Nachweis von bestrahltem Frischfleisch (Poulet) mittels o-Tyrosin = Analysis of o-tyrosine as a method for the identification of irradiated fresh meat (chicken)

Autor(en): **Meier, W. / Bürgin, Renate / Fröhlich, D.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **80 (1989)**

Heft 1

PDF erstellt am: **04.06.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-983590

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **80**, 22–29 (1989)

W. Meier, Renate Bürgin und *D. Fröhlich,* Kantonales Laboratorium, Zürich

Nachweis von bestrahltem Frischfleisch (Poulet) mittels o-Tyrosin

Analysis of o-Tyrosine as a Method for the Identification of Irradiated Fresh Meat (Chicken)

Einleitung

Im Anschluss an eine WHO-Arbeitsgruppentagung über Kontrollverfahren für strahlenbehandelte Lebensmittel und deren gesundheitliche Auswirkungen im November 1986 in München wurden u. a. folgende Empfehlungen publiziert (1):

Die Bestrahlung von Lebensmitteln (bis zu einer Maximaldosis von 10 kGy) ist als ein wirksames Verfahren zur Verhinderung von Lebensmittelverderb und Lebensmittelkrankheiten einzustufen. Die zuständigen Behörden sollten den Nutzen dieses Verfahrens erkennen und es gesetzlich zulassen.

Es müssen Analysenverfahren entwickelt werden, mit deren Hilfe festgestellt werden kann, ob eine Strahlenbehandlung stattgefunden hat oder nicht. Auf diese Weise könnte man nicht nur illegale Einfuhren von bestrahlten Lebensmitteln verhindern, sondern man könnte auch überprüfen, ob den Kennzeichnungsbestimmungen Genüge getan wurde. Ausserdem wäre es mit Hilfe bestimmter Verfahren möglich, eine Mehrfachbestrahlung von Lebensmitteln zu verhindern.

Da in der Schweiz gegenwärtig eine Bestrahlung von Lebensmitteln nicht zugelassen ist, werden zu Kontrollzwecken Analysenmethoden benötigt, die es erlauben, eindeutig zwischen bestrahlter und unbestrahlter Ware zu unterscheiden und, wenn immer möglich, auch die angewandte Strahlendosis zu bestimmen. An der oben erwähnten Arbeitsgruppentagung wurden die möglichen Analysenmethoden für die verschiedenen Lebensmittel vorgestellt; es wurde aber deutlich hervorgehoben, dass weltweit noch keine Methode existiert, um bestrahlte Lebensmittel sicher nachzuweisen. Im Anschluss an diese Arbeitsgruppentagung wurde vom Bundesamt für Gesundheitswesen eine schweizerische Arbeitsgruppe gebildet, welche die erfolgversprechendsten Methoden für den Nachweis einer Bestrahlung zu brauchbaren Vorschriften weiter bearbeiten soll.

Nachfolgend wird die Ausarbeitung einer einfachen Methode für den Nachweis von o-Tyrosin in bestrahltem Pouletfleisch beschrieben.

Beim Bestrahlen wässeriger Lösungen von Phenylalanin bilden sich o-, m- und p-Tyrosin (2). In bestrahltem Hühnerfleisch liess sich ebenfalls o-Tyrosin nachweisen, wobei einerseits die Trisilylderivate von o-Tyrosin mit Hilfe der Kapillargaschromatographie/Massenspektrometrie (3) und andererseits die Phenylisothiocyanatderivate mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie/UV-Detektion (4) nachgewiesen wurden. Das gebildete o-Tyrosin soll zur angewandten Strahlendosis proportional sein, wobei bei einer Bestrahlung mit 5 kGy (der für Fleisch vorgeschlagenen Dosis) ca. 5 mg o-Tyrosin pro kg Fleisch entstehen.

In unserem Labor versuchten wir, sowohl die GC- als auch die HPLC-Methode nachzuarbeiten. Nach der üblichen Aufarbeitung (Gefriertrocknung des Fleisches, Hydrolyse mit 6 n Salzsäure während 24 Stunden bei 110 °C) stellten wir nicht die vorgeschlagenen Phenylisothiocyanatderivate der Aminosäuren, sondern die stabileren Dabsylderivate (5,6) her. Es war aber nicht möglich, das o-Tyrosin selbst in einem mit 40 kGy bestrahlten Poulet zu bestimmen.

Da es uns nicht auf Anhieb gelang, einheitliche Trisilylderivate von o-Tyrosin herzustellen, veresterten wir o-Tyrosin mit Isobutanol und acylierten anschliessend mit Heptafluorbuttersäureanhydrid (7); diese Derivate liessen sich ausgezeichnet chromatographieren. Aber sowohl mit dem Elektroneneinfangdetektor als auch mit dem Massenspektrometer konnten wir im mit 40 kGy bestrahlten Poulet o-Tyrosin nicht detektieren.

