	70
33	100	0
50	100	0

Säulentemperatur: 35 °C

Flussrate: 0,9 mL/min

Injektionsvolumen: 20 µL

Detektion: Merck-Hitachi F-1080 FL-Detektor, Ex/Em = 275/310 nm (o-Tyr)
und Ex/Em = 258/288 nm (p-Tyr, Phe)

13.3.2 Bestimmung von o-Tyrosin mittels HPLC/MSD

Stationäre Phase: Multospher AQ 120-5 C18, 250 × 4 mm
mit Vorsäule Multospher AQ 120-5 C18, 20 × 4 mm

Mobile Phase: Eluent A: NH₄formiat 0,005mol/L (pH 3)
Eluent B: MeCN

Min	A (%)	B (%)
0	95	5
13	95	5
15	30	70
25	30	70
27	95	5
50	95	5

Säulentemperatur: 35 °C

Flussrate: 0,9 mL/min

Injektionsvolumen: 20 µL

Detektion: HP 1100 Series G 1946 A MS-Detektor

Tabelle 9: Parameter für die massenselektive Detektion

Parameter	Bestimmung von o-Tyr
Ionenquelle	AP-ESI
Polarität	Positiv
Dry Gas Flow	12 L/min
Nebulizer Pressure	50 psig
Dry Gas Temperatur	350 °C
Capillary Voltage	4000 V
Fragmentorspannung	70 V
Ionenspuren	Scan: m/z 100 – m/z 210 SIM: Identifizierung über Fragmentionen m/z 136, 165, 182

13.3.3 Bestimmung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure mittels HPLC/FLD

Stationäre Phase: Multospher RP 100-5 C18, 250 × 4 mm

mit Vorsäule Multospher RP 100-5 C18, 20 × 4 mm

Mobile Phase: Eluent A: NH₄formiat 0,005mol/L (pH 3,5)

Eluent B: MeCN

Min	A (%)	B (%)
0	87	13
25	87	13
26	30	70
35	30	70
36	87	13
55	87	13

Säulentemperatur: 30 °C

Flussrate: 0,9 mL/min

Injektionsvolumen: 100 µL

Detektion: HP 1100 Series G 1321 A FL-Detektor, Ex/Em = 276/310 nm

13.4 Kalibriergeraden und Verfahrenskenndaten

Grundkalibrierung für o-Tyr

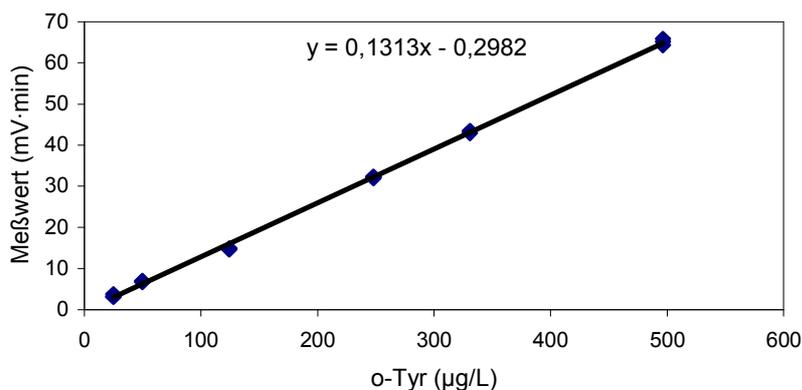


Abbildung 41: Grundkalibriergerade für o-Tyr

Grundkalibrierung für α-Methyl-p-Tyr

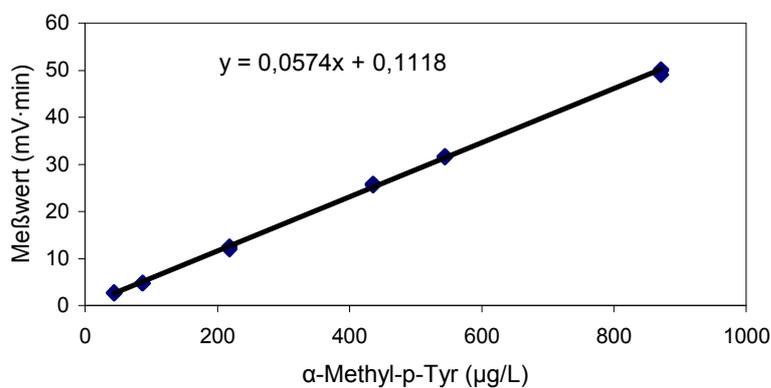


Abbildung 42: Grundkalibriergerade für α-Methyl-p-Tyr

Tabelle 10: Verfahrenskenndaten der Grundkalibrierung für o-Tyr und α-Methyl-p-Tyr

Verfahrenskenndaten	o-Tyr	α-Methyl-p-Tyr
Achsenabschnitt a (mV·min)	-0,2982	0,1118
Steigung b ((mV·min)/(µg/L))	0,1313	0,0574
Korrelationskoeffizient r	0,9991	0,9993
Reststandardabweichung der Geraden s_{gr} (mV·min)	0,70	0,47
Verfahrensstandardabweichung s_x (µg/L)	5	8
Verfahrensvariationskoeffizient CV_x (%)	2,5	2,2
NWG (3-faches Grundrauschen) (µg/L)	12,43	n.b.

Grundkalibrierung für Phe

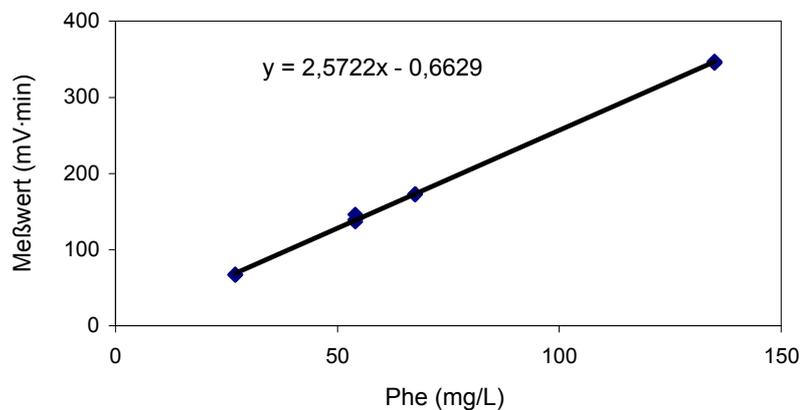


Abbildung 43: Grundkalibriergerade für Phe

Grundkalibrierung für p-Tyr

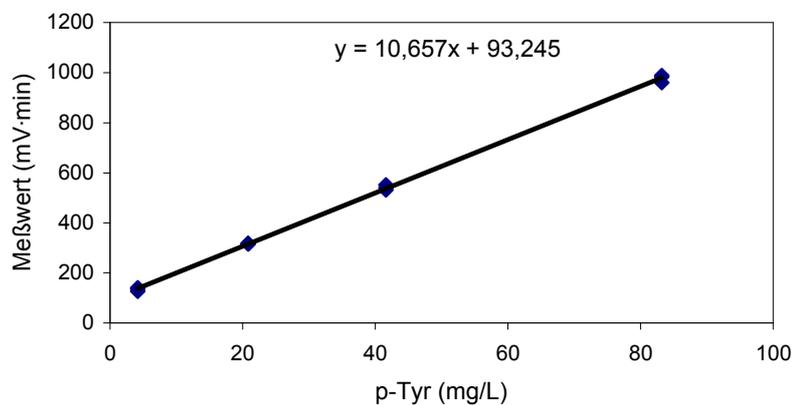


Abbildung 44: Grundkalibriergerade für p-Tyr

Tabelle 11: Verfahrenskenndaten der Grundkalibrierung für Phe und p-Tyr

Verfahrenskenndaten	Phe	p-Tyr
Achsenabschnitt a (mV·min)	-0,6629	93,2450
Steigung b ((mV·min)/(mg/L))	2,5722	10,6570
Korrelationskoeffizient r	0,9993	0,9992
Reststandardabweichung der Geraden s_{gr} (mV·min)	2,940	9,694
Verfahrensstandardabweichung s_x (mg/L)	1,143	0,910
Verfahrensvariationskoeffizient CV_x (%)	1,61	2,43

Matrixkalibrierung für o-Tyr

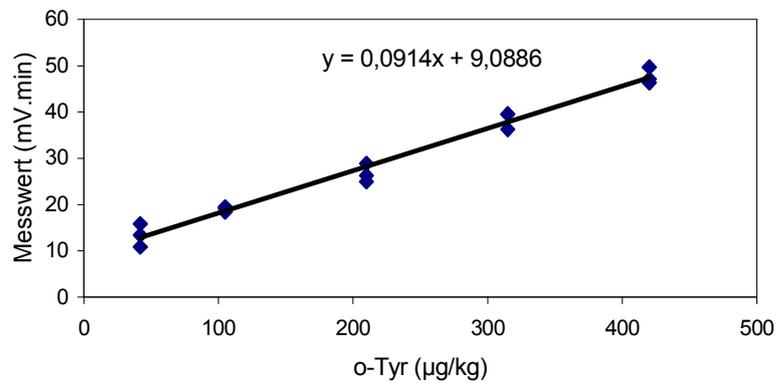


Abbildung 45: Matrixkalibrierung aus Nordseegarnelen für o-Tyr

Wiederfindungsfunktion für o-Tyr

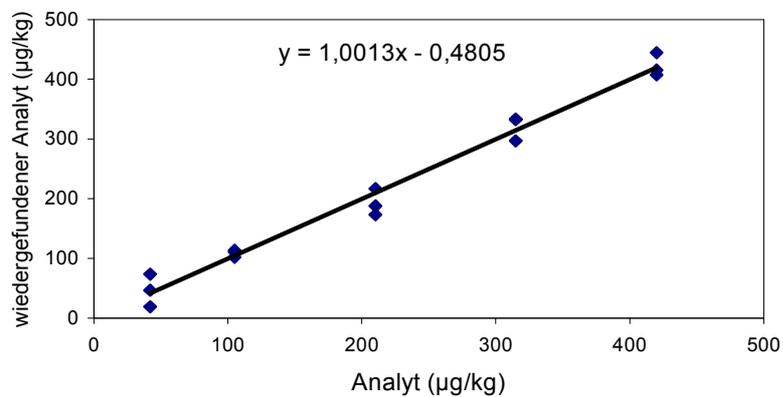


Abbildung 46: Kalibriergerade der Wiederfindungsfunktion für o-Tyr in Nordseegarnelen

Wiederfindungsfunktion für o-Tyr mit Berücksichtigung von IS

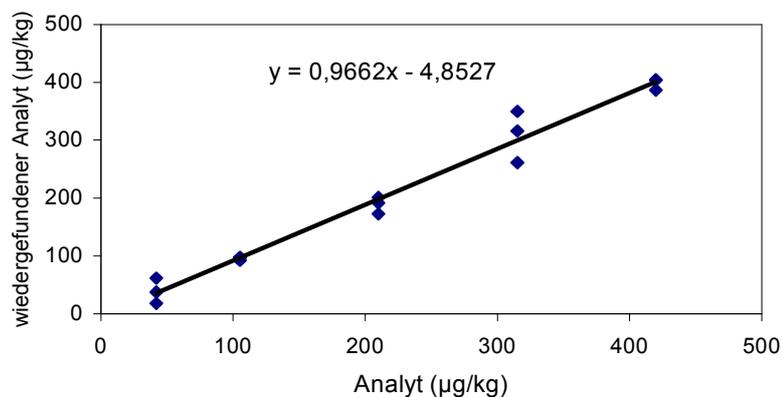


Abbildung 47: Kalibriergerade der Wiederfindungsfunktion für o-Tyr in Nordseegarnelen mit Berücksichtigung von IS

Tabelle 12: Verfahrenskennndaten der Matrixkalibrierung und der Wiederfindungsfunktion für o-Tyr in Nordseegarnelen ohne und mit Berücksichtigung des IS

Verfahrenskennndaten	Matrixkalibrierung	Wiederfindungs- funktion ohne IS	Wiederfindungs- funktion mit IS
Achsenabschnitt a (mV·min)	9,0886	-0,4805	-4,8527
Steigung b ((mV·min)/(µg/kg))	0,0914	1,0013	0,9662
Korrelationskoeffizient r	0,9816	0,9817	0,9771
Reststandardabweichung der Geraden s_{gr} (mV·min)	1,8406	20,1654	21,7713
Verfahrensstandardabweichung s_x (µg/kg)	20,137	20,139	22,533
Verfahrensvariationskoeffizient CV_x (%)	9,22	9,22	10,32
NWG (3-faches Grundrauschen) (µg/kg)	31,00	-	-

Matrixkalibrierung für Phe

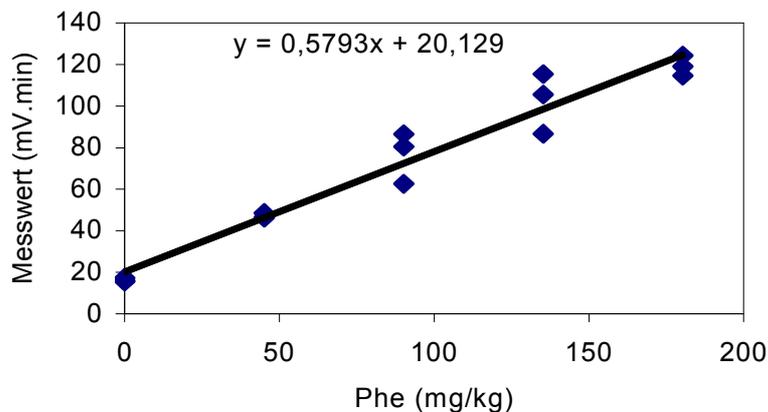


Abbildung 48: Matrixkalibriergerade aus Tiefseegarnelen für Phe

Wiederfindungsfunktion für Phe

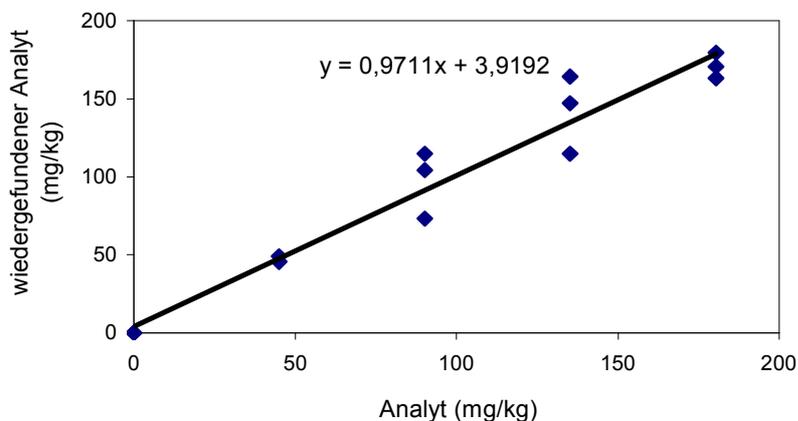


Abbildung 49: Kalibriergerade der Wiederfindungsfunktion für Phe in Tiefseegarnelen

Tabelle 13: Verfahrenskenndaten der Matrixkalibrierung und der Wiederfindungsfunktion für Phe in Tiefseegarnelen

Verfahrenskenndaten	Matrixkalibrierung	Wiederfindungsfunktion
Achsenabschnitt a (mV·min)	20,129	3,9192
Steigung b ((mV·min)/(mg/kg))	0,5793	0,9711
Korrelationskoeffizient r	0,9528	0,9534
Reststandardabweichung der Geraden s_{gr} (mV·min)	8,8301	14,6982
Verfahrensstandardabweichung s_x (mg/kg)	15,243	15,136
Verfahrensvariationskoeffizient CV_x (%)	16,91	16,79

Grundkalibrierung für o-Tyr bei HPLC/MSD

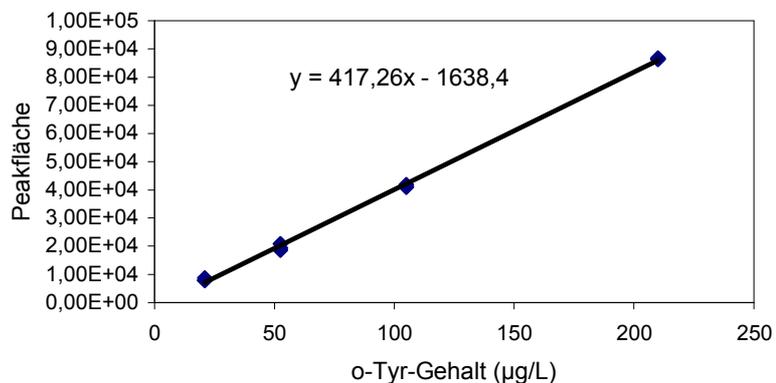


Abbildung 50: Grundkalibriergerade für o-Tyr

Tabelle 14: Verfahrenskennndaten der Grundkalibrierung für o-Tyr (MSD)

Verfahrenskennndaten	o-Tyr
Achsenabschnitt a (mV·min)	-6876,30
Steigung b ((mV·min)/(µg/L))	474,37
Korrelationskoeffizient r	0,9996
Reststandardabweichung der Geraden s_{gr} (mV·min)	1050,161
Verfahrensstandardabweichung s_x (µg/L)	2,214
Verfahrensvariationskoeffizient CV_x (%)	2,28
NWG (3-faches Grundrauschen) (µg/L)	21,00

Grundkalibrierung für 3,4-HPPA

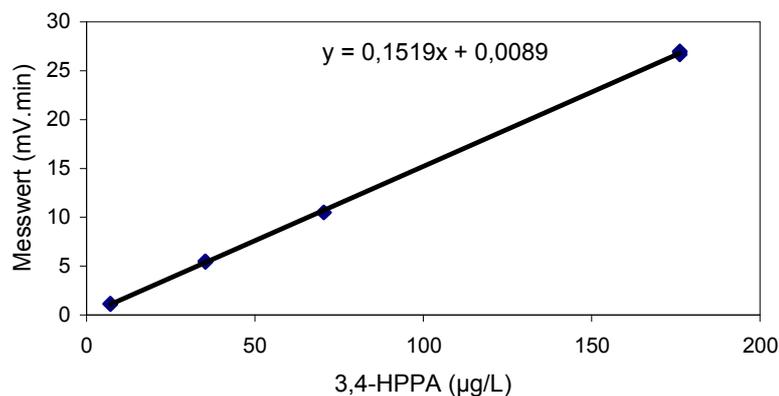


Abbildung 51: Grundkalibriergerade für 3,4-HPPA

Grundkalibrierung für 3,3-HPPA

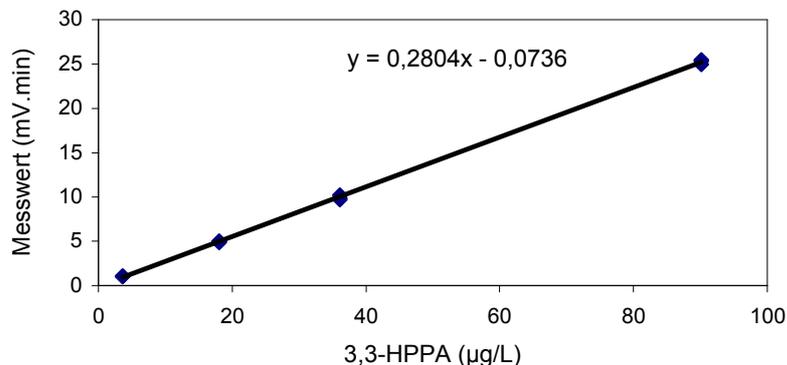


Abbildung 52: Grundkalibriergerade für 3,3-HPPA

Tabelle 15: Verfahrenskennwerten der Grundkalibrierung für 3,4- und 3,3-HPPA

Verfahrenskennwerten	3,4-HPPA	3,3-HPPA
Achsenabschnitt a (mV·min)	0,0089	-0,0736
Steigung b ((mV·min)/(µg/L))	0,1519	0,2804
Korrelationskoeffizient r	0,9998	0,9996
Reststandardabweichung der Geraden s_{gr} (mV·min)	0,153	0,190
Verfahrensstandardabweichung s_x (µg/L)	1,007	0,677
Verfahrensvariationskoeffizient CV_x (%)	1,39	1,83
NWG (3-faches Grundrauschen) (µg/L)	6,20	-

Matrixkalibrierung für 3,4-HPPA

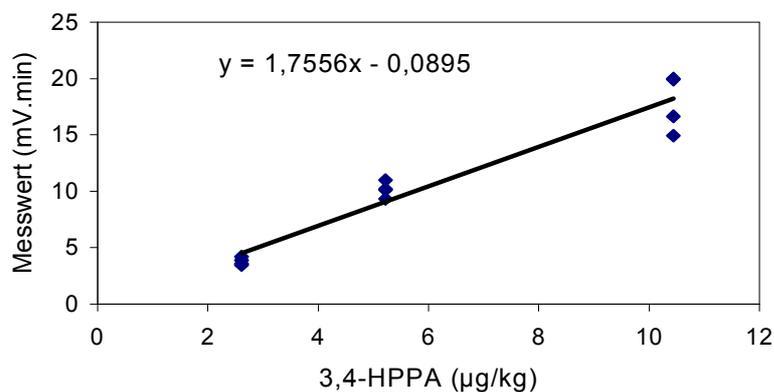


Abbildung 53: Matrixkalibrierung für 3,4-HPPA

Matrixkalibrierung für 3,3-HPPA

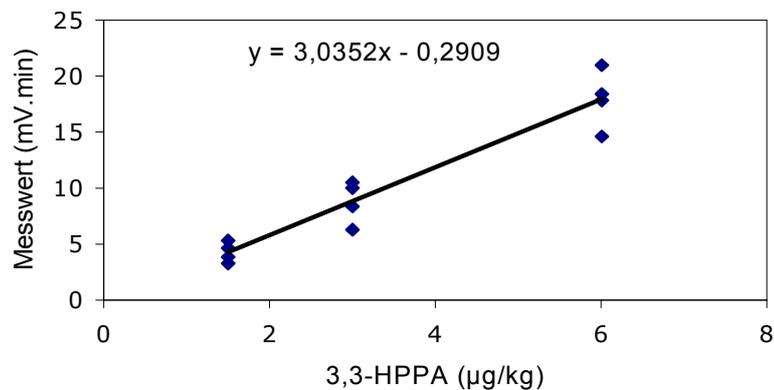


Abbildung 54: Matrixkalibrierung für 3,3-HPPA

Tabelle 16: Verfahrenskenndaten der Matrixkalibrierung für 3,4- und 3,3-HPPA

Verfahrenskenndaten	3,4-HPPA	3,3-HPPA
Achsenabschnitt a (mV·min)	-0,0895	-0,2909
Steigung b ((mV·min)/(µg/kg))	1,7556	3,0352
Korrelationskoeffizient r	0,9337	0,9202
Reststandardabweichung der Geraden s_{gr} (mV·min)	1,6680	1,8363
Verfahrensstandardabweichung s_x (µg/kg)	0,95	0,605
Verfahrensvariationskoeffizient CV_x (%)	15,61	17,27
NWG (3-faches Grundrauschen) (µg/kg)	0,31	-

Wiederfindungsfunktion für 3,4-HPPA

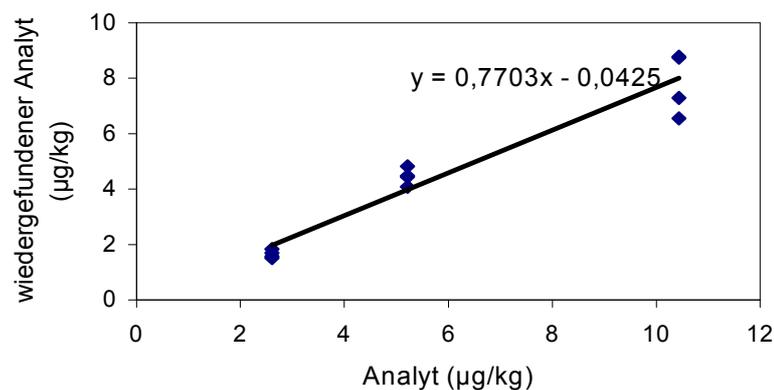


Abbildung 55: Wiederfindungsfunktion für 3,4-HPPA

Wiederfindungsfunktion für 3,4-HPPA mit Berücksichtigung des IS

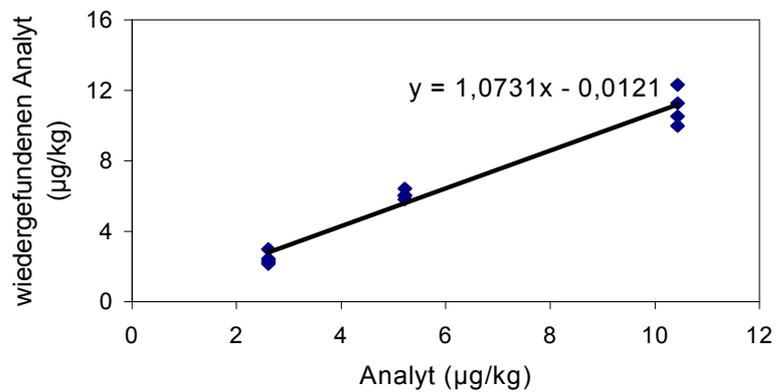


Abbildung 56: Wiederfindungsfunktion für 3,4-HPPA mit Berücksichtigung von IS

Tabelle 17: Verfahrenskennndaten der Wiederfindungsfunktion für 3,4-HPPA ohne und mit Berücksichtigung des IS