Bei einer Literaturrecherche entdeckten wir eine Arbeit von *Ishimitsu, Fujimoto* and *Ohara* (8), die o- und m-Tyrosin neben p-Tyrosin in Blutserum mit HPLC und Fluoreszenzdetektion bestimmten. Es gelang uns, diese Methode derart zu optimieren, dass o-Tyrosin selbst bei einer Bestrahlung mit 0,5 kGy noch nachweisbar ist (siehe Resultate).

Experimentelles

Reagentien

Acetonitril, RS per HPLC, Carlo Erba
Wasser, bidest.
Salzsäure, p. a., 1 n
Salzsäure 30%, Suprapur, Merck
Stickstoff, flüssig
Natriumchlorid, p. a.
DL-o-Tyrosin, SIGMA, lösen in 1 n Salzsäure

Geräte

Cutter, z. B. Cut-O-Mat, Typ H4R
Flexi-Dry Model No. FDX-1-84, Brouwer
Hochvakuumpumpe
Trockenschrank (110 oder 150 °C)
Hydrolysegefässe mit Rotaflohahn, Glasbläserei W. Möller, Zürich
HPLC-System
CM 4000 Multiple Solvent Delivery System, LDC/Milton Roy
F-1000 Fluorescence Spectrophotometer, Merck/Hitachi
D-2000 Chromato-Integrator, Merck/Hitachi
Säule: Hypersil-5-ODS, 250 × 4,6 mm, Stagroma (Wallisellen)
Eluenten: A: 1% Acetonitril, 1% Natriumchlorid, bidest. Wasser
B: 50% Acetonitril, 0,5% Natriumchlorid, bidest. Wasser
C: 80% Acetonitril, bidest. Wasser
Gradient: 0–12 min: 100% A, isokratisches Chromatogramm
12–17 min: 100% B, Herausspülen von Störsubstanzen
17–35 min: 100% A, Rekonditionieren der Säule
Fluss: 1 ml/min
Detektion: Fluoreszenzdetektor: Anregung 275 nm, Emission 305 nm
Injektion: 20 µl
Jeweils am Abend die Säule mit Eluent C und den Injektor mit bidest. Wasser spülen.
Retentionszeiten (siehe Abb. 1): p-Tyrosin 6 min
m-Tyrosin 8 min
o-Tyrosin 11 min

Arbeitsvorschrift

- Pouletfleisch homogenisieren und gefriertrocknen.
- 60 mg gefriergetrocknetes Fleisch mit 300 µl bidest. Wasser und 600 µl Salzsäure 30% (= 6 n Salzsäure) während 1 h bei 150 °C oder während 24 h bei 110 °C im Hydrolysegefäss hydrolisieren.
- 5 × Verdünnen des Hydrolysates mit bidest. Wasser.
- Injektion von 20 µl in den Flüssigkeitschromatographen, Auswertung über die Höhe.

Bestrahlungsversuche

5 Brustfilets (F 1–F 5) und 2 Schenkel (S 4 und S 5) von garantiert unbestrahlten, ca. 10 Wochen alten Hühnern wurden mehrheitlich an der Eidgenössischen Forschungsanstalt Wädenswil (EFA, Dosisleistung 1 kGy/h) und zum Teil am Universitätsspital (USZ, Dosisleistung 4,2 kGy/h) mit Co-60 bestrahlt. Die übrigen Parameter können den folgenden Tabellen entnommen werden.