Verfahrenskennndaten	ohne IS	mit IS
Achsenabschnitt a (mV·min)	-0,0425	-0,0121
Steigung b ((mV·min)/(µg/kg))	0,7703	1,0731
Korrelationskoeffizient r	0,9334	0,9662
Reststandardabweichung der Geraden s_{gr} (mV·min)	0,7336	0,7157
Verfahrensstandardabweichung s_x (µg/kg)	0,952	0,667
Verfahrensvariationskoeffizient CV_x (%)	15,64	10,96

13.5 FL-Spektren

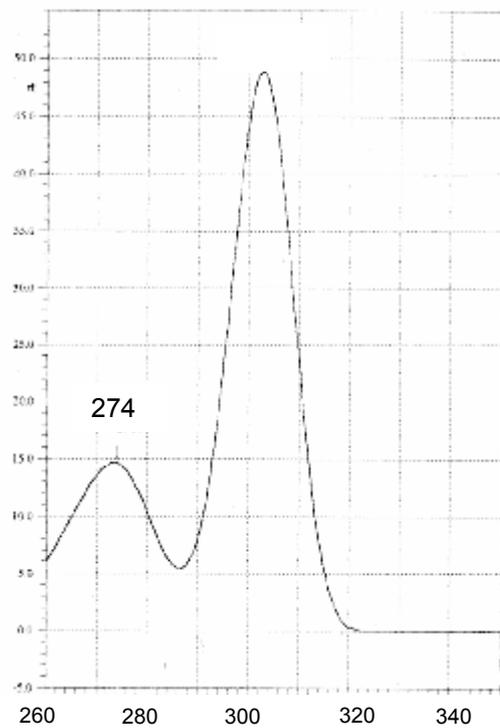


Abbildung 57: Anregungsspektrum von o-Tyr bei einer $\lambda_{Em} = 300$ nm

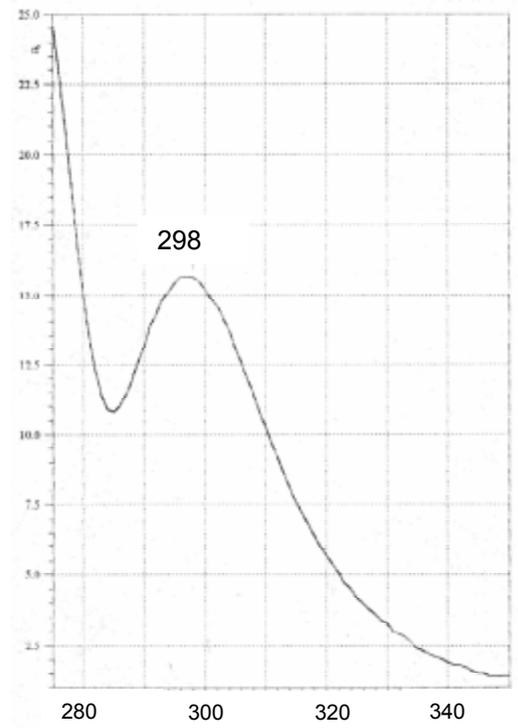


Abbildung 58: Emissionsspektrum von o-Tyr bei einer $\lambda_{Ex} = 272$ nm

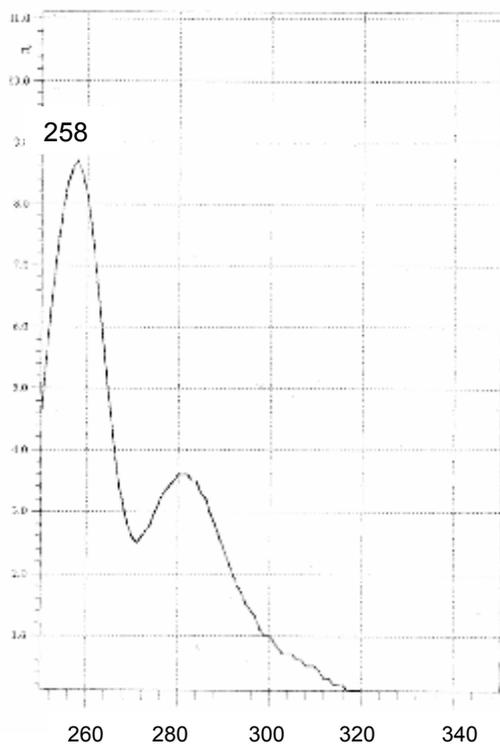


Abbildung 59: Anregungsspektrum von Phe bei einer $\lambda_{Em} = 288$ nm

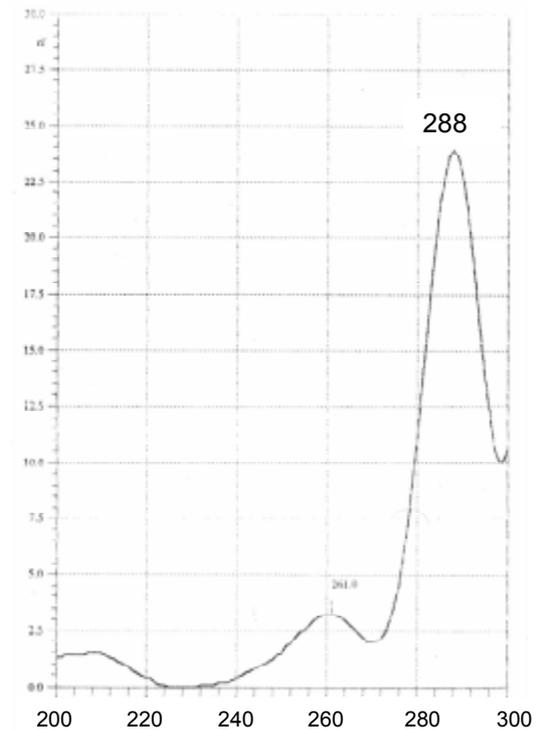


Abbildung 60: Emissionsspektrum von Phe bei einer $\lambda_{Ex} = 258$ nm

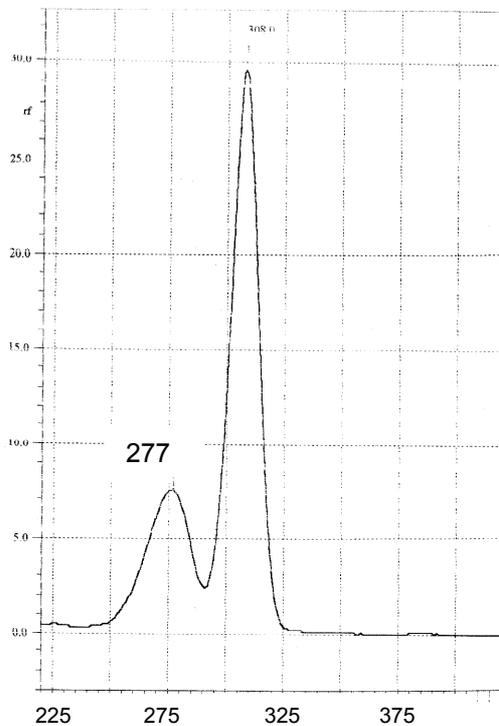


Abbildung 61: Anregungsspektrum von 3,4-HPPA bei einer $\lambda_{Em} = 310 \text{ nm}$

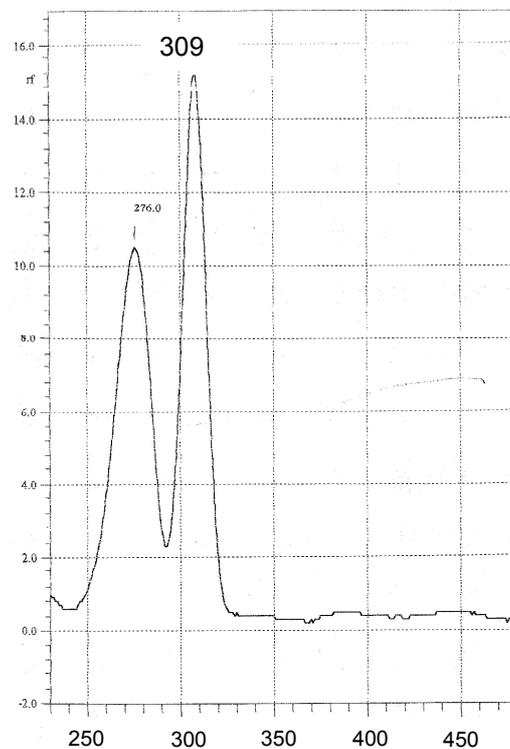


Abbildung 62: Emissionsspektrum von 3,4-HPPA bei einer $\lambda_{Ex} = 276 \text{ nm}$

13.6 Bestrahlungsbedingungen

In den Tabellen 18-23 sind die Bestrahlungsbedingungen aufgeführt.

Tabelle 18: Bestrahlung bei RT (^{137}Cs -Strahlenquelle, Dosisleistung 0,7 kGy/h)

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

Tabelle 19: Bestrahlung im gefrorenen Zustand (^{60}Co -Strahlenquelle, Dosisleistung 1,2 kGy/h)

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 20: Bestrahlung im bei RT (^{60}Co -Strahlenquelle, Dosisleistung 2 kGy/h)

Zieldosis	1 kGy	3 kGy	5 kGy	10 kGy
Erreichte Dosis	1,4 kGy	3,2 kGy	6,2 kGy	11,2 kGy

Tabelle 21: Bestrahlung im gefrorenen Zustand (^{60}Co -Strahlenquelle, Dosisleistung 2 kGy/h)

Zieldosis	1 kGy	3 kGy	5 kGy	10 kGy
Temperatur (vor Bestrahlung)	-18,0 °C	-17,5 °C	-17,0 °C	-15,8 °C
Temperatur (nach Bestrahlung)	-16,4 °C	-9,0 °C	-6,0 °C	-4,2 °C
Erreichte Dosis	1,0 kGy	2,9 kGy	3,9 kGy	9,1 kGy

Tabelle 22: Bestrahlung im bei RT (^{60}Co -Strahlenquelle, Dosisleistung 4 kGy/h)

Zieldosis	1 kGy	3 kGy	5 kGy	10 kGy
Erreichte Dosis	1,5 kGy	2,0 kGy	5,7 kGy	11,4 kGy

Tabelle 23: Bestrahlung im gefrorenen Zustand (^{60}Co -Strahlenquelle, Dosisleistung 4 kGy/h)

Zieldosis	1 kGy	3 kGy	5 kGy	10 kGy
Temperatur (vor Bestrahlung)	-18,0 °C	-17,5 °C	-17,0 °C	-15,8 °C
Temperatur (nach Bestrahlung)	-13,1 °C	-7,5 °C	-4,1 °C	-3,0 °C
Erreichte Dosis	1,4 kGy	1,3 kGy	7,3 kGy	9,3 kGy

13.7 Clean-up zur Bestimmung von o-Tyrosin in γ -bestrahlten proteinreichen Lebensmitteln

13.7.1 Homogenisierung

Lösungen:

- Perchlorsäure 12%
- o-Tyr- und α -Methyl-p-Tyr-Standardlösung

Homogenisierung mit Hilfe von Ultraturrax

Ca. 3 g Nordseegarnelen wurden in einem Zentrifugengefäß mit 1 mL o-Tyr-Lösung, 1 mL α -Methyl-p-Tyr-Lösung und 2 mL Perchlorsäure-Lösung versetzt, auf 7,5 mL mit Wasser aufgefüllt und mit einem Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurde 20 min bei $10\,000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde membranfiltriert (0,2 μm) und mittels HPLC analysiert.

Homogenisierung mit Hilfe von Stickstoff

Ca. 3 g Nordseegarnelen wurden genau eingewogen. Das Fleisch wurde im Mörser mit flüssigem Stickstoff pulverisiert, das Pulver wurde mit 1 mL o-Tyr-Lösung, 1 mL α -Methyl-p-Tyr-Lösung und 2 mL Perchlorsäure-Lösung versetzt und auf 7,5 mL mit bidest. Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde 20 min bei $10\,000 \times g$ und 4 °C

zentrifugiert. Der Überstand wurde membranfiltriert (0,2 µm) und mittels HPLC analysiert.

Die o-Tyr- und α-Methyl-p-Tyr-Gehalte wurden anhand von externen Kalibriergeraden mittels HPLC/FL-Detektion bestimmt (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 13.3). Die jeweiligen Wiederfindungen bei verschiedenen Homogenisierungsmethoden sind in Tabelle 24 angegeben.

Tabelle 24: Wiederfindungsraten von o-Tyr und α-Methyl-p-Tyr (IS) in dotierten Nordseegarnelen bei verschiedenen Homogenisierungsmethoden

Methode	WFR o-Tyr (%)*	WFR IS (%)*	CV (%)*
Ultraturrax	98	100	7
Stickstoff	80	72	11

*WFR = Mittelwert aus 12 Messungen (%)

*CV = Variationskoeffizient (%)

13.7.2 Deproteinierung

Lösungen:

- Perchlorsäure 12%
- Trichloressigsäure 10%
- o-Tyr-Standardlösung

Perchlorsäurefällung:

3 g Nordseegarnelen wurden in einem Zentrifugengefäß mit 1 mL o-Tyr-Lösung und 2 mL Perchlorsäure-Lösung versetzt, auf 7,5 mL mit Wasser aufgefüllt und mit einem Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurde 20 min bei 10 000 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde membranfiltriert und mittels HPLC analysiert.

Essigsäurefällung:

3 g Nordseegarnelen wurden in einem Zentrifugengefäß mit 1 mL o-Tyr-Lösung und 100 µL Essigsäure (100%) versetzt, auf 7,5 mL mit Wasser aufgefüllt und mit einem Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurde 20 min bei 10 000 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde membranfiltriert und mittels HPLC analysiert.

Trichloressigsäurefällung:

3 g Nordseegarnelen wurden in einem Zentrifugengefäß mit 1 mL o-Tyr-Lösung und 2 mL Trichloressigsäure-Lösung versetzt, auf 7,5 mL mit Wasser aufgefüllt und mit einem Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurde 20 min bei $10\,000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde membranfiltriert und mittels HPLC analysiert.

Die o-Tyr-Gehalte wurden anhand von externen Kalibriergeraden mittels HPLC/FL-Detektion bestimmt (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 13.3). Die Wiederfindungen bei verschiedenen Deproteinierungsmethoden sind in Tabelle 25 angegeben.

Tabelle 25: Wiederfindungsraten von o-Tyr in dotierten Nordseegarnelen bei verschiedenen Deproteinierungsmethoden

Methode	WFR (%) *	CV (%) *
Perchlorsäure	85	1,7
Essigsäure	80	2,3
Trichloressigsäure	75	2,0

*WFR = Mittelwert aus 6 Messungen (%)

*CV = Variationskoeffizient (%)

13.7.3 C18-Festphasenextraktion**Lösungen:**

- Wasser bidest.
- Methanol
- o-Tyr- und α -Methyl-p-Tyr-Standardlösung
- dotierter Fleischextrakt

Säulenkonditionierung: 2 Säulenfüllungen Methanol
2 Säulenfüllungen bidest. Wasser
(Fluss: ca. 1-2 mL/min)

Probenaufgabe: 2 mL o-Tyr- und α -Methyl-p-Tyr-Standardlösung
oder 2 mL dotierten Fleischextraktes

Waschen: 3 mL Wasser bidest.

Elution: 4 mL Elutionslösung (Wasser/MeOH 85/15 v/v pH 3,5)

Die Gehalte an o-Tyr und α -Methyl-p-Tyr wurden mittels HPLC/FLD bestimmt. Die jeweiligen Wiederfindungen für o-Tyr und α -Methyl-p-Tyr bei den verschiedenen getesteten Säulen sind in Tabelle 26, 27 und 28 dargestellt.

Tabelle 26: Ergebnis des Säulentests mit o-Tyr- und α -Methyl-p-Tyr-Standardlösung (IS)

Säule	Typ	Probenaufgabe		WFR (%)*			
				Waschen		Elution	
				o-Tyr	IS	o-Tyr	IS
Varian, Bond Elut C 18	C 18, 500 mg	0	0	0	0	100	94
Varian, Bond Elut C 18/OH	C 18, 500 mg	0	0	11	15	80	75
IST, Isolute C 18 (ec)	C 18, 500 mg	3	11	85	85	12	0
Merck, LiChrolut EN	Polymer, 200 mg	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	78	71

*WFR = Mittelwert aus 2 Messungen (%)

n.b. = nicht bestimmt

Tabelle 27: Ergebnis des Säulentests mit dotierter Krabbenmatrix

Säule	Typ	Probenaufgabe		WFR (%)*			
				Waschen		Elution	
				o-Tyr	IS	o-Tyr	IS
Varian, Bond Elut C 18	C 18, 500 mg	0	0	0	0	97	91
Merck, LiChrolut EN	Polymer, 200 mg	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	48	50

*WFR = Mittelwert aus 2 Messungen (%)

n.b. = nicht bestimmt

Tabelle 28: Einfluss des pH-Wertes auf die Elution des o-Tyr und α -Methyl-p-Tyr (IS), LiChrolut EN

pH	2,0	3,5	7,5
WFR o-Tyr (%)	22	78	51
WFR IS (%)	24	71	90

13.7.4 Kationenaustauscher

Lösungen:

- Wasser bidest.
- Methanol
- Ameisensäure 98%
- Ammoniak 25%
- o-Tyr- und α -Methyl-p-Tyr-Standardlösung
- dotierter Fleischextrakt

Säulenkonditionierung:	2 Säulenfüllungen Methanol 2 Säulenfüllungen bidest. Wasser (Fluss: ca. 1-2 mL/min)
Probenaufgabe:	2 mL o-Tyr- und α -Methyl-p-Tyr-Standardlösung oder 2 mL dotierten Fleischextraktes (gekoppelt mit Varian, Bond Elut C 18 Säule)
Waschen:	3 mL Waschlösung (Wasser/MeOH 85/15 v/v)
Elution:	3 mL Elutionspuffer (NH ₄ formiat 0,2 mol/L, pH 3)

Die Gehalte an o-Tyr und α -Methyl-p-Tyr wurden mittels HPLC/FLD bestimmt. Die jeweiligen Wiederfindungen für o-Tyr und α -Methyl-p-Tyr bei den verschiedenen getesteten Säulen sind in Tabelle 29 und 30 dargestellt.

Tabelle 29: Ergebnis des Kationenaustauschertests mit o-Tyr- und α -Methyl-p-Tyr-Standardlösung

Säule	Typ	Probenaufgabe		WFR (%)*			
				Waschen		Elution	
				o-Tyr	IS	o-Tyr	IS
IST, Isolute PRS	500 mg	0	11	6	60	67	30
IST, Isolute SCX	500 mg	0	5	3	50	60	24
Varian, Bond Elut PRS	500 mg	0	7	4	48	65	22

*WFR = Mittelwert aus 2 Messungen (%)

Tabelle 30: Ergebnis des Kationenaustauschertests mit dotierter Krabbenmatrix (gekoppelt mit C18-SPE)

Säule	Typ	Probenaufgabe		WFR (%)*			
				Waschen		Elution	
				o-Tyr	IS	o-Tyr	IS
IST, Isolute PRS	500 mg	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	60	20

*WFR = Mittelwert aus 2 Messungen (%)

n.b. = nicht bestimmt

13.7.5 Anionenaustauscher

Lösungen:

- Wasser bidest.
- Methanol
- Essigsäure 1mol/L
- o-Tyr- und α -Methyl-p-Tyr-Standardlösung

Säulenkonditionierung: 2 Säulenfüllungen Methanol
 2 Säulenfüllungen 1 mol/L Essigsäure
 (Fluss: ca. 1-2 mL/min)

Probenaufgabe: 2 mL o-Tyr- und α -Methyl-p-Tyr-Standardlösung (pH 3,5)

Die Gehalte an o-Tyr und α -Methyl-p-Tyr wurden mittels HPLC/FLD bestimmt. Die jeweiligen Wiederfindungen für o-Tyr und α -Methyl-p-Tyr bei den verschiedenen getesteten Säulen sind in Tabelle 31 und 32 dargestellt.

Tabelle 31: Ergebnis des Anionenaustauschertests mit o-Tyr- und α -Methyl-p-Tyr-Standardlösung

Säule	Typ	WFR (%)*	
		Probenaufgabe o-Tyr	IS
Merck, LiChrolut SAX	500 mg	55	50

*WFR = Mittelwert aus 2 Messungen (%)
 n.b. = nicht bestimmt

Tabelle 32: Einfluss des pH-Wertes auf die Retention des o-Tyr und α -Methyl-p-Tyr (IS),
 Anionentauscher

pH	2	4,5	11
o-Tyr WFR (%)	45	40	0
IS WFR (%)	46	31	0

13.8 Verfahrensvalidierung zur Bestimmung von o-Tyrosin

Je 3 g Nordseegarnelen wurden in 50-mL-Zentrifugenröhrchen genau eingewogen. Dann wurde jeweils 1 mL der entsprechenden o-Tyr-Standardlösung zugegeben (Standardlösungen: 14, 35, 70, 115, 140 $\mu\text{g/L}$ in bidest H_2O). Ab hier entspricht die Aufarbeitung dem in Anhang 13.10 beschriebenen Verfahren. Es resultieren Proben mit einer Konzentration an o-Tyr von 50, 140, 300, 400 und 500 $\mu\text{g/kg}$.

13.9 Verfahrensvalidierung zur Bestimmung von Phenylalanin

Je 3 g Tiefseegarnelen wurden in 50-mL Zentrifugengefäß genau eingewogen und jeweils mit 0,25 mL, 0,5 mL, 0,75 mL und 1 mL Phe-Standardlösung 541 mg/L und 2 mL Perchlorsäure-Lösung versetzt, auf 7,5 mL mit Wasser aufgefüllt und mit einem Ultraturrax homogenisiert. Es resultieren Proben mit einer Konzentration an Phe von

18, 36, 54 und 72 mg/L. Anschließend wurde 20 min bei $10\,000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde membranfiltriert und mittels HPLC analysiert.

13.10 Bestimmung von o-Tyrosin, p-Tyrosin und Phenylalanin in γ -bestrahlten proteinreichen Lebensmitteln

Je 3 g Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerfleisch wurden in 50-mL-Zentrifugenröhrchen genau eingewogen. Es wurden 2 mL Perchlorsäure 12% dazugegeben. Das Zentrifugengefäß wurde mit bidestilliertem Wasser auf 7,5 mL aufgefüllt. Der Inhalt des Zentrifugenröhrchens wurde mit dem Ultraturrax 10 Sekunden lang homogenisiert. Es wurde für 20 Minuten bei $10\,000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein zweites Zentrifugenröhrchen abgegossen. 2 mL des Überstandes wurden auf eine konditionierte SPE C18 Säule gegeben (siehe Anhang 13.7.3). Der Eluat wurde in ein Probenvial (1,5 mL, Braunglas) mit einer Pasteurpipette abpipettiert. Die Probelösungen wurden sofort in die HPLC eingespritzt und vermessen.

13.11 Ergebnisse der γ -Bestrahlung der Lebensmittel - Bestimmung von Phenylalanin und p-Tyrosin

Die Phe- und p-Tyr-Gehalte in Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerfleisch sowie in den gefrorenen und bei RT bestrahlten Proben sind in den Tabellen 33-35 angegeben.