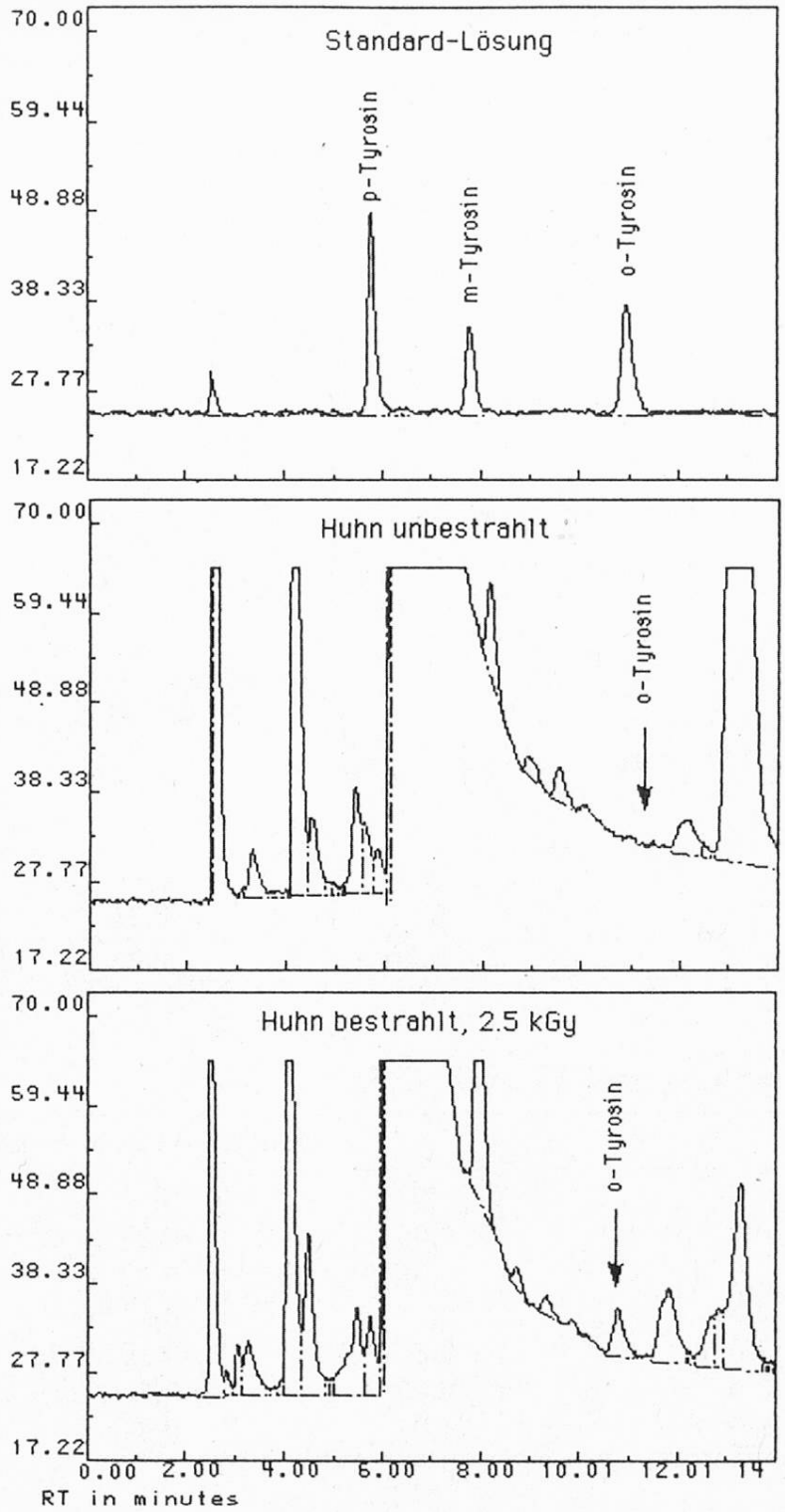

Abb. 1. HPLC von o-Tyrosin-Bedingungen siehe Text

Resultate

Alle Proben wurden während 24 Stunden bei 110 °C hydrolysiert; später konnte aber gezeigt werden, dass eine Hydrolyse während 1 Stunde bei 150 °C zu den gleichen Resultaten führt.

Die analytische Nachweisgrenze für die Bestimmung von o-Tyrosin beträgt 0,01 mg/kg.

In einem mit 2,5 kGy bestrahlten Brustfilet wurde 5mal der Gehalt an o-Tyrosin bestimmt, wobei ein Variationskoeffizient von 4,7% erreicht wurde.

Tabelle 1. Gehalt an o-Tyrosin in unbestrahltem Pouletfleisch

Probe	Lagerung	Gehalt an o-Tyrosin (mg/kg)
F 1–F 5	1 Tag bei 5 °C	< 0,01
S 4 und S 5		< 0,01
F 1	17 Tage bei 5 °C	0,03
S 4		< 0,01
F 1	17 Tage bei –18 °C	< 0,01
S 4		< 0,01
F 2	45 Tage bei –18 °C	< 0,01
F 3		< 0,01

Tabelle 2. Bestrahlung mit 4,2 kGy/h (USZ)

Dosis in kGy	Gehalt an o-Tyrosin in mg/kg		
	F 1	F 4	S 4
2,2	0,32	0,26	0,34
4,4	0,56	0,64	0,54

Tabelle 3. Bestrahlung mit 1 kGy/h (EFA)