Tabelle 33: Phe- und p-Tyr-Gehalte in verschiedenen Lebensmitteln (mg/kg bezogen auf Frischgewicht)

		Nordseegarnelen	Black Tiger Garnelen	Tiefseegarnelen	Hühnerbrust
Phe	MW [*]	147	41	39	112
	Sx [*]	19,50	7,84	23,65	27,96
	n	50	27	40	20
p-Tyr	MW	322	57	45	206
	Sx	52,98	11,64	37,92	26,08
	n	47	26	33	14

^{*}MW = Mittelwert aus n Bestimmungen, angegeben in mg/kg Frischgewicht

^{*}Sx = Standardabweichung

Tabelle 34: Phe-Gehalte (mg/kg Frischgewicht) in gefrorenen sowie bei RT bestrahlten Proben

		Nordseegarnelen	Black Tiger Garnelen	Tiefseegarnelen	Hühnerbrust
unbestrahlt (0 kGy)	MW *	154,2	40,8	52,3	117,8
	Sx *	12,26	5,37	32,45	29,22
	n	3	3	3	3
schwach bestrahlt (1 – 2 kGy)	MW	154,9	39,3	44,1	105,7
	Sx	12,24	7,21	26,49	24,15
	n	13	9	11	5
bestrahlt (3 – 7 kGy)	MW	155,2	42,4	34,3	125,3
	Sx	23,96	8,25	20,76	29,22
	n	11	9	10	5
stark bestrahlt (9 – 11 kGy)	MW	138,2	39,2	34,2	125,5
	Sx	16,97	9,30	29,03	40,65
	n	7	6	7	3

* MW = Mittelwert aus n Bestimmungen, angegeben in mg/kg Frischgewicht

* Sx = Standardabweichung

Tabelle 35: p-Tyr-Gehalte (mg/kg Frischgewicht) in gefrorenen sowie bei RT bestrahlten Proben

		Nordseegarnelen	Black Tiger Garnelen	Tiefseegarnelen	Hühnerbrust
unbestrahlt (0 kGy)	MW *	301,5	53,9	55,8	208,4
	Sx *	27,73	4,89	53,27	25,81
	n	3	3	3	3
schwach bestrahlt (1 – 2 kGy)	MW	327,7	53,0	49,1	199,0
	Sx	41,97	12,62	34,92	8,63
	n	13	9	11	5
bestrahlt (3 - 7 kGy)	MW	334,2	61,5	43,0	211,3
	Sx	58,02	14,91	35,18	40,68
	n	11	9	10	5
stark bestrahlt (9 – 11 kGy)	MW	287,3	56,9	38,1	219,3
	Sx	46,81	4,41	47,51	10,91
	n	7	6	7	3

* MW = Mittelwert aus n Bestimmungen, angegeben in mg/kg Frischgewicht

* Sx = Standardabweichung

13.12 Ergebnisse der γ -Bestrahlung der Lebensmittel – Bestimmung von o-Tyrosin

13.12.1 Einfluss der Bestrahlungsdosis und Temperatur

Die o-Tyr-Gehalte in gefrorenen und bei RT bestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerbrust sind in den Tabellen 36-39 angegeben.

Tabelle 36: o-Tyr-Gehalte ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht) in bei RT bestrahlten Proben

		Nordseegarnelen	Black Tiger Garnelen	Tiefseegarnelen	Hühnerbrust
0 kGy	MW [*]	38,4	24,4	16,4	24,8
	Sx [*]	5,01	3,74	3,46	6,84
1 kGy	MW	136,3	98,6	49,3	52,2
	Sx	9,77	10,42	4,71	3,01
3 kGy	MW	317,1	268,4	193,6	76,9
	Sx	11,86	40,95	17,05	10,95
5 kGy	MW	502,3	462,9	240,0	140,3
	Sx	19,02	40,79	11,58	9,71
10 kGy	MW	721,0	845,7	475,1	288,2
	Sx	6,88	55,32	28,90	20,18

^{*}MW = Mittelwert aus 4 Bestimmungen, angegeben in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht

^{*}Sx = Standardabweichung

Tabelle 37: o-Tyr-Gehalte ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht) in bei RT bestrahlten Proben

		Nordseegarnelen	Black Tiger Garnelen	Tiefseegarnelen	Hühnerbrust
0 kGy	MW [*]	35,2	19,2	12,7	19,0
	Sx [*]	2,34	5,26	9,03	14,39
1 kGy	MW	106,8	160,0	145,7	45,6
	Sx	22,76	29,79	21,31	7,88
3 kGy	MW	184,8	279,2	266,3	63,4
	Sx	46,08	32,50	60,66	7,11
6 kGy	MW	323,6	576,9	599,1	120,1
	Sx	66,47	58,43	26,05	22,45
11 kGy	MW	480,0	924,2	866,6	250,2
	Sx	56,05	59,07	78,86	32,39

^{*}MW = Mittelwert aus 6 Bestimmungen, angegeben in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht

^{*}Sx = Standardabweichung

Tabelle 38: o-Tyr-Gehalte ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht) in gefrorenen bestrahlten Proben

		Nordseegarnelen	Black Tiger Garnelen	Tiefseegarnelen	Hühnerbrust
0 kGy	MW [*]	31,3	24,4	16,4	24,8
	Sx [*]	5,00	3,74	3,46	6,84
1 kGy	MW	122,7	26,3	18,4	46,5
	Sx	50,00	7,64	1,29	31,10
3 kGy	MW	182,6	26,8	15,9	46,3
	Sx	60,00	6,18	1,92	26,93
5 kGy	MW	118,5	33,8	19,4	58,7
	Sx	50,00	13,41	3,22	17,46
10 kGy	MW	519,6	40,8	25,4	68,0
	Sx	58,00	17,87	1,43	15,37

^{*}MW = Mittelwert aus 4 Bestimmungen, angegeben in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht

^{*}Sx = Standardabweichung

Tabelle 39: o-Tyr-Gehalte ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht) in gefrorenen bestrahlten Proben

		Nordseegarnelen	Black Tiger Garnelen	Tiefseegarnelen	Hühnerbrust
0 kGy	MW [*]	27,6	18,5	9,4	19,0
	Sx [*]	12,69	9,86	9,39	14,40
1 kGy	MW	32,5	27,8	25,5	43,6
	Sx	20,08	14,34	22,80	12,56
3 kGy	MW	53,3	41,6	81,3	32,2
	Sx	48,88	37,53	59,51	9,13
7 kGy	MW	186,7	72,6	157,8	49,3
	Sx	61,09	34,24	50,13	17,58
9 kGy	MW	282,0	404,0	608,8	59,6
	Sx	60,75	273,79	268,65	21,43

^{*}MW = Mittelwert aus 6 Bestimmungen, angegeben in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht

^{*}Sx = Standardabweichung

13.12.2 Einfluss der Dosisleistung

Die o-Tyr-Gehalte in gefrorenen und bei RT bestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerbrust bei der Dosisleistung 2 und 4 kGy/h sind in den Tabellen 40 und 41 angegeben.

Tabelle 40: o-Tyr-Gehalte ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht) in gefrorenen bestrahlten Proben bei einer Dosisleistung von 2 und 4 kGy/h

		Nordseegarnelen		Black Tiger Garnelen		Tiefseegarnelen		Hühnerbrust	
Dosisleistung (kGy/h)		2	4	2	4	2	4	2	4
1 kGy	MW [*]	41,7	27,9	35,3	24,0	18,6	29,0	39,0	45,9
	Sx [*]	22,35	7,73	3,98	9,00	16,04	13,07	13,43	9,75
3 kGy	MW	24,3	-	20,3	-	29,8	-	31,1	-
	Sx	7,48	-	9,00	-	4,73	-	4,93	-
4 kGy	MW	82,0	-	63,0	-	132,7	-	33,3	-
	Sx	51,61	-	8,94	-	15,77	-	11,83	-
7 kGy	MW	-	186,7	-	72,6	-	157,8	-	49,3
	Sx	-	57,57	-	10,80	-	20,20	-	17,58
9 kGy	MW	254,4	329,7	427,6	380,4	452,6	765,0	52,2	66,9
	Sx	45,42	34,30	22,55	13,51	36,03	28,91	27,89	5,75

^{*}MW = Mittelwert aus 6 Bestimmungen, angegeben in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht

^{*}Sx = Standardabweichung

Tabelle 41: o-Tyr-Gehalte ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht) in bei RT bestrahlten Proben bei einer Dosisleistung von 2 und 4 kGy/h

		Nordseegarnelen		Black Tiger Garnelen		Tiefseegarnelen		Hühnerbrust	
Dosisleistung (kGy/h)		2	4	2	4	2	4	2	4
1,5 kGy	MW [*]	102,5	111,1	183,6	136,5	157,2	134,1	46,4	44,8
	Sx [*]	26,89	16,62	19,07	17,40	17,88	17,93	5,39	9,69
2-3 kGy	MW	214,3	155,3	257,3	301,1	321,8	210,8	65,1	61,7
	Sx	22,40	44,75	33,28	6,73	7,14	33,78	5,46	8,10
6 kGy	MW	301,2	346,1	522,5	631,4	619,9	578,2	104,4	135,7
	Sx	71,98	51,47	21,80	20,47	19,35	10,74	16,10	16,12
11 kGy	MW	521,8	438,2	967,8	880,7	910,6	822,6	274,6	225,8
	Sx	38,93	35,65	55,64	9,47	16,38	91,09	19,77	22,76

^{*}MW = Mittelwert aus 6 Bestimmungen, angegeben in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht

^{*}Sx = Standardabweichung

13.12.3 Einfluss der Glasur

Die o-Tyr-Gehalte in gefrorenen glasierten und unglasierten bestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen sind in Tabelle 42 angegeben.

Tabelle 42: o-Tyr-Gehalte ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht) in gefrorenen bestrahlten glasierten und unglasierten Proben

		Nordseegarnelen		Black Tiger Garnelen		Tiefseegarnelen	
Glasur		glasiert	unglasiert	glasiert	unglasiert	glasiert	unglasiert
0 kGy	MW *	35,2	20,1	17,8	19,2	6,0	12,7
	Sx *	2,34	14,24	12,87	5,26	8,54	9,03
1 kGy	MW	30,8	34,2	35,2	20,4	14,1	36,9
	Sx	17,19	22,48	12,02	12,55	12,26	25,11
3 kGy	MW	34,2	14,4	24,9	15,6	18,9	40,8
	Sx	11,73	3,23	6,94	11,05	4,016	5,45
4 kGy	MW	72,8	91,6	104,4	21,6	95,8	169,6
	Sx	37,91	65,11	10,26	7,62	9,72	21,81
7 kGy	MW	172,4	201,1	104,9	40,3	112,8	202,8
	Sx	72,12	43,02	14,47	7,13	11,35	29,05
9 kGy	MW	288,7	295,4	673,1	134,9	823,9	393,7
	Sx	35,60	78,04	66,86	24,72	176,00	144,93

MW = Mittelwert aus 3 Bestimmungen, angegeben in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht

* Sx = Standardabweichung

13.12.4 Bildung von o-Tyrosin in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Bildung von o-Tyr in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis ist in Tabelle 43 und 44 zusammengefasst.

Tabelle 43: o-Tyr-Bildung in $\mu\text{g}/\text{kg}$ pro kGy im jeweiligen Lebensmittel, Bestrahlung bei RT

Bestrahlungsstufe		Nordseegarnelen	Black Tiger Garnelen	Tiefseegarnelen	Hühnerbrust
schwach bestrahlt (1 – 2 kGy)	MW*	59,65	133,50	111,73	28,48
	Sx*	9,65	26,47	10,81	6,20
bestrahlt (3 – 7 kGy)	MW	54,40	96,46	100,64	17,33
	Sx	8,55	12,58	2,03	2,51
stark bestrahlt (9 – 11 kGy)	MW	40,26	84,68	72,75	20,40
	Sx	6,12	7,60	8,53	2,32

MW = Mittelwert aus 3 Bestimmungen, angegeben in $\mu\text{g}/\text{kg}$ pro kGy

* Sx = Standardabweichung

Tabelle 44: o-Tyr-Bildung in µg/kg pro kGy im jeweiligen Lebensmittel, Bestrahlung im gefrorenen Zustand

Bestrahlungsstufe		Nordseegarnelen	Black Tiger Garnelen	Tiefseegarnelen	Hühnerbrust
schwach bestrahlt (1 – 2 kGy)	MW*	31,57	26,45	24,65	40,67
	Sx*	20,63	16,60	19,93	10,81
	n	12	12	12	6
bestrahlt (3 – 7 kGy)	MW	23,18	9,90	20,81	8,56
	Sx	11,75	9,95	14,13	2,45
	n	15	15	15	7
stark bestrahlt (9 - 11 kGy)	MW	30,18	53,96	66,22	4,54
	Sx	7,30	27,58	30,12	2,22
	n	7	7	7	4

* MW = Mittelwert aus n Bestimmungen, angegeben in µg/kg pro kGy

* Sx = Standardabweichung

13.12.5 Bestimmung von o-Tyrosin mittels HPLC/MS

Die o-Tyr-Gehalte in unbestrahlten und bei RT bestrahlten Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerbrust bei MS-Detektion sind in Tabelle 45 angegeben.

Tabelle 45: o-Tyr-Gehalte in bei RT bestrahlten Proben, MS-Detektion

		Nordseegarnelen	Black Tiger Garnelen	Tiefseegarnelen	Hühnerbrust
0 kGy	MW*	u.N.	22,3	23,5	25,0
	Sx*	n.b.	4,75	7,77	6,56
1 kGy	MW	n.b.	61,0	n.b.	n.b.
	Sx	n.b.	14,42	n.b.	n.b.
3 kGy	MW	n.b.	227,0	n.b.	n.b.
	Sx	n.b.	30,95	n.b.	n.b.
5 kGy	MW	n.b.	410,4	n.b.	n.b.
	Sx	n.b.	42,64	n.b.	n.b.
10 kGy	MW	n.b.	743,5	n.b.	n.b.
	Sx	n.b.	65,34	n.b.	n.b.

* MW = Mittelwert aus 2 Bestimmungen, angegeben in µg/kg Frischgewicht

* Sx = Standardabweichung

u. N. = unter Nachweisgrenze

n.b.= nicht bestimmt

13.13 Clean-up zur Bestimmung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure in γ -bestrahlten proteinreichen Lebensmitteln

13.13.1 Deproteinierung

Lösungen:

- Perchlorsäure 12%
- ZnSO₄ 5%
- NaOH 0,5 mol/L
- HCl 2 mol/L
- 3,4-HPPA-Standardlösung

Perchlorsäurefällung:

5-10 g Nordseegarnelen wurden in einem Zentrifugengefäß mit 1 mL 3,4-HPPA-Lösung und 2 mL Perchlorsäure-Lösung versetzt, auf 20 mL mit Wasser aufgefüllt und mit einem Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurde 20 min bei 10 000 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde membranfiltriert und mittels HPLC analysiert.

Perchlorsäurefällung mit MeOH:

5-10 g Nordseegarnelen wurden in einem Zentrifugengefäß mit 1 mL 3,4-HPPA-Lösung, 2 mL Perchlorsäure-Lösung und 1 mL MeOH versetzt, auf 20 mL mit Wasser aufgefüllt und mit einem Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurde 20 min bei 10 000 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde membranfiltriert und mittels HPLC analysiert.

Perchlorsäurefällung mit N,N-Dimethylformamid:

5-10 g Nordseegarnelen wurden in einem Zentrifugengefäß mit 1 mL 3,4-HPPA-Lösung, 2 mL Perchlorsäure-Lösung und 1 mL N,N-Dimethylformamid versetzt, auf 20 mL mit Wasser aufgefüllt und mit einem Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurde 20 min bei 10 000 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde membranfiltriert und mittels HPLC analysiert.

Essigsäurefällung:

5-10 g Nordseegarnelen wurden in einem Zentrifugengefäß mit 1 mL 3,4-HPPA-Lösung und 100 µL Essigsäure (100%) versetzt, auf 20 mL mit Wasser aufgefüllt und mit einem Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurde 20 min bei $10\,000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde membranfiltriert und mittels HPLC analysiert.

Acetonfällung:

5-10 g Nordseegarnelen wurden in einem Zentrifugengefäß mit 1 mL 3,4-HPPA-Lösung und 2 mL Perchlorsäure-Lösung versetzt, auf 20 mL mit Aceton aufgefüllt und mit einem Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurde 20 min bei $10\,000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Aceton wurde im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 0,5 mL bidest. Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde membranfiltriert und mittels HPLC analysiert.

Salzfällung mit ZnSO_4 und NaOH:

5-10 g Nordseegarnelen wurden in einem Zentrifugengefäß mit 1 mL 3,4-HPPA-Lösung, 5 mL ZnSO_4 -Lösung und 5 mL NaOH-Lösung versetzt, auf 20 mL mit Wasser aufgefüllt und mit einem Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurde 20 min bei $10\,000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 µL HCl-Lösung neutralisiert, membranfiltriert und mittels HPLC analysiert.

Salzfällung mit $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$:

5-10 g Nordseegarnelen wurden in einem Zentrifugengefäß mit 1 mL 3,4-HPPA-Lösung, 12 g $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ versetzt, auf 20 mL mit Wasser aufgefüllt und mit einem Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurde 20 min bei $10\,000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 µL HCl-Lösung neutralisiert, filtriert und mittels HPLC analysiert.

Die Wiederfindungsraten (Tabelle 46) wurden anhand von externen Kalibriergeraden mittels HPLC/FL-Detektion bestimmt (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 13.3.3).

Tabelle 46: Wiederfindungsraten von 3,4-HPPA in dotierten Nordseegarnelen bei verschiedenen Deproteinierungsmethoden

Methode	n	WFR (%)*	CV (%)*
Perchlorsäure	3	84	1,0
Perchlorsäure + MeOH	3	95	2,5
Perchlorsäure + N,N-Dimethylformamid	1	38	n.b.
Essigsäure	3	82	3,3
Aceton	2	99	4,7
ZnSO ₄ + NaOH	2	70	1,2
NH ₄ (SO ₄) ₂	2	65	4,0

*WFR = Mittelwert aus n Messungen (%)

*CV = Variationskoeffizient (%)

n.b. = nicht bestimmt

13.13.2 Probenaufarbeitung – Isolierung und Anreicherung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion

Ca. 10 g Nordseegarnelen, Tiefseegarnelen, Black Tiger Garnelen und Hühnerbrust wurden genau in ein PE-Zentrifugengefäß (50 mL) eingewogen. Es wurden jeweils 1 mL MeOH 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 30 mL aufgefüllt. Es wurde 20 min zentrifugiert (10 000 x g, 4 °C) und der Überstand wurde in ein weiteres 50 mL Zentrifugengefäß abdekantiert. Der wässrige Extrakt wurde jeweils dreimal mit 20 mL Diethylether, Dichlormethan oder Ethylacetat ausgeschüttelt und anschließend 5 min zentrifugiert bei 10 000 x g und 8 °C. Alle organischen Phasen einer Probe wurden vereinigt. Anschließend wurde das organische Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 0,5 mL bidest. Wasser aufgenommen. Nach Membranfiltration (0,2 µm) wurden die Proben in die HPLC injiziert (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 13.3.3).

Tabelle 47: Wiederfindungsraten von 3,4-HPPA in einer Standardlösung und in dotierten Garnelenmatrix bei verschiedenen Extraktionsmethoden

Methode	WFR (%)*	WFR (%)*
	3,4-HPPA Standardlösung	mit 3,4-HPPA dotierte Garnelenmatrix
Diethylether	65	59
Dichlormethan	72	64
Ethylacetat	46	56

*WFR = Mittelwert aus 2 Messungen (%)

13.13.3 C18-Festphasenextraktion

Lösungen:

- Wasser bidest.
- Methanol
- Ammoniak 25%
- 3,4-HPPA- und 3,3-HPPA-Standardlösung
- dotierte Fleischextrakte

Säulenkonditionierung: 2 Säulenfüllungen Methanol
2 Säulenfüllungen bidest. Wasser
(Fluss: ca. 1-2 mL/min)

Probenaufgabe: 15 mL 3,4-HPPA- und 3,3-HPPA-Standardlösung
oder 15 mL dotierten Fleischextraktes

Waschen: 5 mL Wasser bidest.

Elution: 10 mL Elutionslösung (wässrige Ammoniaklösung
0,05 mol/L)

Die Gehalte an 3,4-HPPA und 3,3-HPPA wurden mittels HPLC/FLD bestimmt. Die jeweiligen Wiederfindungen für 3,4-HPPA und 3,3-HPPA sind in Tabelle 48 dargestellt.

Tabelle 48: Ergebnis des Säulentests Varian, Bond Elut C 18, 500 mg mit 3,4-HPPA- und 3,3-HPPA-Standardlösung

	Probenaufgabe		WFR (%) [*] Waschen		Elution	
	3,4-HPPA	3,3-HPPA	3,4-HPPA	3,3-HPPA	3,4-HPPA	3,3-HPPA
Standardlösung	0	0	0	0	95	90

*WFR = Mittelwert aus 3 Messungen (%)

13.13.4 Anionenaustauscher

Lösungen:

- Wasser bidest.
- Essigsäure 100%
- Ammoniak 25%
- 3,4-HPPA- und 3,3-HPPA-Standardlösung
- dotierter Fleischextrakt

Säulenkonditionierung: 2 Säulenfüllungen Methanol
4 mL Essigsäure 6%
2 Säulenfüllungen bidest. Wasser
(Fluss: ca. 1-2 mL/min)

Probenaufgabe: 10 mL 3,4-HPPA- und 3,3-HPPA-Standardlösung in
Ammoniaklösung 0,05 mol/L
oder 10 mL dotierten Fleischextraktes (gekoppelt mit
Varian Bond Elut C18)

Waschen: 1 mL Wasser

Elution: 4 mL 1% Essigsäure in MeOH

Die Gehalte an 3,4-HPPA und 3,3-HPPA wurden mittels HPLC/FLD bestimmt. Die jeweiligen Wiederfindungen für 3,4-HPPA und 3,3-HPPA sind in Tabelle 49 und 50 dargestellt.

Tabelle 49: Ergebnis des Anionenaustauschertests auf der Merck LiChrolut SAX (200 mg) mit 3,4-HPPA- und 3,3-HPPA-Standardlösung

	Probenaufgabe		WFR (%)*		Elution	
	3,4-HPPA	3,3-HPPA	Waschen		3,4-HPPA	3,3-HPPA
			3,4-HPPA	3,3-HPPA		
Standardlösung	0	0	0	0	98	100

*WFR = Mittelwert aus 3 Messungen (%)

Tabelle 50: Ergebnis des Anionenaustauschertests SAX mit dotierter Krabbenmatrix (gekoppelt mit C18-SPE)

Säule	Typ	Probenaufgabe		WFR (%)*		Elution	
		3,4-HPPA	3,3-HPPA	Waschen		3,4-HPPA	3,3-HPPA
				3,4-HPPA	3,3-HPPA		
C18, SAX	500 mg, 200 mg	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	77	72

*WFR = Mittelwert aus 3 Messungen (%)

n.b. = nicht bestimmt

13.14 Verfahrensvalidierung zur Bestimmung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure

Je 10 g Nordseegarnelen wurde in 50-mL-Zentrifugenröhrchen genau eingewogen. Dann wurde jeweils 0,5 mL der entsprechenden 3,4-HPPA und 3,3-HPPA-Standardlösung zugegeben (Standardlösung 3,4-HPPA: 80, 40, 20 µg/L in bidest H₂O und Standardlösung 3,3-HPPA: 90, 45, 23 µg/L in bidest H₂O). Ab hier entspricht die Aufarbeitung dem in Anhang 13.15 beschriebenen Verfahren. Es resultieren Proben mit einer Konzentration an 3,4-HPPA von 8, 4 und 2 µg/kg.

13.15 Bestimmung der 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure in γ -bestrahlten proteinreichen Lebensmitteln

Ca. 10 g Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerbrust wurden in 50-mL-Zentrifugenröhrchen genau eingewogen. Es wurden 2 mL Perchlorsäure 12%, 1 mL MeOH und 3,3-HPPA-Standardlösung dazugegeben. Das Zentrifugengefäß wurde mit bidestilliertem Wasser auf 20 mL aufgefüllt. Der Inhalt des Zentrifugenröhrchens wurde mit dem Ultraturax 10 Sekunden lang homogenisiert. Es wurde für 20 Minuten bei 10 000 × g und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein zweites Zentrifugenröhrchen abgegossen. Ca. 15 mL

des Überstandes wurden auf eine konditionierte SPE C18 Säule gegeben (siehe Anhang 13.13.3). Der Eluat wurde auf einen konditionierten Anionenaustauscher gegeben (siehe Anhang 13.13.4). Anschließend wurde Methanol im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 0,5 mL bidest. Wasser aufgenommen. Nach Membranfiltration (0,2 μm) wurde die Probe in die HPLC injiziert (HPLC-Bedingungen siehe Anhang 13.3.3).