Dosis in kGy	Gehalt an o-Tyrosin in mg/kg		
	F 1	F 4	S 4
0,5	0,04	0,035	0,045
1,0	0,065	0,06	0,065
2,5	0,15	0,12	0,13
5,0	0,26	0,32	0,29
10,0	0,45	0,40	0,54
20,0	1,04	0,84	1,10

Tabelle 4. Bestrahlung an der EFA bei –18 °C und Raumtemperatur

Dosis in kGy	Temperatur	Gehalt an o-Tyrosin in mg/kg	
		F 2	F 3
2,5	–18 °C	0,10	0,105
5,0		0,05	0,14
2,5	ca. 20 °C	0,10	0,15
5,0		0,25	0,26

Diskussion

Die beschriebene Methode ist einfach, da die Aminosäuren nicht derivatisiert werden müssen, schnell und benötigt keine sehr teuren Analysengeräte. Der Gehalt an o-Tyrosin ist abhängig von der angewandten Dosis (siehe Abb. 2), der Dosisleistung und der Temperatur während der Bestrahlung. Mit dieser Methode ist es möglich, eine Bestrahlung von Pouletfleisch nachzuweisen; aus den obengenannten Gründen kann aber die Dosis nicht bestimmt werden. In weiteren Arbeiten muss überprüft werden, wie stabil das gebildete o-Tyrosin während der Lagerung ist und ob sich tatsächlich o-Tyrosin bei der Lagerung von unbestrahlten Poulets bei 5 °C bildet, da die zwei durchgeführten Versuche widersprüchlich sind.

Als nächstes werden wir in Grossanlagen bestrahlte Poulets untersuchen und abklären, ob mit dieser Methode auch in anderen Lebensmitteln wie Schweinefleisch, Fisch, Meeresfrüchten und getrocknetem Fleisch eine Bestrahlung nachgewiesen werden kann.

Für gewisse Fälle kann es notwendig sein, über eine Bestätigungsmethode zu verfügen. Wir versuchen deshalb, den N-Heptafluorbutyryl-isobutylester von o-Tyrosin mittels LC/GC-Kopplung zu bestimmen.

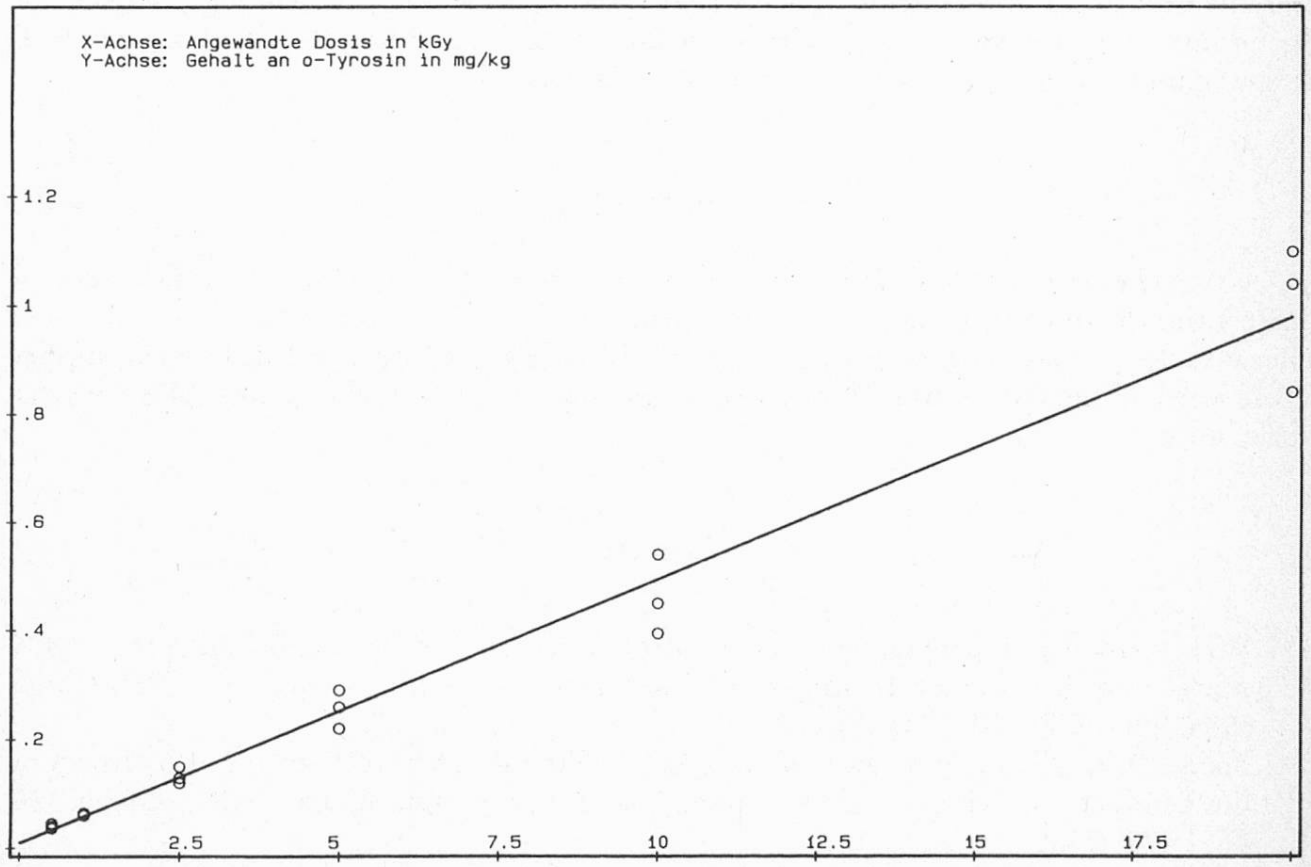

Abb. 2. Gehalt an o-Tyrosin bezüglich angewandter Dosis

Dank

Wir danken
- dem BAG, Abteilung Lebensmittelkontrolle, für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit
- den Herren *H. J. Zehnder,* Eidg. Forschungsanstalt Wädenswil, und Dr. *S. Bodmer,* Universitätsspital Zürich, für die Durchführung der Bestrahlungen
- Herrn Dr. *B. Zimmerli,* BAG, für die Diskussion der Versuchsplanung und der Resultate.

Zusammenfassung

Es wird eine Methode beschrieben, die es erlaubt, durch Bestimmen des o-Tyrosingehaltes mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie und Fluoreszenzdetektion eine stattgefundene Bestrahlung von frischem Pouletfleisch schnell und einfach nachzuweisen. Da der Gehalt an o-Tyrosin auch von der Strahlungsleistung und der Temperatur abhängt, kann die angewandte Dosis nicht bestimmt werden.

Résumé

Une méthode simple et rapide fondée sur le dosage de l'o-tyrosine par chromatographie en phase liquide à haute performance avec détection de fluorescence est décrite pour déceler une irradiation de viande de poulet fraîche. Etant donné que la teneur en o-tyrosine dépend non seulement de la dose mais encore du mode d'application de l'irradiation et de la température, la dose appliquée ne peut être déterminée.

Summary

Using the described method for the analysis of o-tyrosine by HPLC with fluorescence detection, the irradiation of fresh chicken meat can be determined in a simple and fast way. Because the formation of o-tyrosine depends not only on the dose but also on the applied dose rate and the temperature during the irradiation it is not possible to control the irradiation dose.

Literatur

1. WHO-Arbeitsgruppentagung über Kontrollverfahren für strahlenbehandelte Lebensmittel und deren gesundheitliche Auswirkungen. Neuherberg/München, 17.–21. Nov. 1986, Nr. ICP/CEH 038 (S).
2. *Simic, M. G., Gajewski, E.* and *Dizdaroglu, M.:* Kinetics and mechanisms of hydroxyl radical-induced crosslinks between phenylalanine peptides. Radiat. Phys. Chem. **24**, 465–473 (1985).
3. *Karam, L. R.* and *Simic, M. G.:* Ortho tyrosin as a marker in post irradiation dosimetry (PID) of chicken. WHO-Arbeitsgruppentagung über Kontrollverfahren für strahlenbe-

handelte Lebensmittel und deren gesundheitliche Auswirkungen. Neuherberg/München, 17.–21. Nov. 1986. ISH-Heft 125, S. 297–304, Bundesgesundheitsamt.
4. *Karam, L. R.:* National Bureau of Standards, Gaithersburg, MD (USA): Private Mitteilung (1987).
5. *Fischer, R.* ETHZ, Abteilung Biochemie 1: Private Mitteilung (1987).
6. *Hughes, G. L., Frutiger, S.* and *Fonck, C.:* Quantitative high performance liquid chromatographic analysis of Dabsyl-amino acids within 14 min. J. Chromatogr. **389**, 327–333 (1987).
7. *MacKenzie, S.:* Gaschromatographic analysis of amino acids as their N-heptafluorobutyryl-isobutyl esters. AOAC **70**, 155–160 (1987).
8. *Ishimitsu, S., Fujimoto, S.* and *Akira, O.:* Determination of m-tyrosine and o-tyrosine in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. J. Chromatogr. **378**, 222–225 (1986).

Dr. W. Meier
Renate Bürgin
D. Fröhlich
Kantonales Laboratorium
Postfach
CH-8030 Zürich