13.16 Ergebnisse der γ -Bestrahlung der Lebensmittel – Bestimmung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure

Die Gehalte an 3,4-HPPA in Nordseegarnelen, Black Tiger Garnelen, Tiefseegarnelen und Hühnerbrust, die im gefrorenen Zustand bestrahlt wurden, sind in Tabelle 51 angegeben.

Tabelle 51: 3,4-HPPA-Gehalte ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht) in gefrorenen bestrahlten Proben, Dosisleistung 2 kGy/h, unglasiert

		Nordseegarnelen	Black Tiger Garnelen	Tiefseegarnelen	Hühnerbrust
0 kGy	MW*	0,54	0,21	1,20	0,56
	Sx*	0,26	0,16	0,04	0,21
1 kGy	MW	1,76	1,06	2,74	1,41
	Sx	0,21	0,06	0,19	0,16
3 kGy	MW	4,83	4,93	3,40	4,07
	Sx	0,76	0,58	0,29	0,41
7 kGy	MW	9,02	8,73	5,57	14,39
	Sx	1,08	1,36	0,81	1,29
9 kGy	MW	22,23	24,43	9,00	23,04
	Sx	2,94	8,52	1,65	4,89

* MW = Mittelwert aus 2 Bestimmungen, angegeben in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht

* Sx = Standardabweichung

Tabelle 52: 3,4-HPPA-Bildung ($\mu\text{g}/\text{kg}$ pro kGy) in gefrorenen bestrahlten Proben

Bestrahlungs- stufe	Nordseegarnelen	Black Tiger Garnelen	Tiefseegarnelen	Hühnerbrust
1 kGy	1,76	1,06	2,74	1,41
3 kGy	1,61	1,60	1,13	1,36
7 kGy	1,29	1,24	0,80	2,06
9 kGy	2,47	2,70	1,00	2,56

13.17 Chromatogramme

Chromatogramm eines Standardgemisches von p-Tyr, m-Tyr, α -Methyl-p-Tyr, o-Tyr und Phe

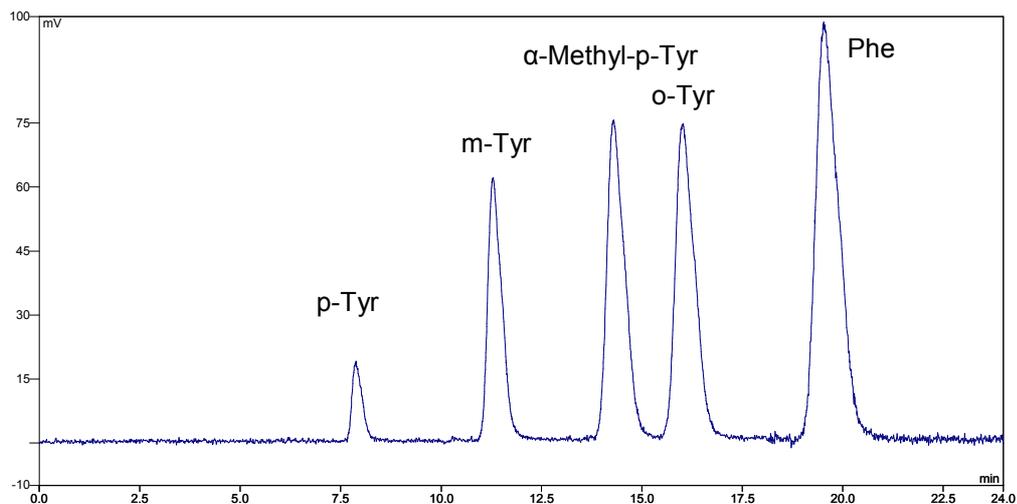


Abbildung 63: HPLC-Chromatogramm des Standardgemisches von p-Tyr, m-Tyr, α -Methyl-p-Tyr, o-Tyr und Phe, FL-Detektion bei 275/305 und 258/288 nm, Chromatographiebedingungen siehe 13.3

Chromatogramm von unbestrahlten Nordseegarnelen

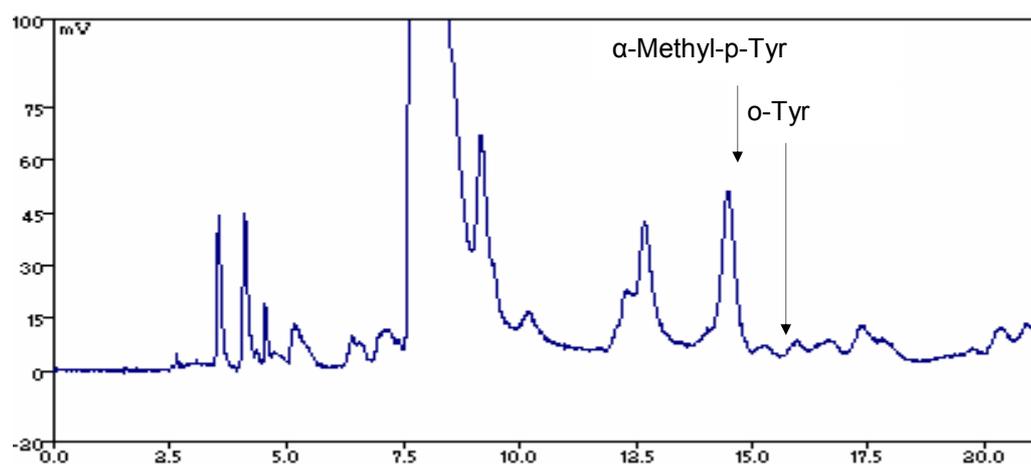


Abbildung 64: HPLC-Chromatogramm von unbestrahlten Nordseegarnelen, dotiert mit α -Methyl-p-Tyr, FL-Detektion bei 275/305 nm, Chromatographiebedingungen siehe 13.3

Chromatogramm von bestrahlten Nordseegarnelen

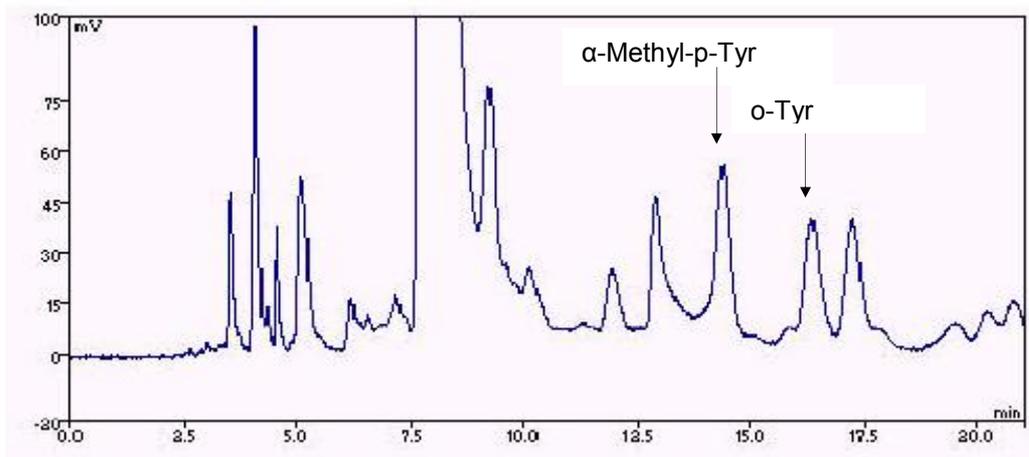


Abbildung 65: HPLC-Chromatogramm einer mit 5 kGy bestrahlter Nordseegarnele, dotiert mit α -Methyl-p-Tyr, FL-Detektion bei 275/305 nm, Chromatographiebedingungen siehe 13.3, Bestrahlungsbedingungen siehe 13.6.

Chromatogramm von unbestrahlter Hühnerbrust

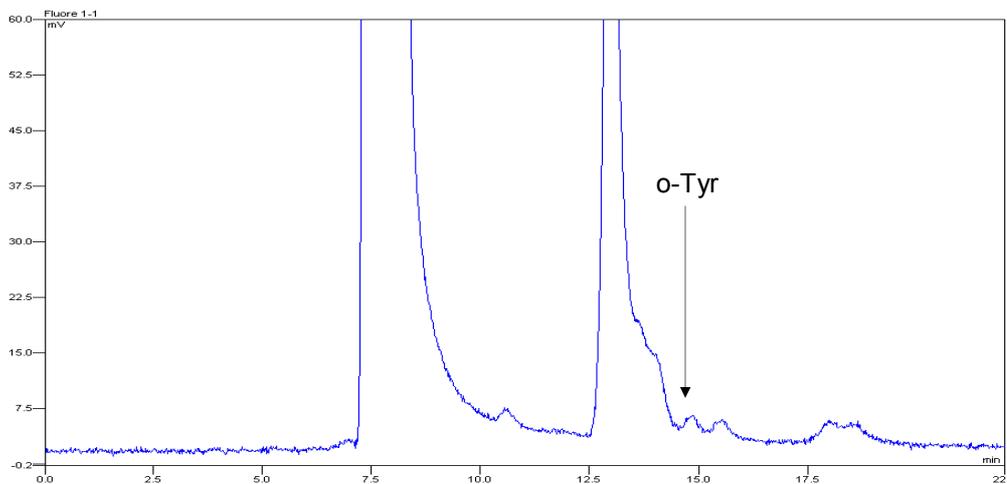


Abbildung 66: HPLC-Chromatogramm von unbestrahlter Hühnerbrust, FL-Detektion bei 275/305 nm, Chromatographiebedingungen siehe 13.3

Chromatogramm von bestrahlter Hühnerbrust

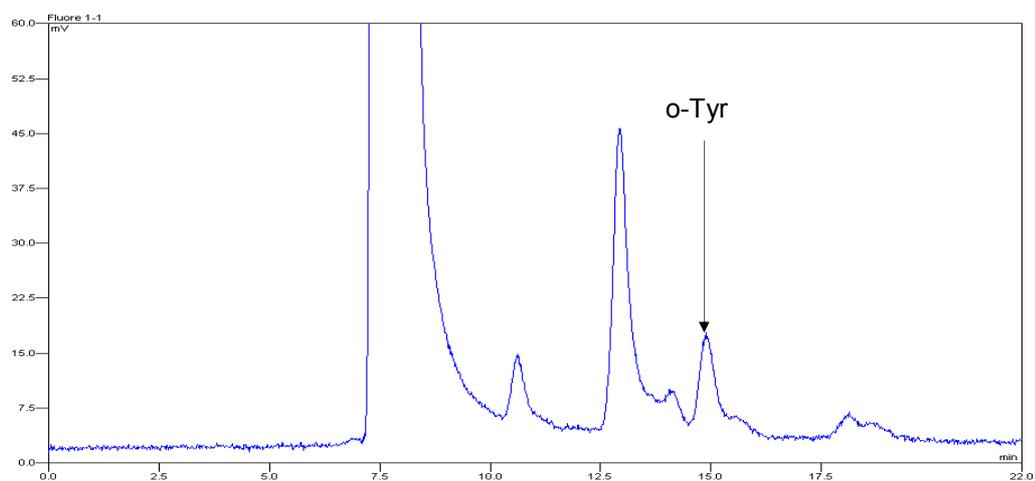


Abbildung 67: HPLC-Chromatogramm einer mit 5 kGy bestrahlten Hühnerbrust, FL-Detektion bei 275/305 nm, Chromatographiebedingungen siehe 13.3, Bestrahlungsbedingungen siehe 13.6

Massenselektive Detektion

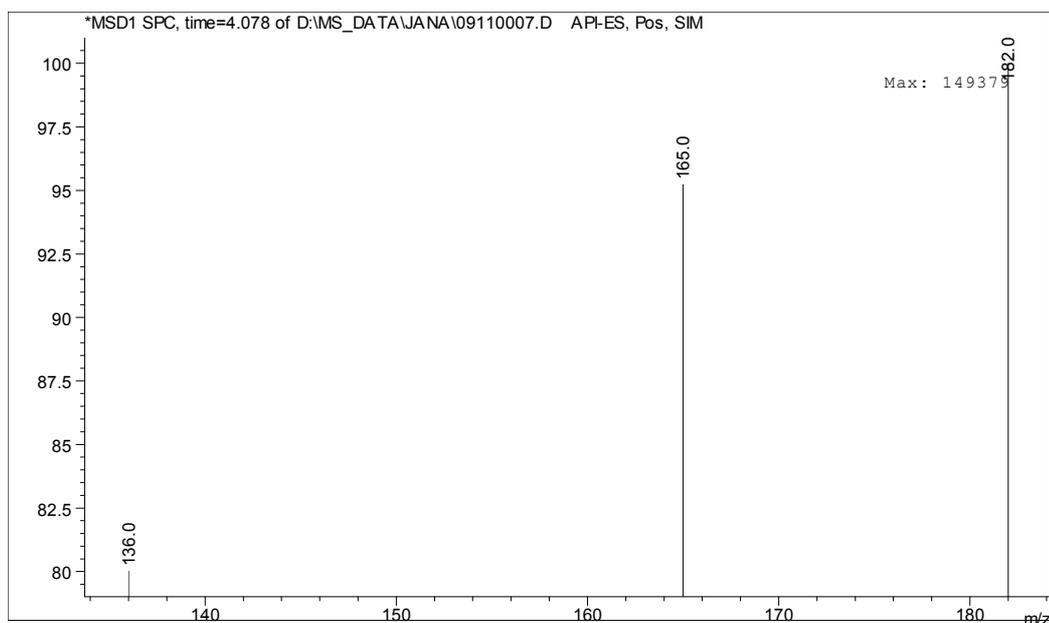


Abbildung 68: Massenspektrum von o-Tyr, Detektorbedingungen siehe 13.3.2

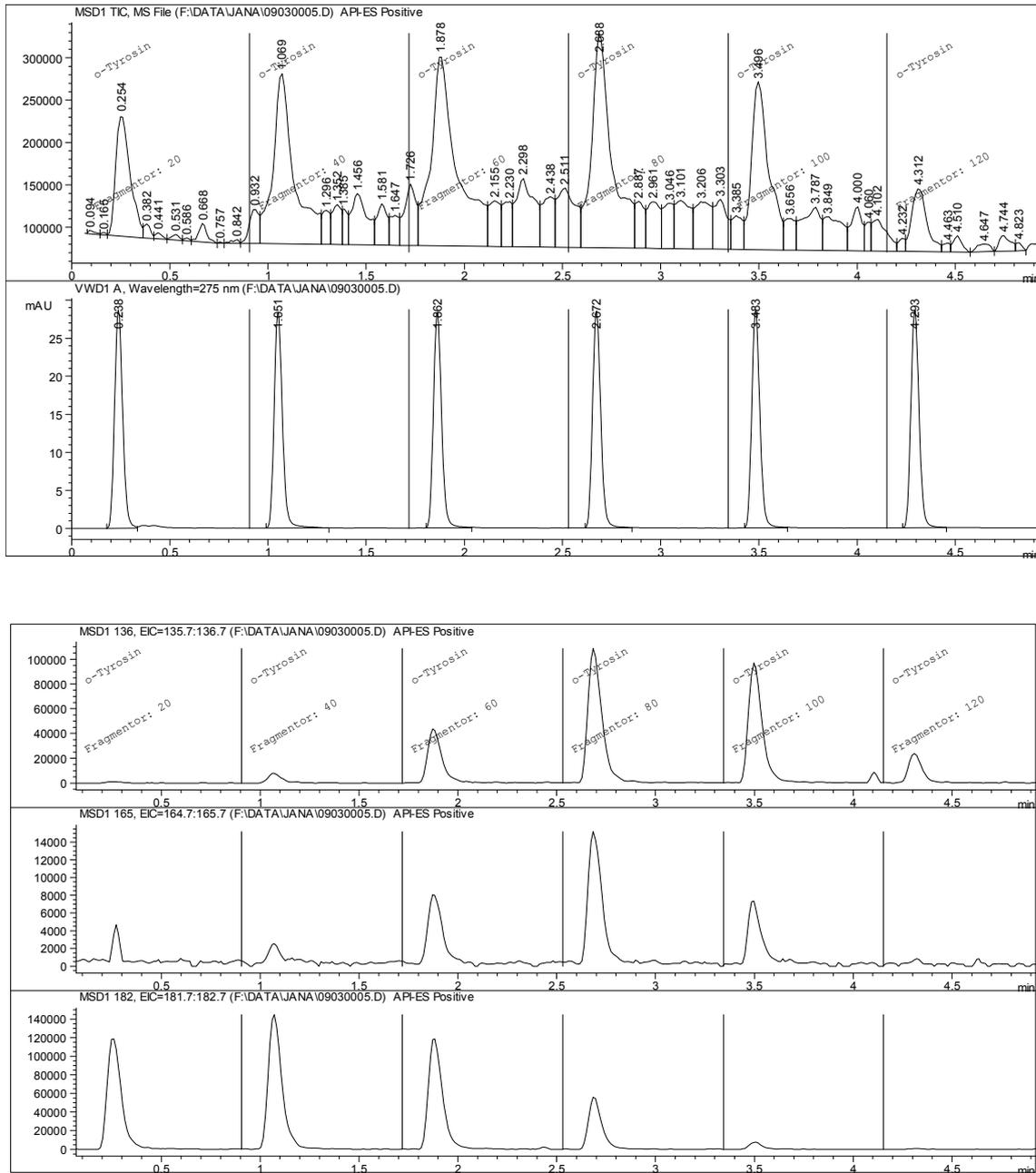


Abbildung 69: Fließinjektionsanalyse von o-Tyr bei unterschiedlichen Fragmentorspannungen, AP-ESI-positiv-MSD, weitere Detektorbedingungen siehe 13.3.2

Chromatogramm eines Standardgemisches von 3,4-HPPA, 3,3-HPPA und 3,2-HPPA

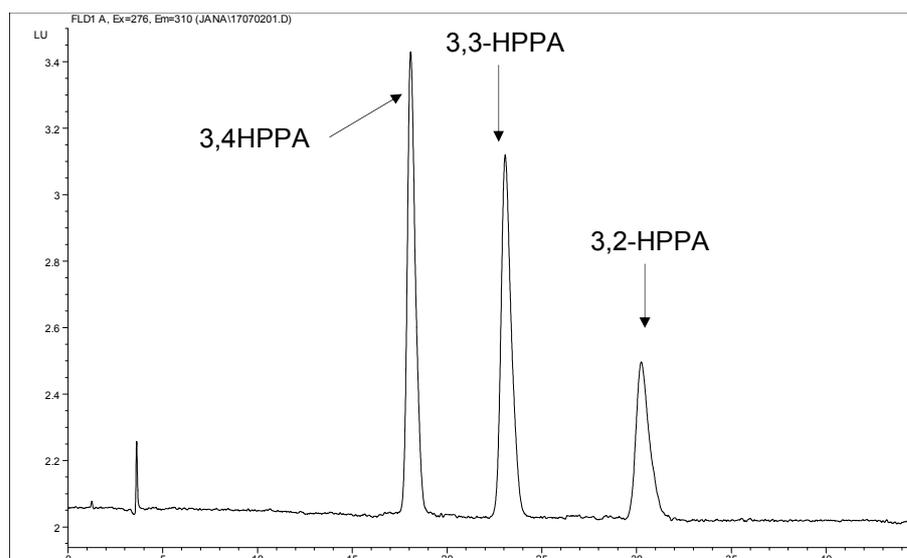


Abbildung 70: HPLC-Chromatogramm des Standardgemisches von 3,4-HPPA, 3,3-HPPA und 3,2-HPPA, FL-Detektion bei 276/310 nm, Chromatographiebedingungen siehe 13.3.3

Chromatogramm von unbestrahlten Nordseegarnelen

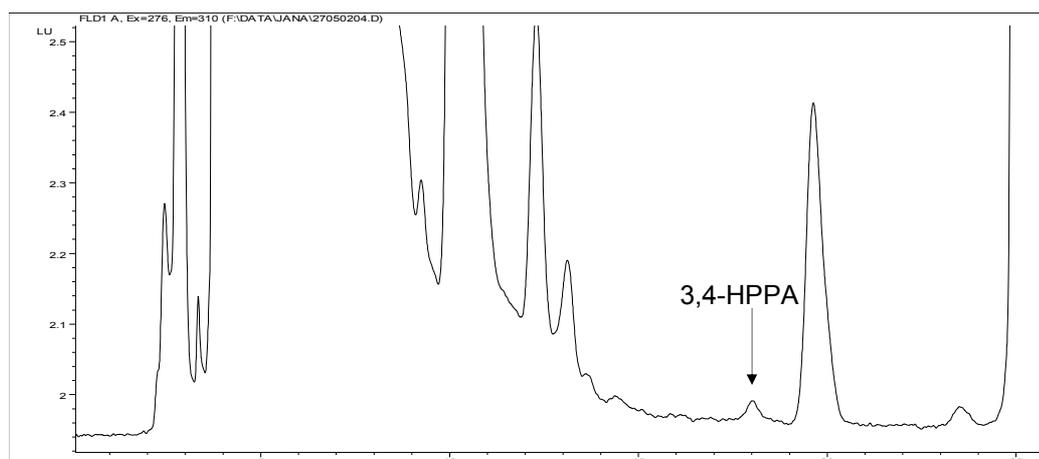


Abbildung 71: HPLC-Chromatogramm von unbestrahlten Nordseegarnelen, FL-Detektion bei 276/310 nm, Chromatographiebedingungen siehe 13.3.3

Chromatogramm von bestrahlten Nordseegarnelen

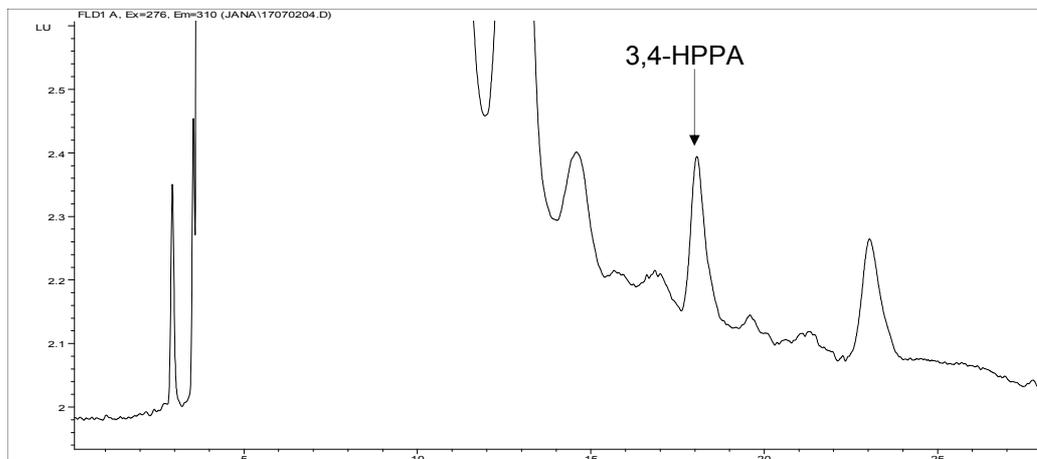


Abbildung 72: HPLC-Chromatogramm einer mit 3 kGy bestrahlter Nordseegarnele, FL-Detektion bei 276/310 nm, Chromatographiebedingungen siehe 13.3.3, Bestrahlungsbedingungen 13.6

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Jana Huňková
Geburtsdatum: 18. April 1974
Geburtsort: Slaný, Tschechische Republik

Ausbildung

1980 – 1988 Grundschohle Kladno
1988 - 1992 Gymnasium Kladno
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium und Berufsausbildung

09/1992 – 06/1997 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität für Chemie und Technologie in Prag
09/1996-03/1997 Diplomarbeit
06/1997 Diplom in Lebensmittelchemie und Staatsexamen
seit 10/1998 Promotion an der Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie

Beruflicher Werdegang

10/1997 – 9/1998 Praktikum an der Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
04/1999 - 9/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie