

Christophe Goldbeck

Einflüsse der chemischen Zusammensetzung
und der Reaktionsbedingungen
auf die Bildung von heterocyclischen aromatischen Aminen
in Modellsystemen und Reaktionsaromen

2004

Lebensmittelchemie

Einflüsse der chemischen Zusammensetzung und der Reaktionsbedingungen auf
die Bildung von heterocyclischen aromatischen Amininen in Modellsystemen und
Reaktionsaromen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich
Chemie und Pharmazie
der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Christophe Goldbeck
aus Recklinghausen

-2004-

Dekan: Prof. Dr. J. Leker

Erster Gutachter: Prof. Dr. K. Eichner

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. H.-P. Thier

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2004, 22.04.2004, 28.04.2004

Tag der Promotion: 28.04.2004

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. K. Eichner, der mich zu dieser Arbeit motivierte. Ich bedanke mich für die Überlassung des interessanten Arbeitsthemas und dafür, dass er mir jederzeit für bereichernde Diskussionen zur Verfügung stand und mir wertvolle Ratschläge erteilen konnte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn O. Frandrup-Kuhr, der es mir ermöglichte, die von ihm neu entwickelten GC-MS Meßmethode zu nutzen, und für seine Hilfe und Unterstützung insbesondere in Bezug auf die EDV. Außerdem danke ich allen anderen Mitarbeitern für die bereichernde Zusammenarbeit, die mich diese drei Jahre immer in guter Erinnerung behalten lassen werden.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. T. Bernsmann vom CVUA, der es mir ermöglichte, die für die Arbeit erforderlichen Messungen mit Hilfe der LC-MS durchzuführen.

Bei den von mir während der wissenschaftlichen Abschlussarbeit betreuten Studenten T. Lewtschenko und R. Lang möchte ich mich für die Mitarbeit bedanken.

Für die Unterstützung im privaten Umfeld möchte ich mich sehr bei meiner Ehefrau, Nicole Goldbeck, und meinen Schwiegereltern Hiltrud und Karl-Heinz Wojtyczka bedanken ohne die meine Promotion kaum möglich gewesen wäre.

1	Einleitung - Allgemeiner Kenntnisstand	1
1.1	Allgemeines über die Bedeutung der heterocyclischen aromatischen Amine (HAAs)	1
1.2	Einteilung und Bildung der HAAs	4
1.2.1	Aminocarboline (Pyridoimidazole, Pyridoindole),	6
1.2.2	Aminoimidazoazaarene (Chinoline, Chinoxaline, Pyridine)	8
1.3	Einfluss von Temperatur, Zeit, Wassergehalt und sonstigen Faktoren auf die Bildung von HAAs	14
1.3.1	Temperatur und Reaktionszeit	14
1.3.2	Wassergehalt	15
1.3.3	Antioxidantien - Prooxidantien	15
1.3.4	Reduzierende Zucker	16
1.4	Vorkommen von HAAs in einzelnen Lebensmitteln	16
1.5	Mutagenität und Carcinogenität	19
1.5.1	Stoffwechsel und metabolische Aktivierung der HAAs	19
1.5.2	Ames-Test	21
1.5.3	Anticarcinogene	22
1.6	Problemstellung und Zielsetzung	23
2	Analytik von heterocyclischen aromatischen Aminen HAAs	27
2.1	Einleitung	27
2.2	Extraktion	29
2.3	Reinigung des Rohextraktes	31
2.3.1	Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan	31
2.3.2	Flüssig-Flüssig-Verteilung an Extrelut	33
2.4	Festphasenextraktion	35
2.5	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	43
2.5.1	Auswahl des Säulenmaterials und der Fließmittel	43
2.5.2	Detektion	49
2.5.2.1	Photodiodenarray-Detektor (DAD)	49
2.5.2.2	Elektrochemischer Detektor	51
2.5.2.3	Fluoreszenzdetektor	52
2.6	Gaschromatographie	57

2.7	Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)	58
3	Untersuchungen zur Bildung von HAAs in Modellsystemen	62
3.1	Einleitung	62
3.1.1	Allgemeines	62
3.1.2	Zusammensetzung der Modellsysteme	67
3.1.3	Einstellung der Gleichgewichtsfeuchtigkeiten	68
3.2	Einfluss der Reaktionspartner auf die HAA-Bildung	69
3.2.1	Einfluss der Molmengenverhältnisse der Reaktionspartner	69
3.2.2	Einfluss der Temperatur auf die HAA-Bildung	76
3.2.3	Einfluss der Wasseraktivität auf die HAA-Bildung	82
3.2.4	Einfluss der Reaktionszeit auf die HAA-Bildung	86
3.2.4.1	Einfluss der Erhitzungsdauer auf die HAA-Bildung bei Niedertemperatur- Langzeit-Erhitzung	86
3.2.4.2	Einfluss der Erhitzungsdauer auf die HAA-Bildung bei Hochtemperatur- Kurzzeit-Erhitzung	87
3.2.5	Vergleich der Reaktionsweise reduzierender Zucker bei der HAA-Bildung	91
3.2.6	Untersuchung der HAA-Bildung in wasserarmen Modellsystemen bei Verwendung von Alanin	95
3.3	Untersuchungen zur Bildung von HAAs aus Zwischenstufen der Maillard-Reaktion	100
3.4	Untersuchung der Bildung von HAAs bei der Verwendung von Arginin anstelle von Kreatinin	101
3.5	Untersuchungen der Bildung von HAAs bei der Verwendung von Ammoniumionen anstelle von Aminosäuren	102
4	Einfluss der Ascorbinsäure auf die HAA-Bildung	104
4.1	Einleitung	104
4.2	Einfluss der Ascorbinsäure auf die HAA-Bildung im wässrigen Milieu	108
4.2.1	Einfluss der Molmengenverhältnisse	108
4.2.2	Einfluss des pH-Wertes	110
4.3	Einfluss der Ascorbinsäure auf die HAA-Bildung unter wasserarmen Bedingungen	111
4.3.1	Einfluss des Molmengenverhältnisses	111

4.3.2	Einfluss von Schwermetallionen auf die HAA-Bildung	114
4.3.3	Einfluss des aw-Wertes auf die HAA-Bildung	116
5	Untersuchungen zur Bildung von HAAs in Reaktionsaromen	118
5.1	Einleitung	118
5.2	Einfluss von reduzierenden Zuckern auf die HAA-Bildung in wässrigen Reaktionsaromen	121
5.3	Einfluss reduzierender Zucker auf die HAA-Bildung in wasserarmen Reaktionsaromen	123
6	Zusammenfassung	126
7	Arbeitsvorschriften	130
7.1	Allgemein verwendete Geräte, Hilfsmittel, Chemikalien und Reagenzien	130
7.2	Probenaufbereitung	131
7.2.1	Extraktion	131
7.2.2.1	Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan	132
7.2.2.2	Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan an Extrelut	133
7.2.3	Festphasenextraktion	134
7.3	Bestimmung der HAAs durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	134
7.3.1	Herstellung des Triethylammoniumphosphat-Puffer pH 3	135
7.3.1.1	Lichrospher 60 RP-select b (5 µm), 250 mm x 4 mm, 1 ml/min	135
7.3.1.2	Supersphere RP-select b (4 µm), 250 mm x 2 mm, 0,2 ml/min	136
7.3.1.3	Supersphere RP-select b (4 µm), 250 mm x 3 mm, 0,3 ml/min	136
7.3.2	Herstellung des Ammoniumformiat-Puffers pH 3,2 Supersphere RP-select b (4 µm), 250 mm x 3 mm, 0,3 ml/min	137
7.3.3	Herstellung des Triethylammoniumphosphat-Puffer pH 7	138
7.3.3.1	Lichrospher 60 RP-select b (5 µm), 250 mm x 4 mm, 1 ml/min	138
7.3.3.2	Supersphere RP-select b (4 µm), 250 mm x 3 mm, 0,3 ml/min	138
7.4	Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Modellsystemen, Fleischextrakt und Reaktionsaromen durch HPLC	139
7.4.1	Probenaufbereitung	139
7.4.2	Derivatisierung von Aminosäuren; Hochdruckflüssigkeitschromatographie	139

	(HPLC)	
7.5	Bestimmung der HAAs durch LC-MS	141
7.6	Gaschromatographie-Massenspektrometrie der HAAs	143
7.7	Herstellen verschiedener Modellsysteme	143
7.7.1	Wasserarme Modellsysteme	144
7.7.2	Wasserreiche Modellsysteme	144
7.8	Bestimmung des Wassergehaltes	145
7.9	Desaktivierung von Glasgeräten	145
8	Literatur	146
9	Abkürzungsverzeichnis	156

1. Einleitung - Allgemeiner Kenntnisstand

1.1 Allgemeines über die Bedeutung der heterocyclischen aromatischen Amine (HAAs)

In den westlichen postindustriellen Gesellschaften zählt Krebs zu den wichtigsten Krankheiten. Dabei handelt es sich um eine Sammelbezeichnung bösartiger Geschwülste. In der Bundesrepublik Deutschland wird jeder vierte Todesfall durch Krebs verursacht. Jährlich erkranken zwischen 330.000 und 380.000 Menschen neu an dieser Krankheit. Krebs steht somit in der Todesursachenstatistik nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen an zweiter Stelle. Bei den Frauen steht Brustkrebs an erster Stelle, gefolgt von Dickdarm- und Mastdarmkrebs. Bei den Männern ist die Zahl der Neuerkrankungen an Lungenkrebs, Prostatakrebs, Mastdarm- und Dickdarmkrebs am höchsten. Die Ursachen hierfür sind im Einzelfall nicht immer einfach zu ermitteln. Dennoch können über epidemiologische Studien Faktoren ermittelt werden, die die Krebsentstehung begünstigen. So konnten Doll und Peto [1] 1981 einen Zusammenhang zwischen den Lebensgewohnheiten und dem Risiko, an Krebs zu erkranken, ermitteln (Abb. 1).

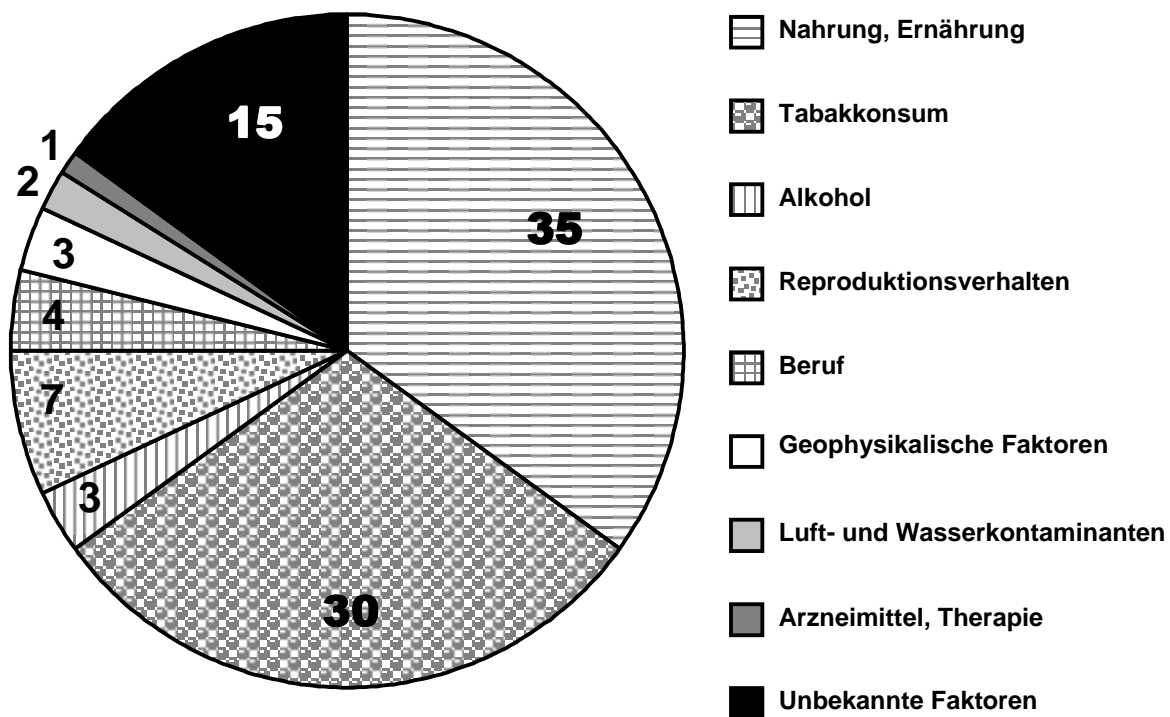


Abb. 1 Faktoren in %, die für Krebserkrankungen verantwortlich sind; Doll & Peto, 1981

Bei dieser Studie stellte sich heraus, dass die Hauptursachen für die Krebsentstehung sich aus den alltäglichen Lebensgewohnheiten ergeben. Die Ernährung und der Tabakkonsum stellen dabei die beiden wichtigsten Faktoren dar. Neuere Studien von Bailey (1993) [2], Williams (1995) [3] (Abb. 2) und Becker & Wahrendorf (1997) [4] konnten dieses Ergebnis bestätigen.

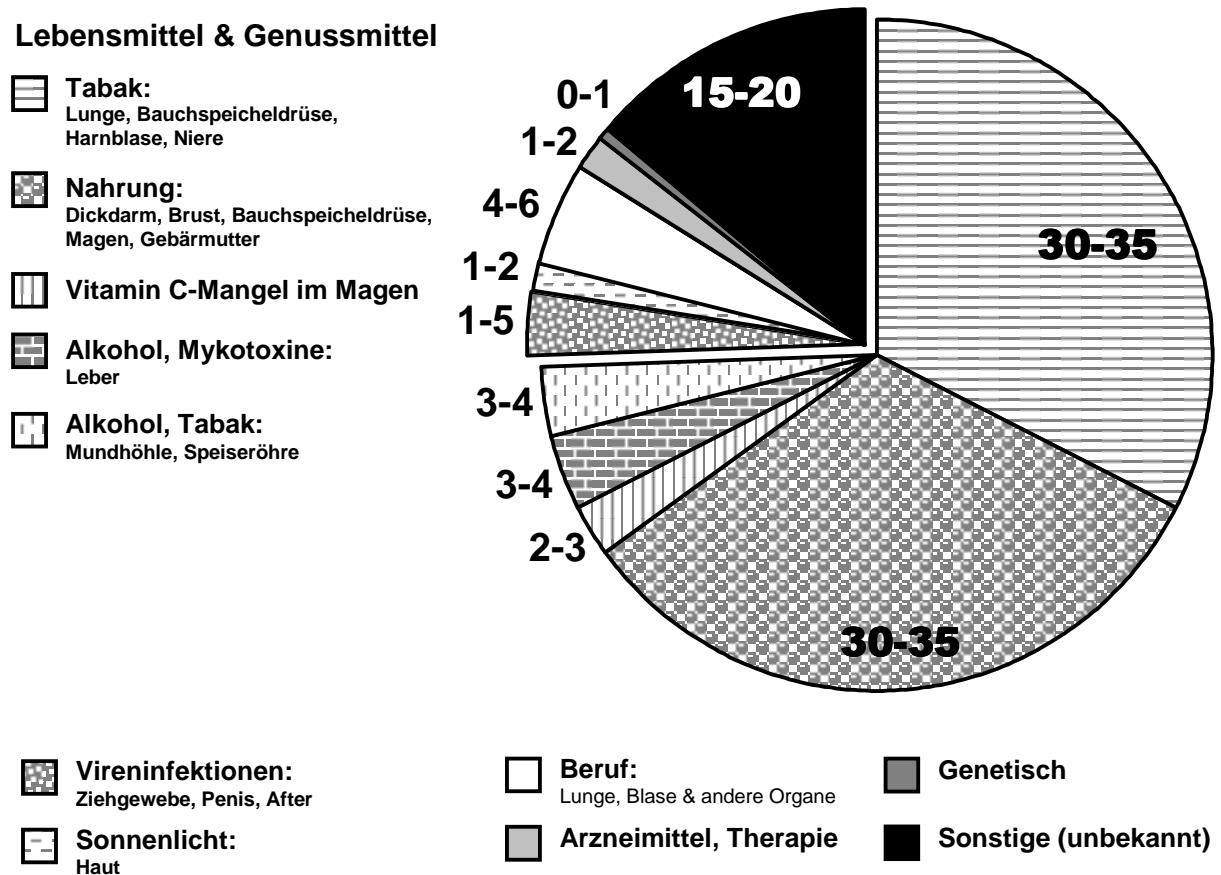


Abb. 2 Faktoren in %, die für Krebserkrankungen verantwortlich sind; Williams, 1995

Wie aus Abb. 2 hervorgeht, machten die durch Lebensmittel und Genussmittel verursachten Malignome ca. $\frac{3}{4}$ der gesamten Krebsneuerkrankungen aus. Während der Tabakkonsum die wichtigste Ursache für Bronchialkarzinome darstellt, ist die Ernährungsweise hauptverantwortlich für die Entstehung von Colon- und Mammakarzinomen. Man geht davon aus, dass 90% der Darm- und 50% der Brustkrebsfälle durch eine Umstellung der Essgewohnheiten vermieden werden könnten. Neben einer Fehlernährung, bestehend aus zu wenig pflanzlicher Kost und zu fetthaltigen Lebensmitteln, sind auch verschiedene Mutagene und Karzinogene für die nahrungsbedingte Krebsentstehung verantwortlich. Mutagene und Karzinogene können in drei Gruppen unterteilt werden:

1. Natürlich vorkommende, z.B. Mykotoxine
2. Kontaminanten, z.B. Pestizide
3. Bei der Zubereitung und Verarbeitung von Lebensmitteln entstehende, z.B. polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs), Acrylamid und heterocyclische aromatische Amine (HAAs).

Im Sinne des vorbeugenden Verbraucherschutzes ist es notwendig, die Gehalte an Mutagenen und Karzinogenen in Lebensmitteln kontinuierlich zu minimieren, im besten Fall vollständig zu vermeiden. Unsere Arbeit beschäftigt sich mit der Entstehung von HAAs in Reaktionsaromen während der Erhitzung. In erhitztem Fleisch und Fisch können diese Verbindungen mitunter in beträchtlichem Umfang festgestellt werden [5, 6]. Je nach Essgewohnheit tragen diese Verbindungen mehr oder weniger zum Krebsrisiko bei.

Mitte der siebziger Jahre fiel auf, dass in Amerika das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken, in den letzten Jahren stetig zunahm. Um herauszufinden, ob die Ursache hierfür genetisch oder ernährungsbedingt ist, wurde die Krebsrate der in den USA lebenden Japaner mit den in Japan lebenden verglichen [7]. Dabei stellte es sich heraus, dass die in den USA lebenden Japaner deutlich häufiger an Darmkrebs erkrankten als die in Japan lebenden. Eine genetische Ursache konnte somit ausgeschlossen werden. Unterschiede ließen sich insbesondere bei den Essgewohnheiten feststellen. Die in Amerika lebenden Japaner aßen deutlich größere Mengen an gebratenem Fleisch als die in Japan lebenden.

Bereits 1975 konnte die Mutagenität von Lebensmitteln mit Hilfe des von Ames entwickelten Testes [8] nachgewiesen werden. Bei dieser Methode verwendet man verschiedene Histidin-Mangelmutanten des Bakteriums *Salmonella typhimurium* auf histidinfreiem Medium in Anwesenheit der zu untersuchenden Substanz und bestimmt die Anzahl der durch Mutation gebildeten, auf dem histidinfreiem Medium wachsenden Revertanten, wodurch eine Aussage über die Zahl der Mutationen und somit über die Mutagenität einer Substanz ermöglicht wird. Eine genaue Identifizierung der dabei verantwortlichen Mutagene ist mit diesem Test aber nicht möglich. Mutagene PAKs, die erst unter Pyrolysebedingungen entstehen, konnten in zahlreichen stark erhitzten Lebensmitteln und in Tabakrauch nachgewiesen werden. Sugimura [9] stellte fest, dass beim Tabakrauch weniger die Menge der gebildeten PAKs als vielmehr der Proteingehalt der Tabakblätter mit der Mutagenität des Kondensates korrelierte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden verschiedene Aminosäuren und Proteine verbrannt, das mutagene Potential des Kondensates

bestimmt und nach Verbindungen gesucht, die mit dem mutagenen Potential korrelierten. Dabei wurde 1977 von Sugimura erstmals das HAA Trp-P-1, ein Pyrolysat der Aminosäure Tryptophan, identifiziert [10]. Es handelt sich dabei um ein Pyridoimidazol, das erst bei der Verbrennung entsteht, während ein hohes mutagenes Potential in Fleisch und Fisch schon unter gewöhnlichen Kochbedingungen zu beobachten war. Entscheidend für die Mutagenität ist dabei neben der Temperatur und dem Gehalt an Aminosäuren der Kreatiningehalt. In Anwesenheit dieser Verbindungen entstehen schon ab 100°C die Aminoimidazoazaarene (AIAs), die erstmals 1980 von Kasai et al. [11] aus gegrillten Sardinen isoliert wurden. Dabei wurden von ihm die Imidazochinoline (IQs) IQ und MeIQ (vgl. Kap. 1.2.2, Tabelle 3) nachgewiesen. 1981 konnte von derselben Arbeitsgruppe das Imidazochinoxalin (IQx) MeIQx in gebratenem Rindfleisch nachgewiesen werden [12].

1.2 Einteilung und Bildung der HAAs

Die HAAs lassen sich in zwei Grundstrukturen einteilen. Es handelt sich dabei nach Hatch et al. [13] um die Aminocarboline (Pyridoimidazole und -indole) und um die Aminoimidazoazaarene (Imidazochinoline, -chinoxaline, und -pyridine) (Abb. 3). In Tabelle 1 werden HAAs aufgeführt, die in Lebensmitteln oder Modellsystemen nachgewiesen werden konnten.

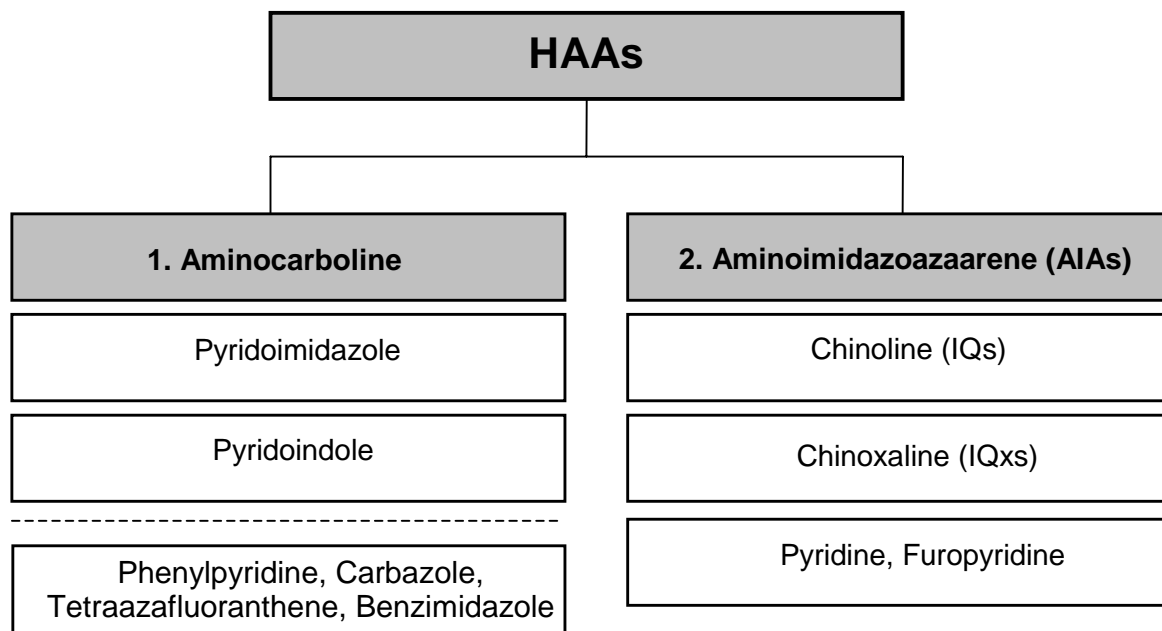


Abb. 3 Unterteilung der HAAs

Tabelle 1 Nomenklatur heterocyclischen aromatischen Amine (HAAs), die in Lebensmitteln und Modellsystemen identifiziert wurden; * von uns untersuchte HAAs

1. Aminocarboline	
Pyridoindole	
AαC	2-Amino-9H-pyrido[2,3-b]indol
MeAαC*	2-Amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indol
Harman*	1-Methyl-9H-pyrido[4,3-b]indol
Norharman*	9H-Pyrido[4,3-b]indol
Trp-P-1	3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indol
Trp-P-2	3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol
Pyridoimidazole	
Glu-P-1	2-Amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'd]imidazol
Glu-P-2	2-Aminodipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
Phenylpyridin	
Phe-P-1	2-Amino-5-phenylpyridin
Carbazol	
Lys-P-1	3,4-Cyclopentenopyrido[3,2-a]carbazol
Tetraazafluoranthren	
Orn-P-1	4-Amino-6-methyl-1H-2,5,10,10b-tetraazafluoranthren
Benzimidazol	
Cre-P-1	4-Amino-1,6-dimethyl-2-methylamino-1H,6H-pyrrollo[3,4-f]benzimidazol-5,7-dion
2. Aminoimidazoazaarene	
Chinoline	
IQ*	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin
MeIQ*	2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]chinolin
Chinoxaline	
IQ _x *	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinoxalin
4-MeIQ _x	2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
8-MeIQ _x *	2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
7,8-DiMeIQ _x *	2-Amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
4,8-DiMeIQ _x *	2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
4,7,8-TriMeIQ _x *	2-Amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
4-CH ₂ OH-8-MeIQ _x	2-Amino-4-hydroxymethyl-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
7,9-MeIQ _x	2-Amino-1,7,9-trimethylimidazo[4,5-g]chinoxalin
Pyridine	
PhIP*	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin
4-OH-PhIP	2-Amino-1-methyl-6-(4-hydroxyphenyl)imidazo[4,5-b]pyridin
1,6-DMIP	2-Amino-1,6-dimethylimidazo[4,5-b]pyridin
1,5,6-TMIP	2-Amino-1,5,6-trimethylimidazo[4,5-b]pyridin
Furopyridin	
IFP	2-Amino-1,6-dimethylfuro[3,2-e]imidazo[4,5-b]pyridin

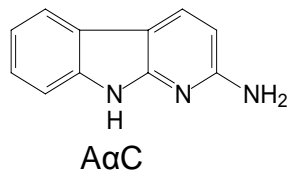
1.2.1 Aminocarboline (Pyridoimidazole, Pyridoindole)

In Abb. 4 werden die wichtigsten Aminocarboline, die in Lebensmitteln und Modellmischungen nachgewiesen wurden, dargestellt.

Aminocarboline entstehen bevorzugt bei Temperaturen oberhalb von 300°C durch Pyrolyse von Aminosäuren und Proteinen, ausgehend von einer Pyridin- bzw. Indoleinheit. Je nach Stellung des Pyridinrings unterscheidet man in α -, β - und γ -Carboline. Die γ -Carboline Trp-P-1 und Trp-P-2 entstehen aus der Pyrolyse von Tryptophan und wurden 1977 erstmals von Sugimura [10] identifiziert. Ein Jahr später identifizierte Yoshida [14] erstmals die α -Carboline A α C und MeA α C in Pyrolysaten aus Sojabohnen-Globulin. Durch Pyrolyse von Glutaminsäure wurden im selben Jahr von Yamamoto [15] die Pyridoimidazole Glu-P-1 und Glu-P-2 erhalten. Auch durch Pyrolyse von Phenylalanin, Lysin und Ornithin konnten entsprechende Produkte 1978 von Wakabayashi [16] und 1981 von Yokota [17] nachgewiesen werden. Mit der Pyrolyse von Kreatinin wurde 1991 von Nukaya [18] mit Cre-P-1 erstmals ein sauerstoffhaltiges Aminocarbolin charakterisiert.

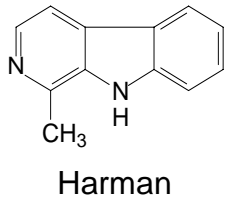
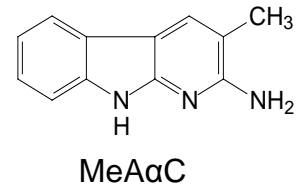
Wie der genaue Bildungsweg der Aminocarboline verläuft, ist bisher nicht bekannt [19]. Da Temperaturen von mindestens 300°C benötigt werden, ist es wahrscheinlich, dass radikalische Reaktionen im Vordergrund stehen, aus denen Fragmente hervorgehen, die zu thermisch stabilen Heterocyclen reagieren.

Die β -Carboline Harman und Norharman nehmen hier eine Sonderstellung ein. Sie sind die einzigen Carboline, bei denen keine freie Aminogruppe vorliegt. Aus diesem Grund kann bei ihnen im Ames-Test keine Mutagenität nachgewiesen werden (Kap. 1.4). Dennoch sind sie toxikologisch von Bedeutung, da sie in Anwesenheit von Anilin Comutagene sind. Diese beiden Verbindungen wurden in gekochtem Fleisch, Fisch, Fleischextrakten und Bouillons nachgewiesen [19]. Hierbei sind pyrolytische Bedingungen auszuschließen. Diese Verbindungen konnten auch in wässrigen Modellansätzen aus Mischungen von Aminosäuren, Kreatinin und Zuckern nachgewiesen werden [20, 21]. Durch einen fünffachen Überschuss an Kreatinin gegenüber dem in Fleischextrakt enthaltenen Kreatinin konnte Skog [22] die Harman-Bildung um bis zu 10 % unterdrücken und die Norharman-Bildung sogar halbieren. Bei einem Tryptophanüberschuss wurde von Skog [22] unter den gleichen Bedingungen bis zu 70mal mehr Harman und bis zu 20mal mehr Norharman nachgewiesen.

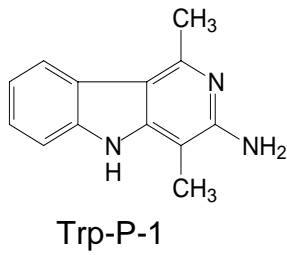
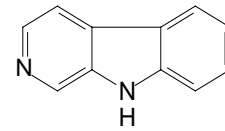


Pyridoindole

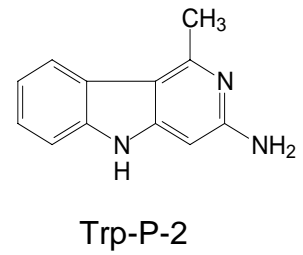
α -Carbolin



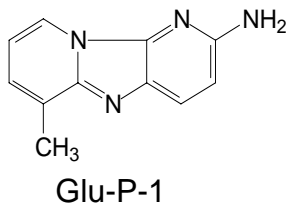
β -Carbolin



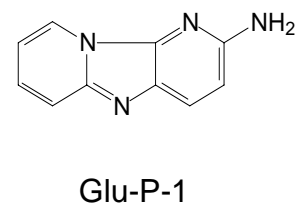
γ -Carbolin



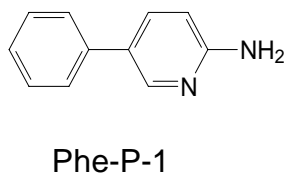
Pyridoimidazole



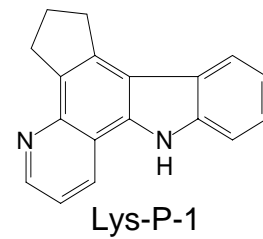
δ -Carbolin



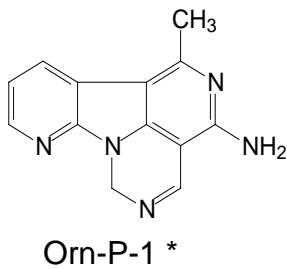
Phenylpyridin



Carbazol



Tetraazafluoranthren



Benzimidazol

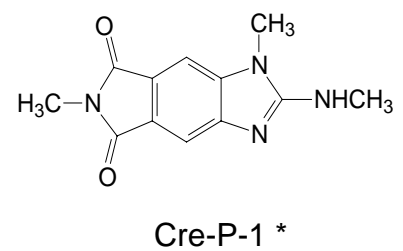


Abb. 4 Mutagene HAAs, die durch Pyrolyse von Aminosäuren und Proteinen entstehen;
* in Lebensmitteln nicht nachgewiesen

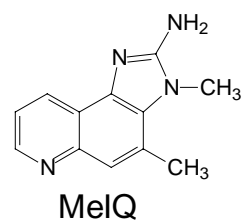
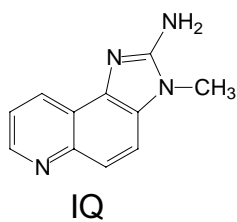
1.2.2 Aminoimidazoazaarene (Chinoline, Chinoxaline, Pyridine)

Die Aminoimidazoazaarene (AIAs) (Tabelle 2 und Abb. 5) werden bereits unter haushaltsüblichen Bedingungen während des Kochens und Bratens von Fleisch und Fisch gebildet. AIAs werden auch als „polare HAAs“ bezeichnet. Je nach Struktur werden sie in Chinoline (Aminoimidazochinoline), Chinoxaline (Aminoimidazochinoxaline), Pyridine und Furoypyridine unterschieden. Der Name „IQ-Verbindung“ kommt aus dem Englischen (Imidazoquinoline). Die Strukturaufklärung der AIAs gestaltet sich als äußerst schwierig, da sie in Lebensmitteln, d.h. in komplexer Matrix, nur in sehr niedrigen Mengen von wenigen ng/g vorkommen. Extrakte aus Lebensmitteln, die eine sehr hohe Mutagenität aufwiesen, wurden fraktioniert und die Fraktionen auf ihre Mutagenität überprüft, um so eine Eingrenzung zu ermöglichen. Die Strukturaufklärung erfolgte anschließend mit der Kombination aus Massenspektrometrie, Infrarot- und UV-Spektroskopie. Da sich von den meisten AIAs nur wenige µg unter sehr großem Aufwand isolieren lassen, sind Strukturaufklärungen mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR) kaum möglich. Zur Absicherung der Ergebnisse waren Synthesen der vermuteten Verbindungen meist unerlässlich, damit diese in ausreichender Menge zur Verfügung standen und deren Strukturen problemlos mit Hilfe der NMR aufgeklärt werden konnten. Sowohl die Mutagenität der synthetisierten Verbindungen als auch die Massen-, Infrarot- und UV-Spektren konnten so mit den aus den Fraktionen gewonnenen Verbindungen verglichen werden.

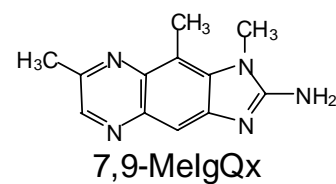
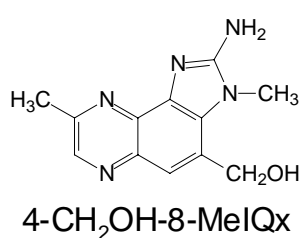
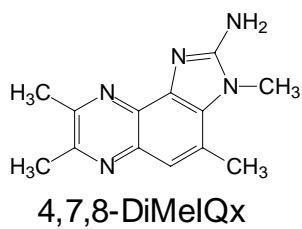
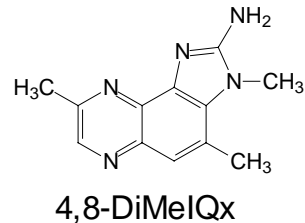
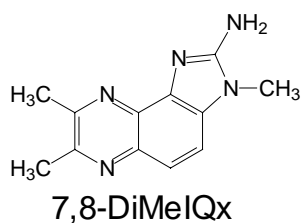
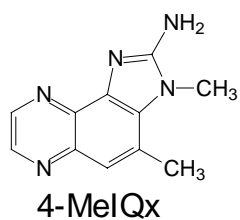
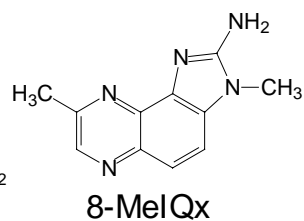
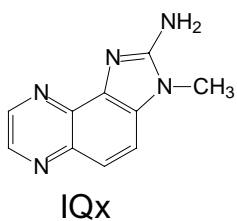
Tabelle 2 Erstmalige Identifizierung von AIAs, * in Lebensmitteln nicht nachgewiesen

Verbindung	Erstmals Identifiziert	Literatur	
IQ	gegrillte Sardinen	Kasai et al. 1980	[11]
MeIQ	gegrillte Sardinen	Kasai et al. 1981	[12]
IQx	Pyrolyse von Kreatinin + Serin	Becher et al. 1988	[23]
MeIQx	Gebratenes Rindfleisch	Kasai et al. 1981b	[12]
4,8-DiMeIQx	Modellmischung Kreatinin + Glycin + Glucose	Negishi et al. 1984	[24]
7,8-DiMeIQx	Modellmischung Kreatinin + Glycin + Glucose	Negishi et al. 1984	[24]
4,7,8-TriMeIQx*	Modellmischung Kreatinin + Threonin + Alanin + Glucose	Skog et al. 1992	[25]
4-MeIQx	Gebratenes Schweinefleisch	Vahl et al. 1987	[26]
PhIP	Gebratenes Rinderhack	Felton et al. 1986	[27]
DMIP	Gebratenes Fleisch	Becher et al. 1988	[23]
TMIP	Gebratenes Fleisch	Becher et al. 1989	[28]
OH'-PhIP	Gebratenes Rindfleisch	Kurosaka et al. 1992	[29]

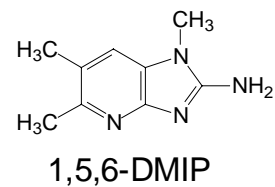
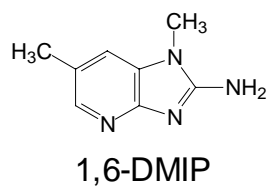
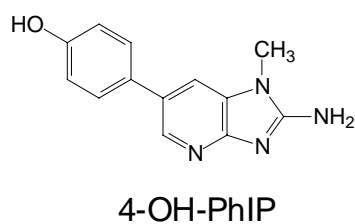
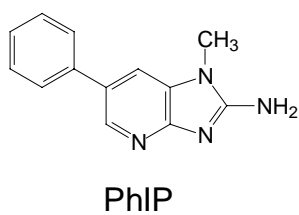
Chinoline



Chinoxaline



Pyridine



Furopyridin

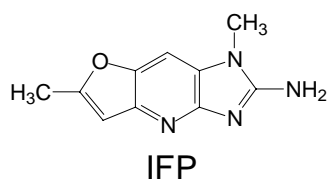


Abb. 5 Strukturformeln der Aminoimidazoarene, * in Lebensmitteln nicht nachgewiesen

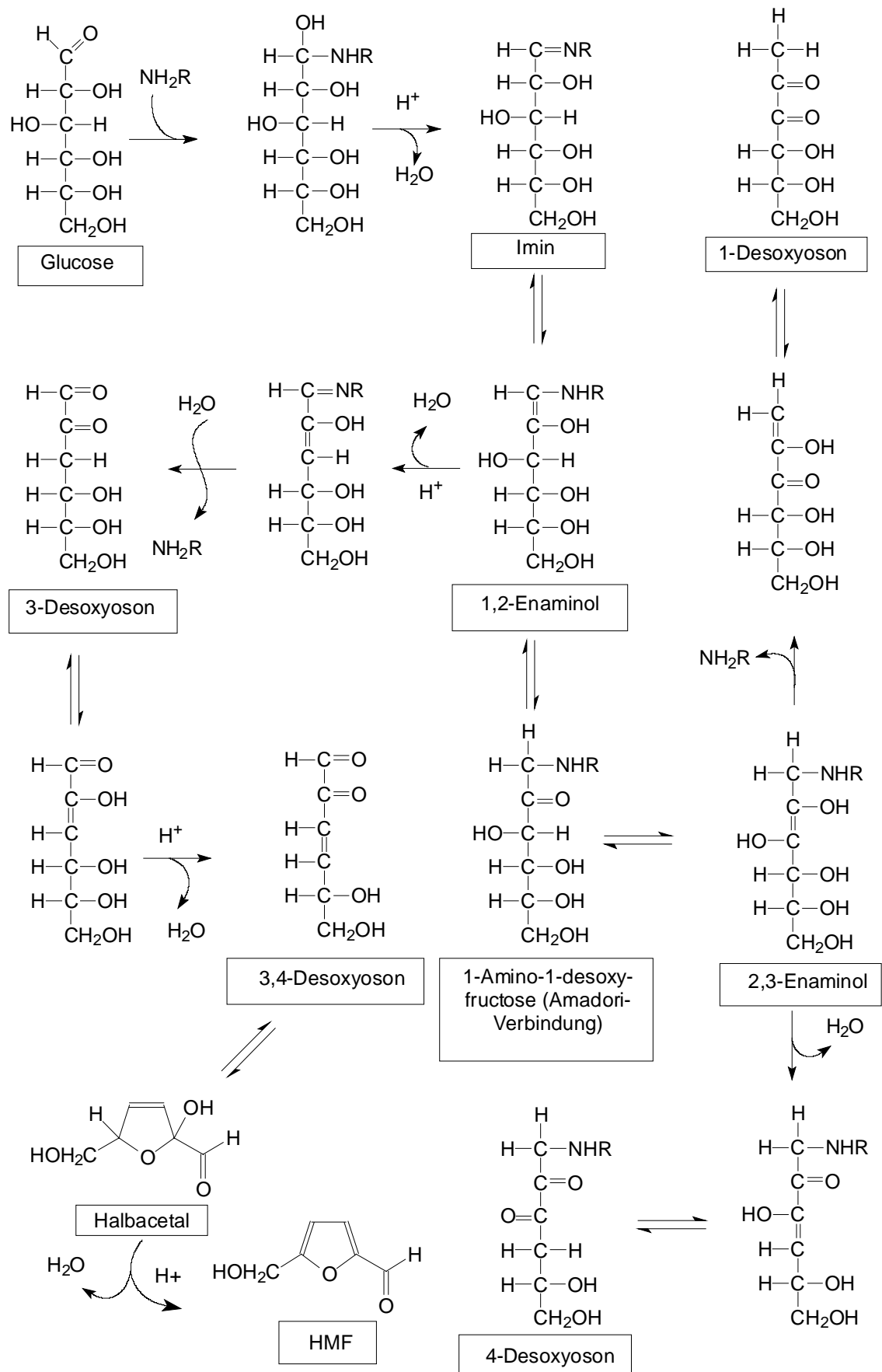


Abb.6 Erste Schritte der Maillard-Reaktion, Bildung von Desoxyosonen (α -Dicarbonylverbindungen)

Der Bildungsweg der Aminoimidazoazaarene verläuft über die Maillard-Reaktion. Wie in Abb. 6 dargestellt, entsteht in den ersten Schritten der Reaktion eine Amadori-Verbindung, die über die betreffenden 1,2- und 2,3-Enaminole zu den Desoxyosonen weiterreagiert. Die Desoxyosone stellen reaktive α -Dicarbonyl-Verbindungen dar, die im Rahmen der Strecker-Reaktion (Abb.7) mit Aminosäuren kondensieren und anschließend zu Aminoketonen und Ketocarbonsäuren weiterreagieren. Dabei decarboxylieren die Ketocarbonsäuren zu den Streckeraldehyden, während die gebildeten Aminoketone zu Pyrazinen kondensieren können.

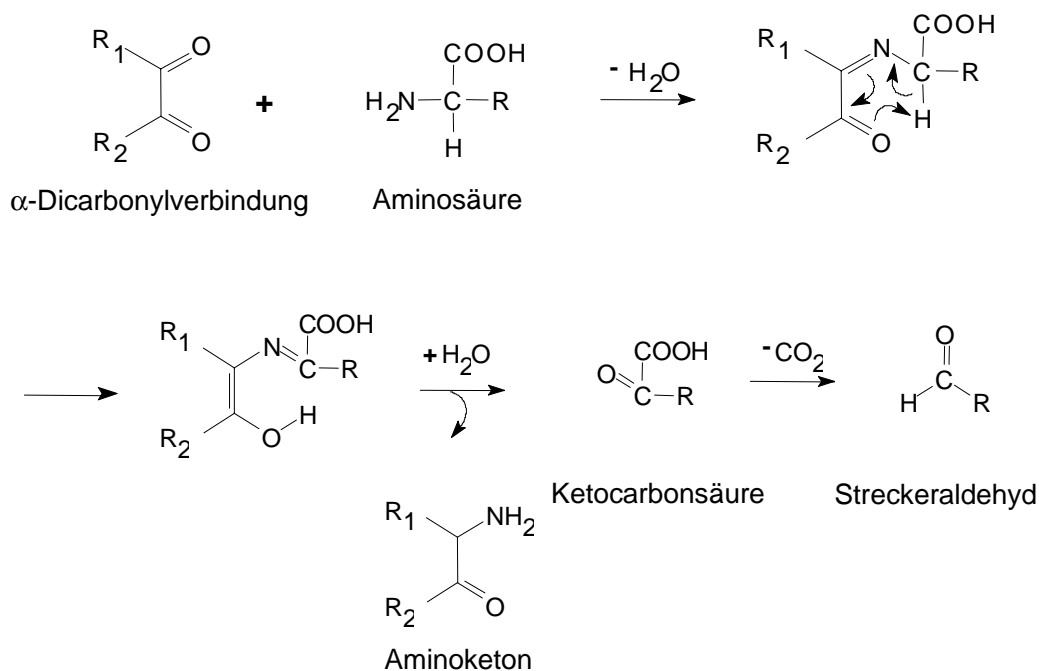


Abb. 7 „Strecker-Reaktion“

In Abb. 8a ist der von Jägerstad et al. [30, 31, 32] vorgeschlagene, auch als „Las-Vegas-Hypothese“ bezeichnete Bildungsweg von Aminoimidazochinolin- und -chinoxalinen (IQ-Verbindungen) wiedergegeben. Bei diesem Bildungsweg reagieren die im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildeten Pyridine bzw. Pyrazine mit Strecker-Aldehyden und dem in Fleisch und Fleischprodukten enthaltenen Kreatinin zu den „IQ-Verbindungen“.

Zur Bestätigung des von Jägerstad postulierten Reaktionsweges ließen Skog und Jägerstad [33] C-14 markierte Glucose mit Aminosäuren und Kreatinin reagieren. In allen gebildeten IQ-Verbindungen, bis auf PhIP, konnte C-14 nachgewiesen werden. Demnach ist die Glucose entsprechend dem von Jägerstad postulierten Bildungsweg - mit Ausnahme von

PhIP - am Aufbau der IQ-Verbindungen (Aminoimidazochinoline, IQs und Aminoimidazochinoxaline, IQxs) beteiligt.

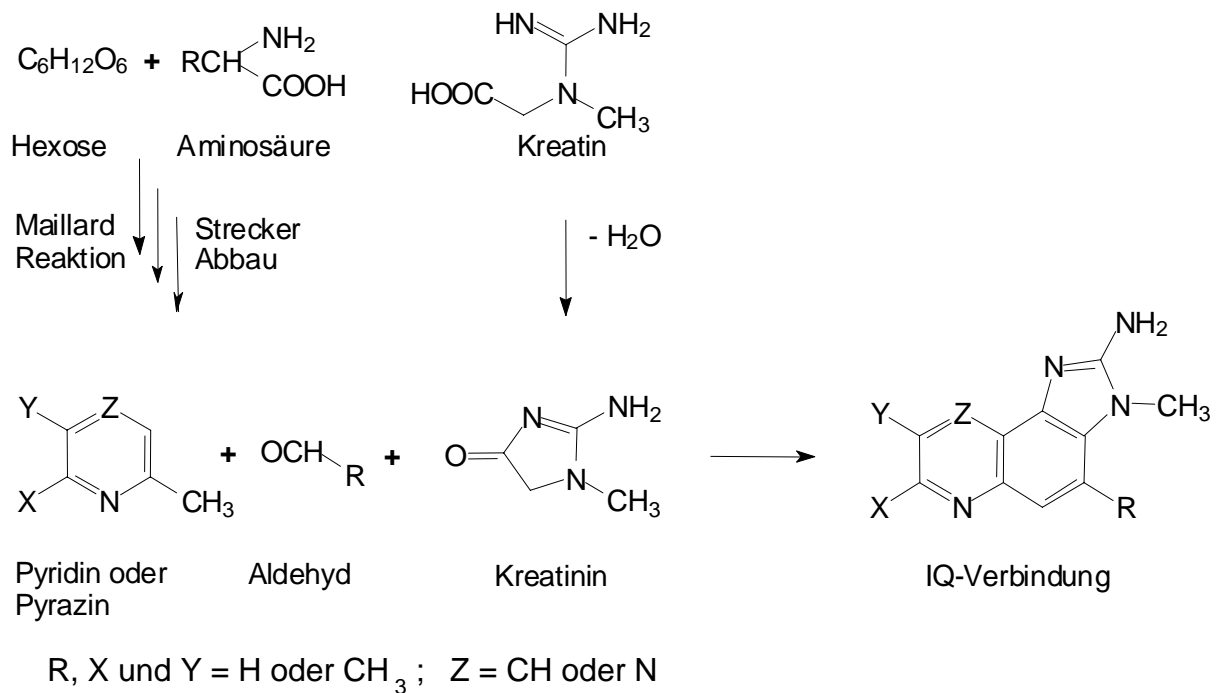


Abb. 8a Bildungsweg von IQ-Verbindungen nach der „Las Vegas Hypothese“ von Jägerstad (1983) [33]

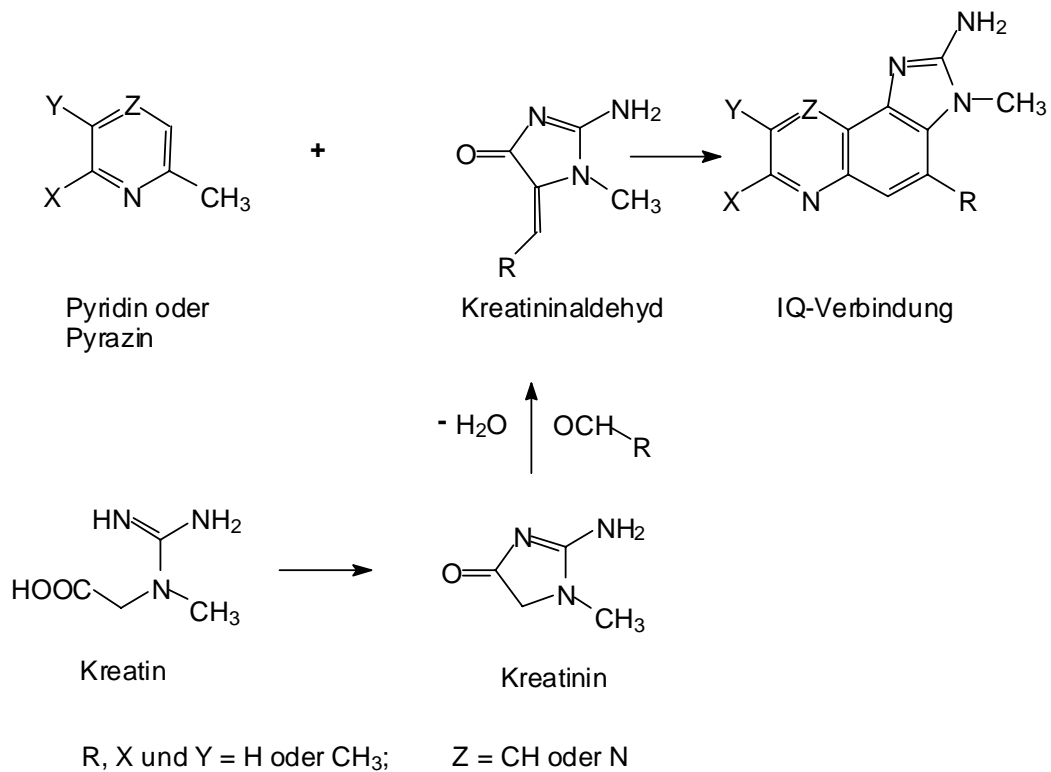


Abb. 8b Bildungsweg von IQ-Verbindungen nach Nyhammar (1986) [34]

Nyhammar [34] geht davon aus, dass sich der Aldehyd zuerst mit Kreatinin umsetzt, bevor er dann mit Methylpyridin oder Methylpyrazin zur IQ-Verbindung weiterreagiert (Abb. 8b).

Bestätigt werden die genannten Bildungswege von Lee [35], der in erhitzten Mischungen aus 2-Methylpyridin, Kreatinin und Acetylformaldehyd (Methylglyoxal), IQ nachweisen konnte.

Yoshida [36], Överik [37] und Taylor [38] beobachteten unabhängig voneinander die Bildung von IQ-Verbindungen in Modellen, die keinen reduzierenden Zucker enthielten. Demnach können reduzierende Zucker zwar an der IQ-Bildung beteiligt sein, sind aber nicht zwingend notwendig. Für die Bildung von IQ-Verbindungen notwendig sind aber immer Aminosäuren und Kreatin bzw. Kreatinin. Auch konnten Wang und Odell [39] bei der Erhitzung von Aminosäuren unter wasserarmen Bedingungen die Bildung von Pyrazinen beobachten, so dass neben dem von Jägerstad vorgeschlagenen Reaktionsweg andere Reaktionswege der IQ- und IQx-Bildung möglich sind.

Um den Bildungsweg von PhIP aufzuklären, verwendete Murcovic [40] isotopenmarkiertes Phenylalanin und isotopenmarkierten Phenylacetaldehyd. Wie aus Abb.9 hervorgeht, verläuft der von Murcovic vorgeschlagene Bildungsweg von PhIP über eine Aldolkondensation des Dimers von Phenylacetaldehyd mit Kreatinin.

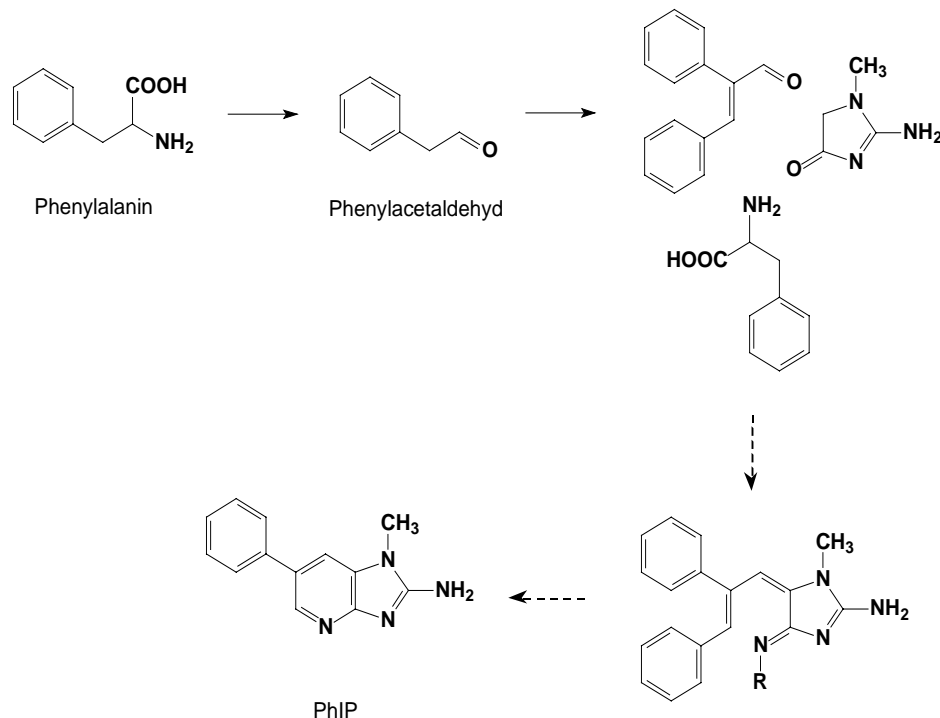


Abb. 9 Bildungsweg von PhIP nach Murcovic et al. (1999) [40]

Das Aldolkondensationsprodukt reagiert mit einer Aminosäure, hier Phenylalanin, über eine Zwischenstufe zu PhIP. Auch bei diesem Weg ist Kreatin bzw. Kreatinin beteiligt.

Untersuchungen von Manabe [41] haben ergeben, dass es noch weitere Bildungswege geben muss, da er PhIP z. B. in Wein und in Bier nachweisen konnte. Das ist bemerkenswert, wenn man den von Murcovic (Abb. 9) vorgeschlagenen Bildungsweg betrachtet, da die Rohstoffe der Bier- und Weinherstellung frei von Kreatin bzw. Kreatinin sind. Manabe [42] konnte PhIP auch in Zigarettenrauch (16,4 ng/Zigarette), in der Stadtluft von Tokyo (2,54 pg/m³ Luft) und in den Abgasen von Verbrennungsmotoren (14,1ng/g Russ) nachweisen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass PhIP durch Kontamination, z.B. über Verbrennungsabgase, in die Rohstoffe der Wein- und Bierherstellung gelangt ist. Untersuchungen von Lebensmitteln, die durch Verbrennungsabgase mit PhIP kontaminiert sein könnten, liegen kaum vor, so dass eine Abschätzung der hierüber aufgenommenen Menge an PhIP schwierig ist.

1.3 Einfluss von Temperatur, Zeit, Wassergehalt und sonstigen Faktoren auf die Bildung von HAAs

1.3.1 Temperatur und Reaktionszeit

Der Einfluss der Temperatur scheint für die Bildung der HAAs der Wichtigste zu sein und wurde in Modellsystemen (Aminosäure, Zucker, Kreatinin) ausgiebig untersucht. Unter 100 °C findet fast keine Bildung von IQ-Verbindungen statt. Bis 150 °C steigt ihre Konzentration hingegen exponentiell an [43]; über 150 °C erreicht sie innerhalb weniger Minuten ein Maximum. Ab einer Temperatur von 250 °C findet ein langsamer Abbau der IQ-Verbindungen statt. Die Konzentration von PhIP erreicht in Modellsystemen ihr Maximum bei 200 °C. Bemerkenswert ist auch, dass PhIP in einem wässrigen Modellsystem aus Glucose, Phenylalanin und Kreatinin bereits bei einer vierwöchigen Temperatureinwirkung von 37 °C gebildet wird [44]. Manabe [45] versetzte wässrige Modellsysteme aus Phenylalanin und Kreatinin jeweils mit DNA, RNA, Adenin oder Guanin. Nach einer vierwöchigen Erhitzung auf 60 °C konnte nur in den DNA und RNA enthaltenden Modellen PhIP nachgewiesen werden. Bei Temperaturen, die beim Kochen und Braten üblich sind, lässt sich die PhIP-Bildung mit dem von Murcovic vorgeschlagenen Reaktionsweg erklären, nicht aber unter den Bedingungen, die Manabe in seinen oben erwähnten Untersuchungen verwendet hat. So kann beobachtet werden, dass bei erhitzten Lebensmitteln Zuckerzusätze

einen geringen Einfluss auf die PhIP-Bildung haben [46], während bei Temperaturen unter 100 °C erst in Anwesenheit eines reduzierenden Zuckers PhIP gebildet wird. Da Phenylalanin, Kreatinin, DNA und RNA in nahezu allen tierischen Lebensmitteln vorkommen, ist davon auszugehen, dass Spuren an PhIP seit jeher bei langer Lagerung, auch ohne Hitzeeinwirkung, entstehen. Aus toxikologischer Sicht ist deshalb dieses Phänomen wohl eher zu vernachlässigen.

Eine Verdoppelung der Reaktionszeit führt nicht zu einer Verdoppelung der Menge der gebildeten IQ-Verbindungen, sondern hat einen geringeren Einfluss.

1.3.2 Wassergehalt

Da die Bildung von IQ-Verbindungen über die Maillard-Reaktion verläuft, wurde auch der Einfluss des Wassergehaltes untersucht. Die maximale MeIQ_x-Bildung wurde von Schuirmann und Eichner [43] in Modellen, bestehend aus Glucose, Glycin und Kreatinin, bei einer Wasseraktivität von 0,75 nachgewiesen. Demgegenüber trat das Maximum der MeIQ_x-Bildung in Fleischextrakten bei einem aw-Wert von 0,23 auf und sank kontinuierlich mit steigendem Wassergehalt. Skog [22] untersuchte wässrige und gefriergetrocknete Fleischextrakte, wahlweise in offenen oder verschlossenen Gefäßen. Unter wässrigen Bedingungen in geschlossenen Gefäßen wurden bevorzugt IQ_x und MeIQ_x gebildet, während bei gefriergetrocknetem Fleischextrakt in offenen Gefäßen kein IQ_x nachweisbar war und MeIQ_x nur noch in Spuren gebildet wurde. Umgekehrt wurden PhIP, Harman und Norharman bevorzugt in gefriergetrocknetem Fleischextrakt und offenen Gefäßen gebildet.

1.3.3 Antioxidantien - Prooxidantien

Reduzierende bzw. antioxidative Verbindungen und Radikalfänger unterdrücken in der Regel die Bildung der HAAs, wobei auch häufig ein ambivalentes Verhalten beobachtet wurde, während radikalbildende Verbindungen zu einer Erhöhung der gebildeten Mengen führen. Bemerkenswert ist, dass Eisenionen, nicht aber Kupferionen, die HAA-Bildung fördern [47]. Bei einem Zusatz von Antioxidantien wurde von Johansson [47] in Modellsystemen eine erhöhte Bildung von HAAs beobachtet. Die Ascorbinsäure stellt hier eine besondere Ausnahme dar. Bei geringen Ascorbinsäurezusätzen wurde von Johansson und Jägerstad [47] keine erhöhte HAA-Bildung beobachtet, während Zusätze von 1000 ppm die Bildung von HAAs deutlich unterdrückten. Vollenbröker [46] beobachtete hingegen einen fördernden Einfluss der Ascorbinsäure auf die MeIQ_x-Bildung in Reaktionsaromen.

Natives Olivenöl [48] und Gewürze [49] führten zu einer Verminderung der HAA-Bildung. Als Ursache für die verminderte HAA-Bildung wurde auf die antioxidative Wirkung der Inhaltsstoffe, z.B. der phenolischen Verbindungen, hingewiesen.

1.3.4 Reduzierende Zucker

Nach der „Las-Vegas-Hypothese“ (Abb.8a) werden für die Bildung von HAAs reduzierende Zucker benötigt. In Modellsystemen wurde das Maximum der HAA-Bildung bei den molaren Verhältnissen von Zucker zu Aminosäure zu Kreatinin von 0,5 : 1 : 1 erreicht [50]. Höhere Zuckerkonzentrationen unterdrücken die HAA-Bildung zum Teil vollständig. Vollenbröker [46] stellte fest, dass ein Zusatz von nur 200 mg Xylose/g Fleischextrakt bei 65 % Wassergehalt nach einer sechsstündigen Erhitzung auf 120°C in geschlossenen Gefäßen zu einer völligen Unterdrückung der MeIQx-Bildung führte. Von Skog [50] wurde bei Glucose eine Unterdrückung erst bei einem Zusatz von 1000 mg beobachtet. Als Grund für dieses Verhalten wird angenommen, dass zum einen bei einem Überschuss an Zucker dieser mit Kreatin reagiert und damit eine Ringbildung zu Kreatinin verhindert und zum anderen, dass bei der Maillard-Reaktion entstehendes HMF (Abb. 6) mit Kreatinin reagiert, so dass keine weitere Reaktion zu den IQ-Verbindungen mehr möglich ist. Auch konnte beobachtet werden, dass zuckerhaltige Marinaden die HAA-Bildung sowohl fördern als auch unterdrücken können [5].

1.4 Vorkommen von HAAs in einzelnen Lebensmitteln

Heterocyclische aromatische Amine (HAAs) wurden in einer Vielzahl von proteinhaltigen Lebensmitteln, die erhitzt wurden oder einer Pyrolyse unterlagen, gefunden.

Während die Carboline in zahlreichen erhitzten Lebensmitteln wie Sojabohnen, Casein, Hefeextrakt (auch in Tabakrauch) aufgrund der Pyrolyse von Aminosäuren nachgewiesen wurden, fand man die AIAs in erhitztem Fleisch und Fisch und in Erhitzungsprodukten auf deren Grundlage. Rohrman und Becker [51] schätzten die täglich aufgenommene Menge an HAAs in der BRD pro Bundesbürger auf durchschnittlich 103 ng (0 - 4195 ng). Als wichtigste HAA-Vertreter werden PhIP (63 ng/d) und MeIQx (33 ng/d) genannt. In der Tabelle 3 sind die maximal gefundenen Mengen an HAAs in verschiedenen Lebensmitteln aufgeführt. Insbesondere bei hochehitzten Lebensmitteln sind die bisher höchsten HAA-Konzentrationen ermittelt worden.

Tabelle 3 Maximal gefundene Mengen an HAAs in Lebensmitteln [5, 6, 41, 57]

Lebensmittel	HAA	[ng/g]
Rindfleisch (gebraten-gegrillt)	IQ	21
	MeIQ	0,6
	Iqx	1,5
	MeIQx	80
	4,8-DiMeIQx	15
	7,8-DiMeIQx	0,7
	PhIP	182
	DMIP	7,2
	TMIP	1,5
	IFP	7,6
	4'-OH-PhIP	21
	A α C	21
	Trp-P-1	0,5
	Trp-P-2	1,7
	Harman	28,6
Norharman	30	
Schwein (gebraten-gegrillt)	IQ	10,5
	MeIQ	1,7
	MeIQx	45
	4,8-DiMeIQx	27
	7,8-DiMeIQx	0,3
	PhIP	106
	DMIP	37
	IFP	2,5
	A α C	Spuren
	MeA α C	3,2
	Trp-P-1	5,3
	Trp-P-2	7,4
	Harman	200
	Norharman	10,6
	Geflügel (gebraten-gegrillt)	IQ
MeIQ		0,11
IQx		0,17
MeIQx		270
4,8-DiMeIQx		4
7,8-DiMeIQx		0,16
PhIP		480
DMIP		5,9
TMIP		2,9
IFP		7
A α C		> 100
Trp-P-1		1,6
Trp-P-2		0,14
Harman		0,12
Norharman		0,1

Lebensmittel	HAA	[ng/g]
Lamm (gebraten-gegrillt)	MeIQx	1,6
	4,8-DiMeIQx	0,6
	PhIP	11
	Trp-P-1	1
Fisch (gebraten-gegrillt)	IQ	20
	MeIQ	20
	MeIQx	8,3
	4,8-DiMeIQx	7
	7,8-DiMeIQx	5,3
	PhIP	73
	DMIP	0,9
	TMIP	2,5
	IFP	2,1
	A α C	109
	Trp-P-1	13,3
	Trp-P-2	13,1
	Harman	130
	Norharman	184
Rindfleischextrakt & Reaktionsaromen	IQ	70,3
	MeIQ	5,8
	IQx	2,1
	MeIQx	69
	4,8-DiMeIQx	11,2
	7,8-DiMeIQx	0,7
	4-CH ₂ OH-8MeIQx	6
	7,9-DiMeIqQx	53
	PhIP	49
	A α C	8,1
	MeA α C	20,3
	Glu-P-1	15,5
	Trp-P-1	13
	Trp-P-2	14
	Harman	755
Norharman	200	
Wein	PhIP	65,7 ng/l
Bier	PhIP	1530 ng/l
Muttermilch	PhIP	59 ng/l

Auffällig ist jedoch, dass bei Erhitzungstemperaturen von über 200 °C die Mutagenität im Bratengut kaum noch mit steigender Temperatur zunimmt, während sie im Aerosol des Rauches stark ansteigt [52].

PhIP wurde von Manabe [42] als Umweltkontaminant identifiziert und kann über Verbrennungsabgase in die Lebensmittel gelangen. Neben PhIP wurden aber auch A α C, MeA α C, Trp-P-1, Trp-P-2, MeIQ x und 4,8-DiMeIQ x [53, 54, 55] als Umweltkontaminanten, z.B. in Flusswasser, beschrieben. Martin et al. [56] verglichen 2001 die mutagene Aktivität der Muttermilch verschiedener Länder und stellten fest, dass die Milch aus Ländern mit einem hohen Brustkrebsrisiko eine höhere Mutagenität aufwies als die aus Ländern mit einem niedrigen Brustkrebsrisiko. DeBruins et al. [57] konnten im selben Jahr PhIP in Muttermilch, außer bei der von Vegetarierinnen, nachweisen. Da PhIP auch in Urin [58] und Haaren [59] nachgewiesen wurde und den größten Anteil der täglich aufgenommenen Menge der mutagenen HAAs darstellt [51], wird diskutiert, PhIP als Biomarker einzusetzen.

1.5 Mutagenität und Carcinogenität

1.5.1 Stoffwechsel und metabolische Aktivierung der HAAs

Abb. 10 beschreibt den Stoffwechsel der HAAs am Beispiel von IQ. Nachdem die HAAs über die Nahrung aufgenommen wurden, gelangen sie in die Leber, wo sie durch die Oxidasen Cytochrom P 450 1A1 und 1A2 zu den entsprechenden Hydroxylaminen oxidiert werden. Beim überwiegenden Anteil erfolgt eine Ringhydroxylierung [60, 61]. In einem weiteren Schritt findet die Detoxifikation statt. Dabei werden die oxidierten HAAs an Glucuronsäure, Glutathion oder Sulfat gebunden und ausgeschieden [60]. In vitro konnte auch eine direkte Bindung der exocyclischen Aminogruppe an Glucuronsäure oder Sulfat beobachtet werden [62]. Ein Teil des Hydroxylamins wird aber durch N-Acetyltransferasen acetyliert und kann zu einem hochreaktiven Arylnitreniumion zerfallen, welches vor allem mit Proteinen, aber auch mit DNA Addukte bildet [62], die sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen werden konnten.

Überwiegend wird dabei das Arylnitreniumion an die Nucleinsäure Guanin gebunden [63], wodurch während der DNA-Replikation Rastereinschub-Fehlinformationen [64] hervorgerufen werden. Ein weiterer Bildungsweg der Arylnitreniumionen führt über die durch Sulfotransferase gebildeten N-Sulfatester.

Harman und Norharman sind nicht mutagen, da sie keine exocyclische Aminogruppe haben, so dass aus ihnen keine reaktiven Arylnitreniumionen hervorgehen können. Dennoch sind beide Verbindungen toxikologisch nicht unbedenklich, da von ihnen eine comutagene Wirkung ausgeht [65].

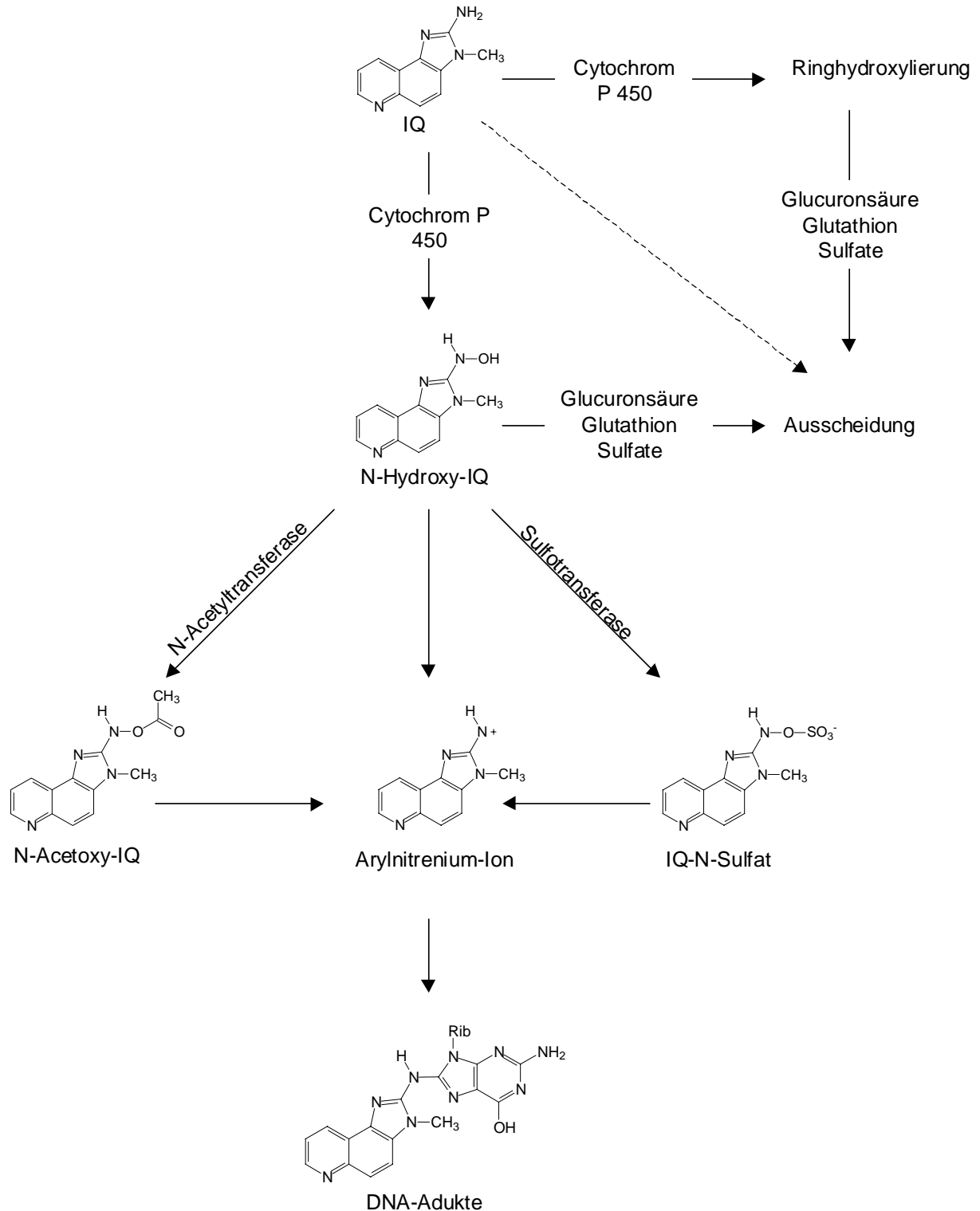


Abb. 10 Metabolische Aktivierung und Ausscheidung der HAAs am Beispiel von IQ

1.5.2 Ames-Test

Im Vergleich zu akuttoxischen Verbindungen ist die Identifizierung genotoxischer Verbindungen ungleich schwieriger, da von ihrer Aufnahme bis zur Krebsentstehung in der Regel ein langer Zeitraum liegt. Der Ames-Test bietet die Möglichkeit, in sehr kurzer Zeit Aussagen über die Mutagenität einer Substanz zu erhalten.

Beim Ames-Test handelt sich um einen Kurzzeitmutagenitätstest, bei dem Histidinmangelmutanten von *Salmonella typhimurium*-Stämmen, die nicht in der Lage sind, selbst Histidin zu synthetisieren, auf histidinfreien Nährböden als Indikatororganismen genutzt werden. Sind Kolonienbildungen zu beobachten, handelt es sich um Revertanten, die durch Mutation befähigt sind, selbst Histidin zu erzeugen.

Tabelle 4 Mutagene Aktivität von HAAs gegenüber *Salmonella typhimurium* TA im Ames-Test im Vergleich mit Aflatoxin B1 und Benz[α]pyren [66, 67, 68, 69]

Verbindung	Revertanten/ μg mutagener Verbindung
MeIQ	661.000
IQ	433.000
7,8-DiMeIQx	163.000
4,8-DiMeIQx	183.000
MeIQx	145.000
Iqx	75.000
Glu-P-1	49.000
Trp-P-1	39.000
Glu-P-2	1.900
PhIP	1.800
Benz[α]pyren	6.500
Aflatoxin B1	6.000

Da die HAAs im Säugetier erst nach metabolischer Aktivierung zu wirksamen Mutagenen werden (Kap. 1.5.1 Abb. 10), simuliert man diese durch die Zugabe von „S-9-Mix“. Es handelt sich dabei um Rattenleberhomogenat, welches Cytochrom P 450 enthält, das den Bakterien fehlt. Die so gewonnenen Mutagenitätsdaten liegen für viele Substanzen in relativ guter Übereinstimmung mit den Carcinogenitätsdaten aus Tierversuchen [61]. So gehören die HAAs zu den Verbindungen, die im Ames-Test eine der stärksten mutagenen Aktivitäten aufweisen (Tabelle 4) und im Vergleich zu hochmutagenen Verbindungen wie Benz[α]pyren und Afltoxin B1 eine bis zu 1000fach höhere Mutagenität haben.

In Tests mit Säugetierzellen [70] und bei Fütterungsversuchen an Mäusen [71] (Tabelle 5) traten aber im Vergleich zum Ames-Test deutlich geringere genotoxische Wirkungen auf. Hieraus wird ersichtlich, dass der Ames-Test nur eine grobe Vorprüfung ermöglicht. Der Test kann Detoxifikations- und Reparaturmechanismen, wie sie in Säugetieren vorkommen, nicht wiedergeben. Selbst Fütterungsversuche an Primaten [72, 73] lassen nur eine Abschätzung der genotoxischen Wirkung auf den Menschen zu, da der Mensch das einzige Lebewesen ist, welches seit Jahrtausenden Lebensmittel erhitzt und sich von ihnen ernährt, so dass eine durch die Evolution erworbene Grundtoleranz für die durch Hitzeeinwirkung entstehenden HAAs nicht auszuschließen ist.

Tabelle 5 TD50-Werte (mg/kg/d) verschiedener HAAs an Mäusen

HAA	TD50-Wert (mg/kg/d)
Trp-P-1	2,7
Glu-P-1	2,7
Glu-P-2	4,9
MeAαC	5,8
Trp-P-2	2,7
IQ	14,7
AαC	15,8

1.5.3 Anticarcinogene

Flavonoide [74] sind in der Lage, die Enzymaktivität von Cytochrom P 450 zu minimieren, wodurch die Bildung von N-Hydroxy-AIAs unterdrückt wird. Ähnliches wird auch bei Vitamin A und β -Carotin beobachtet. Flavonoidhaltige Lebensmittel führen demzufolge zu einer Verringerung der Mutagenität [75, 76, 77]. Neben der Inhibierung von Cytochrom P 450 können auch Effekte wie die Bindung von HAAs an Chlorophyll und Ballaststoffe, insbesondere aber an deren Carboxylankergruppen, zu einer Detoxifikation führen [78, 79, 80, 81, 82, 83]. Auch ist eine Einlagerung von HAAs in Bakterienwände [84, 85, 86, 87] möglich. So wurde bei Ratten, deren Futter mit HAAs versetzt wurde, bei einer mit Bifidobakterien angereicherten Diät eine verminderte Krebsrate beobachtet [88].

1.6 Problemstellung und Zielsetzung

Heterocyclische aromatische Amine (HAAs) gehören zu den Verbindungen, die bei Menschen Tumore auslösen können und im Ames-Test (Kap. 1.5.2, Tab. 4) eine hohe Mutagenität aufweisen. So wurde für einige HAAs eine bis zu 1000fach höhere Mutagenität als für Aflatoxin B1 und PAKs ermittelt. Die täglich aufgenommene Menge an HAAs in der BRD pro Bundesbürger wird auf durchschnittlich ca. 100 ng geschätzt. Im Sinne des vorbeugenden Verbraucherschutzes ist es notwendig, die tägliche Aufnahme der mutagenen HAAs bestmöglich zu reduzieren.

Die Bildung der HAAs verläuft im Rahmen der Maillard-Reaktion im Verlauf von Erhitzungsprozessen, und zwar bevorzugt in Anwesenheit von reduzierenden Zuckern, Aminosäuren und Kreatinin (Kap. 1.2.2 und 1.3). Für die Herstellung von Reaktionsaromen auf der Basis von Fleischextrakt liegen gemäß der gängigen Bildungshypothese optimale Bedingungen für die Bildung von HAAs vor. Unser primäres Ziel ist es, Möglichkeiten für die Reduzierung der HAA-Bildung zu finden.

Vollenbröker [46] untersuchte die unterdrückende Wirkung von Xylose auf die Bildung von heterocyclischen aromatischen Aminen (HAAs) in einem wässrigen Reaktionsaroma, welches er unter Laborbedingungen selbst hergestellt hat. Ausgehend von diesem Ergebnis wollen wir diesen Einfluss der Xylose auch in wasserarmen Reaktionsaromen untersuchen, zumal sich die Ergebnisse verschiedener Autoren u.a. bezüglich des Einflusses der Wasseraktivität (a_w -Wert) auf die HAA-Bildung in Fleischextrakt widersprechen (Kap. 1.3.2). Da bisher zum Reaktionsverhalten der Xylose bezüglich der HAA-Bildung kaum Untersuchungen vorliegen, soll in vereinfachten, Xylose als reduzierenden Zucker enthaltenden Modellen der Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die HAA-Bildung untersucht und mit dem Verhalten von Glucosemodellen, die bezüglich der HAA-Bildung ausgiebig untersucht wurden, verglichen werden. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sollen anschließend auf reelle Reaktionsaromen übertragen werden. Ein weiteres Ziel ist es, durch den Einsatz von Xylose die HAA-Bildung in Reaktionsaromen zu reduzieren und zu ermitteln, unter welchen Bedingungen eine Verminderung der HAA-Bildung zu realisieren ist, zumal der Gesetzgeber den Einsatz von Xylose bei der Herstellung von Reaktionsaromen nicht beschränkt.

Wir gehen davon aus, dass andere Pentosen den gleichen Einfluss auf die HAA-Bildung haben wie die Xylose. Es soll deshalb generell die Reaktivität von Hexosen und

Pentosen miteinander verglichen werden, um abschätzen zu können, ob eine Reduzierung der HAA-Bildung durch die Verwendung einer Pentose allgemein möglich ist.

Nach der gängigen, von Jägerstad [33] aufgestellten „Las-Vegas-Hypothese“ (Kap. 1.2.2, Abb. 8a) sind Pyrazine und Aldehyde, die während der Maillard-Reaktion aus reduzierenden Zuckern und Aminosäuren gebildet werden, für die Bildung der Aminoimidazoazaarene (AIAs), einer Untergruppe der HAAs verantwortlich. Zur Bestätigung, dass im Verlauf der Maillard-Reaktion gebildete α -Dicarbonylverbindungen gemäß der Las-Vegas-Hypothese bei der Bildung von AIAs eine wichtige Rolle spielen, sollte zum Vergleich auch der Einfluss von 2-Desoxyzuckern, aus denen α -Dicarbonylverbindungen zumindest nicht direkt hervorgehen können (vgl. Kap. 1.2.2, Abb. 6), auf die Bildung von HAAs untersucht werden.

Yoshida [36], Överik [37] und Taylor [38] konnten beobachten, dass AIAs entgegen der Hypothese von Jägerstad in wasserarmen Modellsystemen auch unter Abwesenheit eines reduzierenden Zuckers gebildet werden. Auch konnten in Fleischextrakt, der frei von reduzierenden Zuckern war, durch Erhitzung AIAs gebildet werden [43]. Aus diesem Grund soll neben dem Einfluss verschiedener reduzierender Zucker auf die HAA-Bildung auch die Möglichkeit der Bildung von AIAs in zuckerfreien Modellen untersucht werden.

Man geht davon aus, dass die Art der gebildeten AIAs durch die vorliegende Aminosäure bestimmt wird. Dennoch sind in verschiedenen Modellsystemen zumindest Spuren von AIAs (Kap. 3.1, Tab. 8) gefunden worden, die sich mit dem von Jägerstad postulierten Reaktionsweg (Kap. 1.2.2 Abb. 8a) nicht erklären lassen. Alternative Reaktionswege, bei denen AIAs entstehen können, sind also nicht auszuschließen.

Schuirman [43] verwendete in seinen wasserarmen Modellsystemen als Aminosäure ausschließlich Glycin, das gemäß der „Las-Vegas-Hypothese“ an der Bildung von MeIQx beteiligt ist. In den von ihm untersuchten, Glucose und Glycin enthaltenden Modellsystemen konnte er in Übereinstimmung mit der „Las-Vegas-Hypothese“ neben MeIQx auch 7,8-DiMeIQx nachweisen. In Fleischextrakt und Reaktionsaromen konnte von anderen Autoren aber auch 4,8-DiMeIQx nachgewiesen werden [46]. Die Bildung dieser Verbindung verläuft gemäß der „Las-Vegas-Hypothese“ über den Strecker-Abbau von Alanin zum Acetaldehyd. Um neben dem Einfluss von reduzierenden Zuckern auch den Einfluss von Aminosäuren auf die Bildung von MeIQx und 4,8-DiMeIQx zu untersuchen, sollen in wasserarmen Modellsystemen als Reaktionspartner die Aminosäuren Glycin und Alanin eingesetzt werden.

Die von Jägerstad (Kap. 1.2.2 Abb. 8a) und Nyhammar (1.2.2 Abb. 8b) postulierten Reaktionswege wurde von Lee et al. (Kap. 1.2.2) [35] verifiziert, indem sie in erhitzten

Mischungen aus 2-Methylpyridin, Kreatinin und Acetylformaldehyd (Methylglyoxal) IQ nachweisen konnten. Die Verifizierung erfolgte also nicht über einen direkten Umsatz von Methylpyridinen bzw. Methylpyrazinen mit dem durch die Strecker-Reaktion gebildeten Formaldehyd bzw. Acetaldehyd. Zur Bestätigung sollen verschiedene Methylpyridine bzw. Methylpyrazine zusammen mit Formaldehyd bzw. Acetaldehyd und Kreatinin in Modellsystemen erhitzt und auf ihren Einfluss auf die AIAs-Bildung untersucht werden.

Bei den von Jägerstad und Nyhammar postulierten Reaktionswegen liegt Kreatinin schon zu Beginn der Reaktion im Überschuss vor, während Methylpyridine bzw. Methylpyrazine und Streckeraldehyde erst im Rahmen der Maillard-Reaktion kontinuierlich gebildet werden. Somit ist es wahrscheinlich, dass die reaktiven Aldehyde in stärkerem Maße mit dem im Überschuss vorliegenden Kreatinin reagieren als mit den Methylpyridinen bzw. Methylpyrazinen, die erst während der Reaktion in geringen Mengen gebildet werden. Da sich die Reaktionswege von Jägerstad und Nyhammar dahingehend unterscheiden, dass bei dem von Nyhammar postulierten Reaktionsweg der gebildete Streckeraldehyd zuerst mit dem Kreatinin reagiert, sollen zum Vergleich in einer Versuchsreihe die Methylpyridine bzw. Methylpyrazine, Formaldehyd bzw. Acetaldehyd und Kreatinin direkt in der Mischung und in einer weiteren Versuchsreihe die Aldehyde zuerst mit Kreatinin und dann mit den Methylpyridinen bzw. Methylpyrazinen umgesetzt werden.

In der Literatur [46] wird auch die Bildung von AIAs in kreatinin- bzw. kreatinfreien Lebensmitteln beschrieben. Es wird deshalb diskutiert, ob neben Kreatinin auch andere Verbindungen, insbesondere Arginin, die Bildung von AIAs fördern können. In unseren Untersuchungen soll deshalb der Einfluss von Arginin auf die Bildung dieser Verbindung in vereinfachten Modellsystemen untersucht werden.

Ascorbinsäure findet bei der Herstellung von Reaktionsaromen Verwendung und darf bei Fleischerzeugnissen als Zusatzstoff eingesetzt werden. Da die Bildung von HAAs über radikalische Zwischenstufen verläuft, wurde von Johansson [47] der Einfluss der Ascorbinsäure als Antioxidationsmittel im Modellsystem untersucht (Kap. 1.3.3). Ascorbinsäure unterdrückte die MeIQx-Bildung, während andere Antioxidantien sie zum Teil deutlich förderten. Dass somit die reduzierende Wirkung der Ascorbinsäure die Hauptursache für die Unterdrückung der AIA-Bildung sein soll, erscheint somit als fragwürdig. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen von Vollenbröker (Kap. 1.3.3), bei denen ein Ascorbinsäurezusatz zu Fleischextrakt zu einer deutlichen Förderung der MeIQx-Bildung führte, ergeben sich zudem Widersprüche.

In dem von Vollenbröcker untersuchten Reaktionsaroma war jedoch im Vergleich zu den Modellen von Johansson kein reduzierender Zucker vorhanden. Reduzierende Zucker verhalten sich bei der AIA-Bildung ambivalent und bei einem molaren Verhältnis der reduzierenden Zucker zu Aminosäure zu Kreatinin von 0,5 : 1 : 1 liegt das Maximum ihrer Bildung vor (Kap. 1.3.4) [50]. Die Ascorbinsäure verhält sich bei hohen Temperaturen innerhalb der Maillard-Reaktion ähnlich wie reduzierende Zucker [52] und bildet Folgeprodukte [134, 141], aus denen nach der gängigen Hypothese (Kap. 1.2.2 Abb. 8a) AIAs entstehen können. Wir vermuten, dass die antioxidative Wirkung der Ascorbinsäure für das ambivalente Verhalten bei der Bildung von AIAs von untergeordneter Bedeutung ist und der Hauptgrund für die reaktionsfördernde Wirkung der Ascorbinsäure die unter der Hitzeeinwirkung entstehenden Folgeprodukte sind. Unser Ziel ist es, diesen ambivalenten Charakter der Ascorbinsäure auf die Bildung von AIAs zu untersuchen.

Da wir die HAA-Bildung in Modellen insbesondere unter den Bedingungen einer Hoherhitzung (über 150 °C) untersuchen wollen, ist es notwendig, ausgehend von den in der Literatur beschriebenen Methoden, Aufarbeitungsmethoden weiterzuentwickeln und zu optimieren, die es uns ermöglichen, diese Verbindungen auch in hoherhitzten, ein komplexeres Produktspektrum aufweisenden Modellen nachzuweisen und zu bestimmen.

Die HAAs liegen in Reaktionsaromen nur in sehr niedrigen Konzentrationen vor, wobei die Nachweisgrenzen bei der Verwendung eines DADs oder elektrochemischen Detektors stark von der vorliegenden Matrix abhängig sind (Kap. 2.1, Tabelle 6). Da uns selbst keine LC-MS-Anlage zur Verfügung steht, soll in Zusammenarbeit mit dem „Staatlichen Veterinär- und Chemischen Landesuntersuchungsamt“ (CVUA) in Münster eine LC-MS-Methode entwickelt werden, die es uns ermöglicht, die HAAs auch in hoherhitzten Reaktionsaromen nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen.

2 Analytik von heterocyclischen aromatischen Amininen (HAAs)

2.1 Einleitung

Während der Maillard-Reaktion entstehen neben den HAAs eine Vielzahl anderer Substanzen, die zudem in deutlich höheren Konzentrationen auftreten und eine störende Matrix darstellen. Da die HAAs nur im unteren ng/g Bereich vorliegen, ist eine Abtrennung der störenden Begleitsubstanzen aus einer komplexen Matrix, bei gleichzeitiger Anreicherung der zu untersuchenden HAAs, unabdingbar.

Die Analysenschritte lassen sich folgendermaßen gliedern:

1. Extraktion
2. Reinigung des Rohextraktes
3. Chromatographische Trennung
4. Detektion

Betrachtet man die Struktur der HAAs (Kap. 1, Abb.4 und Abb.5), ist es naheliegend, ihren basischen bzw. aromatischen Charakter zu nutzen und über den pH-Wert jeweils die hydrophilen und lipophilen Eigenschaften zu steuern, um so eine effiziente Extraktion, Isolierung und Reinigung zu ermöglichen.

Bei den HAAs handelt es sich aufgrund ihrer aromatischen Ringstruktur um UV-aktive Verbindungen, die mittels UV-Detektor oder DAD detektiert werden können. Des Weiteren besteht für einige HAAs die Möglichkeit, diese mittels eines Fluoreszenzdetektors nachzuweisen [29, 89, 90, 91, 92].

Auch können elektrochemische Detektoren (ELCDs) verwendet werden [42, 89, 93, 94], da hier in einem Zweizellen-Gerät die freiliegende Aminogruppe erst oxidiert und die oxidierte Form wieder reduziert werden kann. Von Schuirmann [42] und Nutt [89] wurde beobachtet, dass störende Matrixbestandteile hingegen meist irreversibel oxidiert werden. Zwar werden viele koeluirende Matrixbestandteile weder oxidiert noch reduziert, was zu einer hohen Empfindlichkeit und Selektivität der Methode führt [42, 89], dennoch gestaltet sich das Arbeiten mit einem ELCD als äußerst schwierig, da bei einer Gradientenelution ein starkes Driften der Basislinie vorliegt [89]. Aufgrund der unterschiedlichen Polarität der HAAs ist eine isokratische Trennung dieser Verbindungen, insbesondere bei einer gleichzeitig vorliegenden komplexen Matrix, nahezu unmöglich.

Als Methode der Wahl etabliert sich aber immer mehr die LC-MS [91, 95 - 106], die durch ihre hohe Empfindlichkeit und Selektivität besticht. Außerdem können isotopenmarkierte Standards verwendet werden, wodurch die Ergebnisse eine hohe Zuverlässigkeit haben.

Alternativ werden auch GC/MS-Methoden beschrieben [92,107 - 113]. Während sich die unpolaren HAAs (Aminocarboline, Kap. 1.2.1 Abb. 4) sehr einfach trennen lassen [114], gilt dieses nicht für die polaren HAAs (Aminoimidazoazaarene, Kap. 1.2.2 Abb. 5). Eine geeignete Derivatisierung vor der Durchführung der GC zur Verbesserung der Peaksymmetrie ist somit zwingend notwendig.

Die Kapillarelektrophorese (CE) stand uns in unseren Untersuchungen nicht zur Verfügung. Diese Methode soll an dieser Stelle aber nicht unerwähnt bleiben. Die Trennleistung und Empfindlichkeit entspricht derjenigen der HPLC-DAD; der Aufwand der Probenaufbereitung ist identisch.

In Tabelle 6 sind die gängigen Analysenmethoden zum Nachweis und zur Bestimmung der HAAs in Lebensmitteln aufgeführt, so dass sich in Verbindung mit Tabelle 3 (Kap. 1.4) die Einwaage abschätzen lässt, die für einen Nachweis und eine Bestimmung der HAAs im Lebensmittel benötigt wird.

Tabelle 6
Methoden zum Nachweis und zur Bestimmung von HAAs in Lebensmitteln [5, 6]

Method	Detektor	Nachweisgrenze [ng/g]	Vorteile	Nachteile
HPLC	UV-DAD	0,02 - 50	Identifizierung über das UV- Spektrum	Zeitaufwendige Isolierung & Reinigung
	ELCD	0,05 - 2	Hohe Empfindlichkeit und Selektivität	Isochratisch
	Fluoreszenz	0,03 – 3	Hohe Empfindlichkeit und Selektivität	Nur einige HAAs fluoreszieren
	MS	0,01 – 2	Hohe Empfindlichkeit und Selektivität, Verwendung isotopenmarkierter Standards	Hohe Kosten
CE	UV, ED, MS	35 – 50	Hohe Trennleistung, geringe Kosten	Zeitaufwendige Isolierung & Reinigung
GC	MS	0,01 – 0,2	Hohe Trennleistung	Geeignete Derivatisierung
ELISA		1	Simpel	Monoclonale Antikörper sind nur für eine begrenzte Anzahl HAAs erhältlich

2.2 Extraktion

Da es sich bei den HAAs um basische Aromaten handelt, haben sich für die Extraktion polare organische Extraktionsmittel wie Methanol [98], Dichlormethan [115, 116] und n-Butanol [98, 117] bewährt. So werden mit Methanol die HAAs hervorragend gelöst, während die höhermolekularen Anteile in Methanol unlöslich bleiben. Durch anschließende Zentrifugation werden die unlöslichen Bestandteile abgetrennt und saubere Rohextrakte erhalten. Alternativ zu den organischen Lösungsmitteln verwendete Felton [118] 0,1 N Salzsäure zur Extraktion von PhIP aus Rindfleisch.

Vollenbröker [46] dotierte in seinen Untersuchungen Bier mit PhIP (100 ng/ml) und untersuchte die Proben nach dem Gefriertrocknen. Obwohl die zugesetzte Menge an PhIP deutlich über den in Lebensmitteln üblichen Konzentrationen lag, konnte er bei Verwendung verschiedener organischer Lösungsmittel selbst nach mehrstündigem Erhitzen unter Rückfluss und Rühren nahezu kein PhIP aus dem Trockenrückstand herauslösen. Bei Verwendung von verdünnter Natronlauge als Extraktionsmittel schwankte die Wiederfindung zwischen 20 und 50 Prozent. Erst bei Verwendung von verdünnter Salzsäure, d.h. im protonierten Zustand, konnte das zugesetzte PhIP fast vollständig wiedergefunden werden.

Zwar stellt gefriergetrocknetes Bier kein für Lebensmittel relevantes Substrat dar, doch ist auch bei sprüh- und gefriergetrockneten Reaktionsaromen mit Rehydratisierungs- und Extraktionsproblemen zu rechnen. Nutt [89] verwendete bei ihrer Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von HAAs in Reaktionsaromen Methanol als Extraktionsmittel und konnte damit nur Wiederfindungsraten von bis zu 10 Prozent erreichen.

Aus den oben genannten Gründen setzten auch wir für die Extraktion der zu untersuchenden getrockneten Produkte verdünnte Salzsäure ein.

Die Zusammensetzung und Herstellung von Reaktionsaromen ist ein von der Industrie streng gehütetes Geheimnis. In unseren Untersuchungen haben wir deshalb unter vereinfachten Bedingungen verschiedene Fraktionen von Standardmelanoidinen, die von B. Brand [119] hergestellt wurden, auf ihre HAA-Bindefähigkeit untersucht. Melanoidine entstehen bei Erhitzung im Rahmen der Maillard-Reaktion. Je nach Art der eingesetzten chemischen Verbindungen und der Reaktionsbedingungen können dabei Melanoidine unterschiedlichen Molekulargewichts entstehen. Mit Hilfe von Verfahren wie Dialyse und Gelpermeationschromatographie lassen sich die Melanoidine nach ihrem Molekulargewicht fraktionieren [119]. Die so gewonnenen melanoidinhaltigen Fraktionen wurden von uns mit den HAAs IQ, MeIQ, IQx, MeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, 4,7,8-TriMeIQx, Harman,

Norharman, PhIP und MeAαC in entsprechenden geringen Mengen versetzt und gefriergetrocknet. Insbesondere bei hochmolekularen Melanoidinfraktionen mit Molekulargewichten von mehr als 100000 Dalton konnte bei der Verwendung von Methanol als Extraktionsmittel so gut wie kein Harman, Norharman, PhIP und MeAαC aus den Trockenrückständen herausgelöst werden. Die Wiederfindungsrate der übrigen HAAs schwankte bei Anwesenheit hochmolekularer Melanoidine zwischen 5 und 30 Prozent im Vergleich zu einem melanoidinfreien Kontrollmodell. Aufgrund der von Vollenbröcker durchgeführten Untersuchungen extrahierten wir die HAAs alternativ mit verdünnter Salzsäure. Sowohl bei Verwendung von 0,1 N Salzsäure als auch von 1 N Salzsäure konnten wir nach vierstündigem Rühren die HAAs IQ, MeIQ, IQx, MeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, 4,7,8-TriMeIQx und PhIP nahezu vollständig wiederfinden. Einzig bei Harman und Norharman lag die Wiederfindungsrate unter Verwendung hochmolekularer Melanoidinfraktionen lediglich zwischen 20 und 40 Prozent im Vergleich zum melanoidinfreien Kontrollmodell. Erst nachdem die Proben mindestens 12 Stunden über Nacht in 1 N Salzsäure gerührt worden waren, konnten alle HAAs nahezu vollständig extrahiert werden, so dass wir in unseren Untersuchungen 1N Salzsäure als Extraktionsmittel verwendet haben.

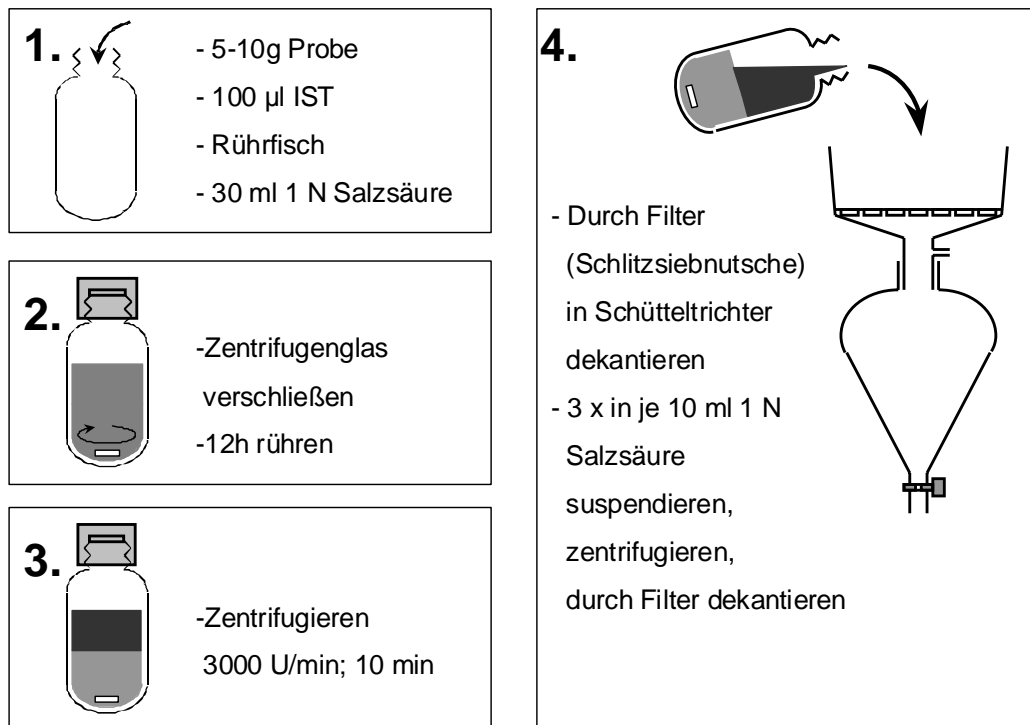


Abb. 11 Aufarbeitungsschema Extraktion

In Abb. 11 wird die Extraktion schematisch wiedergegeben. Für die Durchführung der Untersuchungen werden 5 bis 10 g Fleischextrakt, Reaktionsaroma oder Modellsystem in desaktivierte Zentrifugengläser eingewogen, mit internem Standard und 30 ml 1 N Salzsäure versetzt und über Nacht gerührt. Anschließend wird 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert und durch ein Filter dekantiert. Der Rückstand wird 3 weitere Male mit je 10 ml Salzsäure suspendiert, zentrifugiert und durch einen Filter dekantiert. Erst während des letzten Schrittes wird bei 4000 U/Minute zentrifugiert, da sonst die Proben so sehr verklumpen, dass ein Suspendieren nahezu unmöglich ist.

2.3 Reinigung des Rohextraktes

2.3.1 Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan

Bewährt hat sich eine Flüssig-Flüssig-Extraktion des gewonnenen Rohextraktes mit Dichlormethan. Bei $\text{pH} < 2$ liegen die HAAs protoniert vor und sind wasserlöslich, während sie bei $\text{pH} > 10$ deprotoniert vorliegen und in Dichlormethan löslich sind. Es wurden aber auch Chloroform und n-Butanol als nicht oder nur begrenzt mit Wasser mischbare Extraktionsmittel verwendet. Für unsere Untersuchungen haben wir uns für die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan entschieden, da hiermit eine Emulsionsbildung, die durch das Schütteln entstehen kann, am geringsten ist.

Die zu untersuchenden wässrigen Extrakte werden mit Salzsäure auf einen $\text{pH} < 1$ eingestellt und dreimal mit je 50 ml Dichlormethan in desaktivierten Schütteltrichtern ausgeschüttelt. Eine Desaktivierung der Schütteltrichter ist notwendig, um eine bessere Phasentrennung zu erreichen, da die beim Ausschütteln entstehenden Emulsionen sonst an der Glasoberfläche haften bleiben. Die neutralen und die sauren Verbindungen gelangen in die Dichlormethanphase, während die HAAs in der wässrigen Phase verbleiben. Dieser Schritt ist insbesondere bei hocherhitzten und fetthaltigen Proben unerlässlich. Anderenfalls sind bei den hocherhitzten Proben trotz weiterer Aufarbeitungsschritte die Chromatogramme von Störpeaks überlagert und bei hohem Fettgehalt ist die Reinigung der Rohextrakte an Festphasen kaum noch möglich. Die Dichlormethanphase wird verworfen.

Bei der anschließenden Alkalisierung wurde der Einsatz von Ammoniak von Iwaoka [120] als kritisch angesehen, da bei der Extraktion unter Anwesenheit von Ammoniumionen mutagene Artefakte entstehen würden. Aus diesem Grund wird der pH-Wert mit Natronlauge

auf > 12 eingestellt und anschließend dreimal mit je 50 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die HAAs gelangen nun in die Dichlormethanphase. Bei einer starken Emulsionsbildung wird mindestens 15 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert.

Da für die folgenden Schritte der Festphasenextraktion die HAAs von ursprünglich 60 ml wässrigen, salzsauren Extrakts bzw. 5 bis 10 g Probe auf 0,1 ml konzentriert werden müssen, um die HAAs erfassen zu können, haben auch nur geringste, durch eine unsaubere Phasentrennung verursachte Verunreinigungen aus der wässrigen Phase fatale Folgen bei der späteren chromatographischen Trennung und Detektion. Der Grund hierfür ist, dass die HAAs nur im oberen pg bis unteren ng/g in erhitzten Lebensmitteln entstehen, während Störsubstanzen in 1000mal höherer Konzentration entstehen können. Zur weiteren Reinigung werden deshalb die vereinigten Dichlormethanphasen noch einmal mit Ammoniaklösung (Wasser + konz. Ammoniak 9+1) bei einem pH > 10 ausgeschüttelt. Alternativ zum Ausschütteln mit Ammoniak haben wir versucht, die Dichlormethanphase mit Natriumsulfat zu trocknen. Die Chromatogramme von Extrakten, die über Natriumsulfat getrocknet wurden, insbesondere von Extrakten, bei denen eine starke Emulsionsbildung erfolgte, und von solchen, die aus hochehitzen Proben gewonnen wurden, waren im Vergleich mit den Chromatogrammen von Extrakten, die durch das Ausschütteln mit Ammoniaklösung gewonnenen wurden, von einer größeren Anzahl an Störpeaks überlagert. Die Dichlormethanphase wird anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Abb. 12 gibt schematisch die von uns angewandte Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan wieder.

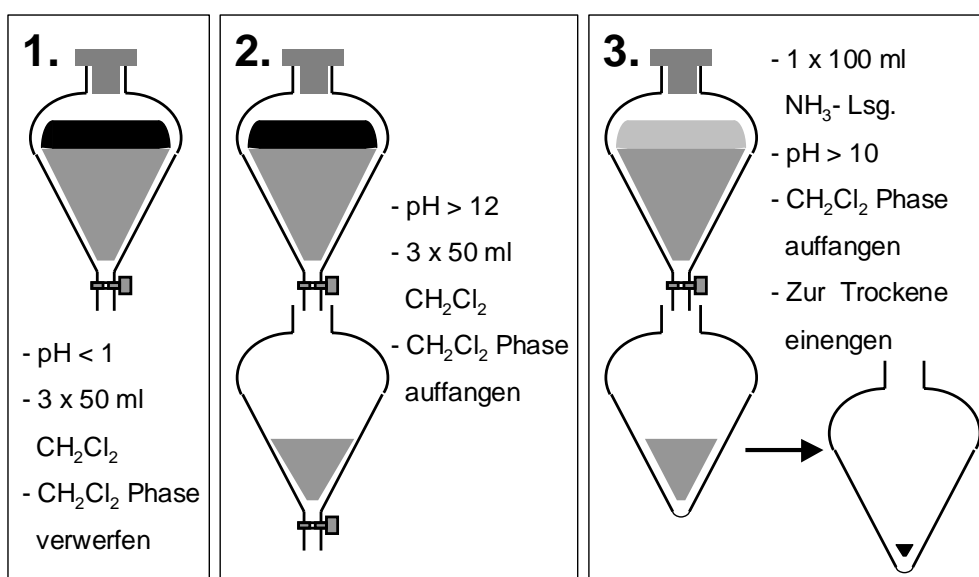


Abb. 12 Aufarbeitungsschema Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan

Der durch die Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan erzielbare Reinigungsschritt geht aus den Abb. 16 und 18 (Schritt 1) hervor. Der anschließende durch die Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Ammoniak erzielbare Reinigungsschritt geht aus den Abb. 16 und 18 (Schritt 2) hervor.

2.3.2 Flüssig-Flüssig-Verteilung an Extrelut

Da einige Proben, insbesondere Fleischextrakt, zu starker Emulsionsbildung neigten, haben wir für die Flüssig-Flüssig-Extraktion Diatomeenerde (Extrelut) als eine Art Schwamm verwendet, bei dem die flüssige Phase quasi stationär gebunden wird, während die HAAs im Alkalischen mit Dichlormethan eluiert werden können. Diese alternative Methode wurde bereits 1992 von Gross und Grüter [90] entwickelt; sie eignet sich besonders für die Aufarbeitung von Fleischextrakt. Es handelt sich hierbei um eine Tandem-Festphasenextraktion. Dabei wird die wässrige, alkalische Probe im ersten Schritt auf Diatomeenerde gebunden und mit Dichlormethan einer Flüssig-Flüssig-Extraktion unterzogen. Der so gewonnene, in der Regel bereits farblose Rohextrakt enthält aber in den meisten Fällen noch eine Vielzahl an Störsubstanzen (vgl. Kap. 2.4 Abb.17 und 19). Weitere Reinigungsschritte sind somit zwingend notwendig. In der Methode von Gross und Grüter wird deshalb der Dichlormethanextrakt auf eine Propylsulfonsäure-Festphase gegeben. Da es sich hierbei um einen stark sauren Kationentauscher handelt, werden die HAAs an die Festphase gebunden. Sie lassen sich in polare und apolare HAAs unterteilen (Abb. 13).

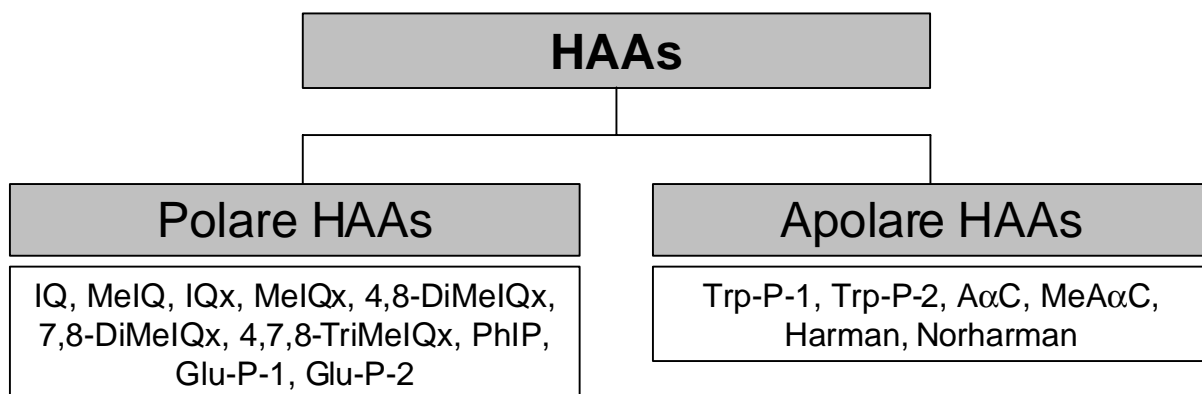


Abb. 13 Unterteilung der HAs in polare HAs und apolare HAs

Zuerst werden die „apolaren HAs“ mit Methanol/Salzsäure eluiert, während die „polaren HAs“ von der Propylsulfonsäure-Festphase reteniert werden. Die mit Methanol/Salzsäure eluierten „apolaren HAs“ werden an einer C₁₈-Festphase mit verdünnter Ammoniaklösung

gereinigt und mit methanolischem Ammoniak eluiert. Die noch an der Festphase der Propylsulfonsäure-Kartusche gebundenen „polaren HAAs“ werden nun mit Ammoniumacetatlösung direkt auf eine C₁₈-Festphase eluiert. Die Reinigung und Elution der „polaren HAAs“ erfolgt wie bei den „apolaren HAAs“ mit verdünnter Ammoniaklösung und methanolischem Ammoniak.

Um die bei der Detektion störenden koeluiierenden Matrixbestandteile zu entfernen, führten Gross und Grüter einen weiteren Reinigungsschritt an einer TSK CM650 Festphase durch. Diese von Gross und Grüter beschriebene Methode stellt Ausgangspunkt und Grundlage für die meisten Aufarbeitungsmethoden zur HAA-Analytik dar.

Wie von einigen Autoren [121, 122] beschrieben, reicht eine vereinfachte Aufarbeitung mittels Festphasenextraktion meist aus. Dabei werden die HAAs direkt von der Propylsulfonsäure-Festphase eluiert und die so gewonnenen Eluate nicht mehr an einer C₁₈-Festphase gereinigt.

Nutt [89] beschrieb, dass die Isolierung der zuvor aus der Flüssig-Flüssig-Verteilung gewonnenen HAAs aus Reaktionsaromen und erhitzten Lebensmitteln an Festphasen, im krassen Gegensatz zu reinen Standards, kaum möglich war. Als Grund hierfür postulierte Nutt die Bildung von Ionenpaaren bzw. Komplexen der HAAs mit der störenden Begleitmatrix, so dass diese dann an den Festphasen der Kationenaustauscher nicht hinreichend reteniert werden. Ähnliches konnte auch von Vollenbröker [46] bei der Isolierung von PhIP aus Bier beobachtet werden. Ausgehend von den Untersuchungen von Manabe [41] konnte Nutt durch Einstellen eines sauren pH-Wertes und Verwendung von Anionenaustauscherkartuschen die von ihr postulierten Komplexe z.T. brechen und so aus Reaktionsaromen die Wiederfindungsrate steigern.

Um die von Nutt postulierten Komplexe zu brechen, versuchte Vollenbröker, das Problem dadurch zu lösen, dass er den aus der Flüssig-Flüssig-Verteilung gewonnenen Dichlormethanextrakt auf Kieselgel auftrug, um anschließend die enthaltenen HAAs mit methanolischer Salzsäure zu eluieren. Auf diese Weise konnte Vollenbröker in hochoerhitzten Proben und Reaktionsaromen eine Wiederfindung von etwa 35 % erreichen.

In unseren Untersuchungen werden 2 bis 3 g der Probe in ein verschraubbares Zentrifugenglas eingewogen, mit internem Standard und 10 ml 1 N Salzsäure versetzt und dann mindestens 12 h über Nacht gerührt. Die saure Suspension wird mit 2 ml Kalilauge (14 N) auf einen pH > 12 eingestellt, 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert und durch einen Faltenfilter auf die Extrelut-Phase (15 g) aufgegeben. Die Extrelut-Kartusche wird auf eine zuvor konditionierte Kieselgelkartusche gesteckt und dreimal unter Nachspülen des

Zentrifugenglases mit 25 ml Dichlormethan extrahiert. Im Alkalischen werden die HAAs an das Kieselgel gebunden. Die Extrakt-Kartusche wird verworfen. Anschließend wird die Kieselgelkartusche dreimal mit je 3 ml HPLC-reinem Dichlormethan gewaschen. Nach dem Trockensaugen der Kieselgelkartusche wird mit 0,1 N methanolischer Salzsäure eluiert und der methanolische Extrakt am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Abb. 14 gibt die von uns angewandte Flüssig-Flüssig-Extraktion an Extrelut wieder. Der durch Extrelut erzielbare Reinigungsschritt geht aus den Abb. 17 und 19 (Schritt 1) hervor.

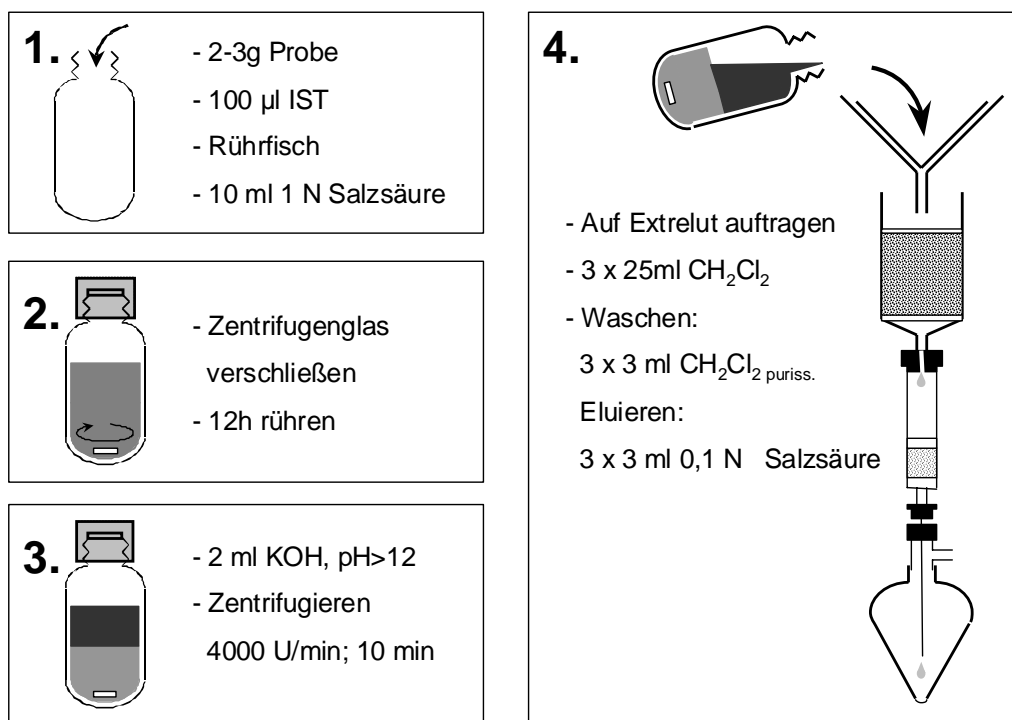


Abb. 14 Aufarbeitungsschema Flüssig-Flüssig-Extraktion an Extrelut

2.4 Festphasenextraktion

Mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion lassen sich die Extrakte schon sehr gut reinigen (Abb. 16-19). Da die HAAs aber nur im Spurenbereich vorliegen, ist insbesondere für komplexe Matrices eine weitere Aufarbeitung notwendig. In der Literatur wurden eine Vielzahl von Aufarbeitungen mit Hilfe der Festphasenextraktion beschrieben.

Neben den bei der Methode von Gross und Grüter beschriebenen Propylsulfonsäure-Ankergruppen, die als Kationenaustauscher fungieren, hat man auch „Blue Cotton“, bestehend aus Cellulose, Baumwolle oder Sephasorb, an die Trisulfo-Kupfer-Phthalocyanin

kovalent gebunden ist, verwendet [143,144,145]. Durch die planare Struktur der HAAs konnten diese hervorragend retiniert werden. Mit dieser Methode werden von Takahashi [83] Wiederfindungsraten von bis zu 83 % erreicht. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass mehrfach mit „Blue Cotton“ extrahiert werden muss und dass die Methode sehr zeitaufwendig ist.

Die planare Struktur der HAAs wurde ebenfalls für eine Reinigung und Isolierung an Aktivkohle bzw. Graphit genutzt [81,113].

Wir haben uns in unseren Untersuchungen für die Aufarbeitung mit SCX-Kartuschen (strong cationic exchange) entschieden. Bei den SCX-Kartuschen handelt es sich um eine Benzylpropylsulfonsäurephase. Das Prinzip der Festphasenextraktion verläuft hier ähnlich wie bei der von Gross und Grüter verwendeten Propylsulfonsäure-Festphase auf Basis eines Kationenaustauschers, ist aber aufgrund des Phenylrings lipophil modifiziert. Neben den polaren HAAs lassen sich deshalb in einem Schritt zusätzlich die apolaren HAAs Harman, Norharman und MeAαC isolieren. Ein großes Problem ist aber, dass im Falle von Reaktionsaromen bei einer direkten Aufarbeitung an einer SCX-Kartusche häufig kaum noch HAAs wieder zu finden sind. Schuirmann arbeitete seine Extrakte mit einer semipräparativen HPLC an einem Polypropyl-Sulfonsäure-Kationenaustauscher auf und erreichte gute Ergebnisse bei Modellansätzen und Fleischextrakten. Wie bereits in 2.2.1 beschrieben, konnte mit dieser Aufreinigungsmethode Nutt bei Reaktionsaromen jedoch nur Wiederfindungsraten von maximal 10 % erreichen. Vollenbröker nutzte als weiteren Aufreinigungsschritt eine Kieselgelphase unter Verwendung von methanolischer Salzsäure. Die Wiederfindungen der HAAs erhöhten sich deutlich auf 35 %, da offenbar die von Nutt postulierten Komplexe im Säuren aufgebrochen werden. Anstatt wie bei Vollenbröker Kieselgel einzusetzen, haben wir den Rückstand aus der Flüssig-Flüssig-Extraktion in 12 ml heißer Salzsäure aufgenommen und nach dem Abkühlen auf eine zuvor konditionierte SCX-Kartusche gegeben. Die Kartusche wird erst mit 30 ml 0,1 N Salzsäure und im folgenden Waschschrift dreimal mit 3 ml Wasser gewaschen. Eluiert wird 2mal mit je 3 ml methanolischem Ammoniak (50 + 2). Der so gewonnene methanolische Extrakt wird im Spitzkolben am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt. Der trockene Rückstand wird in Methanol aufgenommen und anschließend mit einer Kolbenhubpipette in ein Autosamplergläschen überführt.

Der so gewonnene Extrakt kann wahlweise mittels HPLC, GC-MS oder LC-MS untersucht werden. Die Wiederfindung liegt je nach Matrix zwischen 50 und 75 Prozent. Abb. 15 beschreibt die von uns durchgeführte Festphasen-Extraktion auf schematische Weise.

Der durch die Festphasenextraktion erzielbare Reinigungsschritt geht aus den Abbildungen 16 bis 19 (Schritt 3) hervor.

Ein einzelner Reinigungsschritt ist bei gleichzeitig vorliegenden hochoverhitzten Matrixbestandteilen nicht möglich, zumal während der Maillard-Reaktion eine Vielzahl an Störsubstanzen in deutlich höheren Konzentrationen als die HAAs gebildet werden. Um eine effiziente Reinigung und Konzentrierung der zu untersuchenden HAAs zu ermöglichen, muss die Reihenfolge der Reinigungsschritte Extraktion, Flüssig-Flüssig-Verteilung und Festphasenextraktion eingehalten werden. So würde ein direktes Auftragen von 5 bis 10 g hochoverhitzter, z.T. fetthaltiger Probe auf die SCX-Kartusche zwangsläufig zu einer Überlastung der Festphase führen, da die Kapazität der Festphase für eine derartige Anwendung nicht ausreicht. Auch könnten die von Nutt postulierten Komplexe vorher nicht gebrochen werden, so dass die HAAs nicht wiedergefunden werden können.

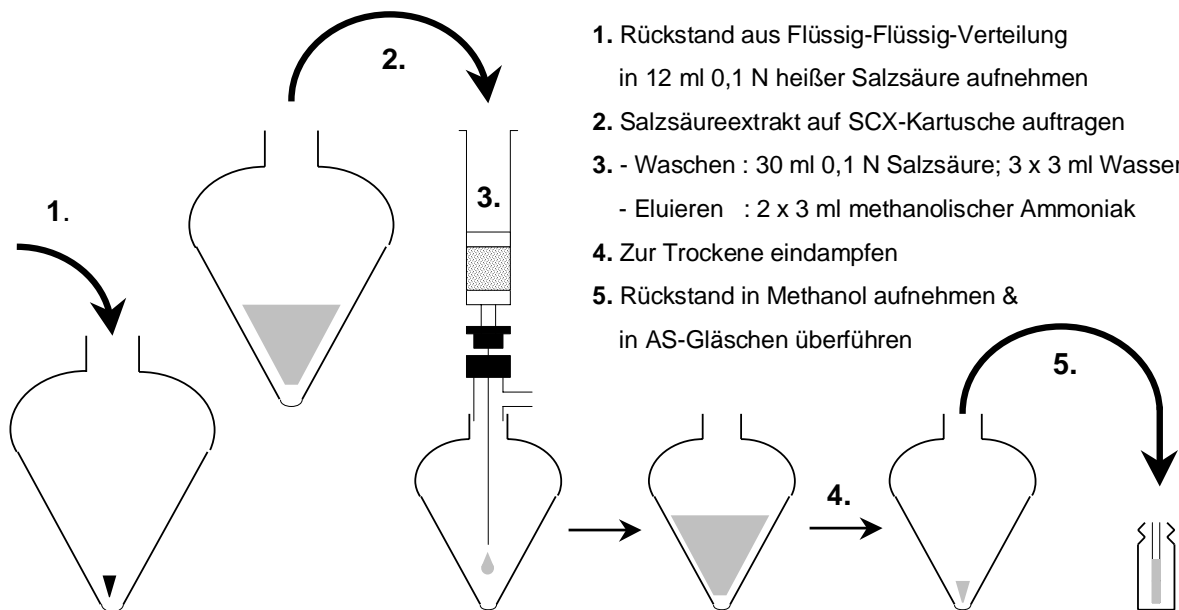


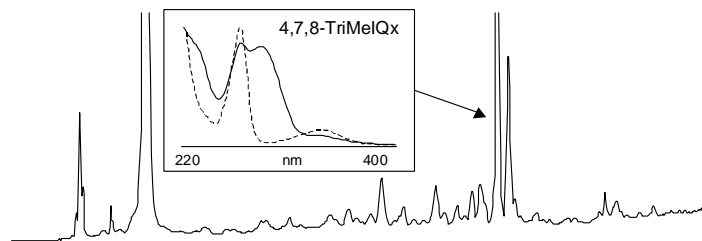
Abb. 15 Aufarbeitungsschema Festphasen-Extraktion

Um die Effizienz der Aufarbeitungsschritte zu überprüfen, haben wir verschieden hergestellte, keine HAAs erhaltende Reaktionsaromen mit dem in Lebensmitteln nicht vorkommenden 4,7,8-TriMeIQx (80ng/g) dotiert und nach den von uns entwickelten Methoden aufgearbeitet (s. Abb. 16-19). Die das TriMeIQx enthaltende Fraktion wurde mittels DAD analysiert. In den Abbildungen 16 bis 19 ist die Effizienz der einzelnen hintereinander geschalteten Reinigungsschritte dargestellt.

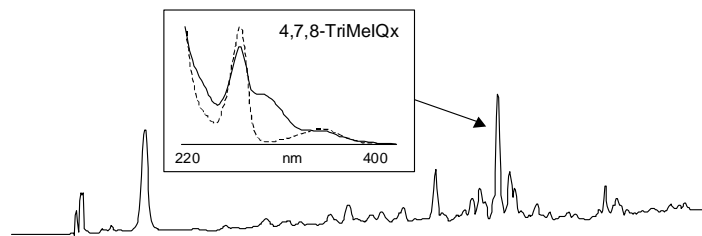
Die Aufnahme des Chromatogramms bei einer feststehenden Wellenlänge kann, wie aus den Abbildungen 16 bis 19 hervorgeht, zu Fehlinterpretationen führen, da selbst bei einer geringen Anzahl an Störpeaks eine Überlagerung durch UV-aktive Störsubstanzen nicht ausgeschlossen werden kann. Der DAD erlaubt die Aufnahme eines kontinuierlichen Spektrums und ermöglicht somit deutlich mehr Informationen zum vorliegenden Peak. So haben wir in den Chromatogrammen bei der Retentionszeit von 4,7,8-TriMeIQx das dabei aufgenommene kontinuierliche Spektrum mit dem der Reinsubstanz von 4,7,8-TriMeIQx verglichen. Wie aus den Abbildungen 16 bis 19 hervorgeht, nimmt mit jedem Reinigungsschritt sowohl die Zahl der Störpeaks ab als auch die Reinheit von 4,7,8-TriMeIQx zu.

Niedertemperatur-langzeiterhitztes Reaktionsaroma:

Schritt 1: Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan (Kap. 2.3.1)



Schritt 2: Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Ammoniak (Kap. 2.3.1)



Schritt 3: Festphasenextraktion an SCX (Kap.2.4)

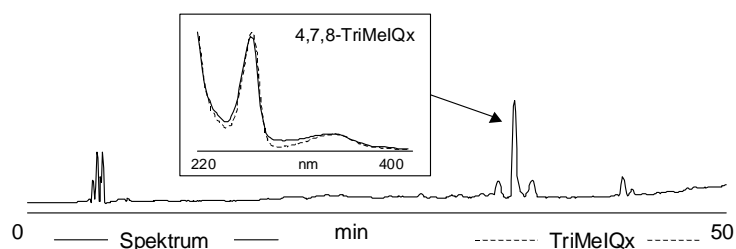
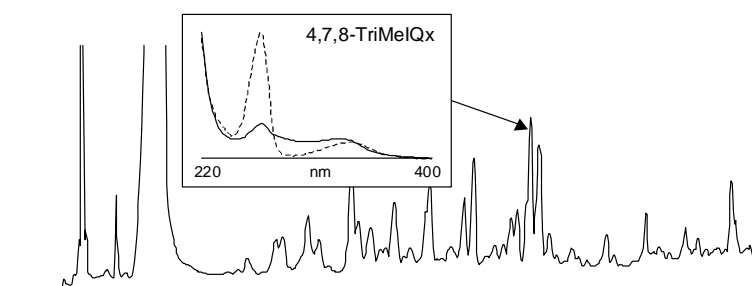
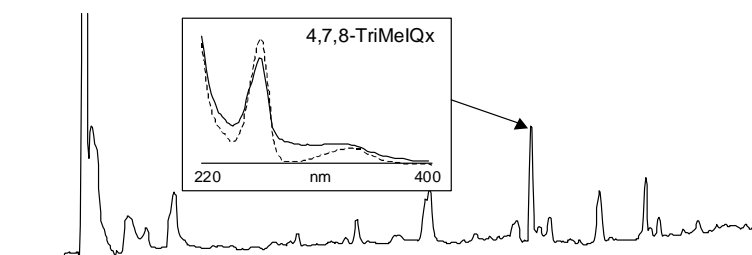


Abb. 16 Reaktionsaroma Langzeit-Niedertemperatur: Xylose/Fleischextrakt 1 : 1, $a_w = 0,52$, $T = 110\text{ }^\circ\text{C}$, 6 h HPLC-Chromatogramm mit 4,7,8-TriMeIQx dotiert; Supersphere RP-select b ($4\text{ }\mu\text{m}$) $250 \times 3\text{ mm}$; Lsg. A: 0,01 m TEAP (pH 2,8) Lsg. B: Acetonitril / 0,01 m TEAP (pH 3,2) 50 / 50 (v/v); Gradient, Teile A + Teile B: Start: 96 + 4; 30 min: 50 + 50; 40 min: 10 + 90; 50 min: 10 + 90; 55 min: 96 + 4; 70 min: 96 + 4; Flussrate: 0,3 ml/min; Detektion DAD (265 nm)

Schritt 1: Flüssig-Flüssig-Verteilung an Extrelut (Kap. 2.3.2)



Schritt 2: Festphasenextraktion an Kieselgel (Kap. 2.3.2)



Schritt 3: Festphasenextraktion an SCX (Kap.2.4)

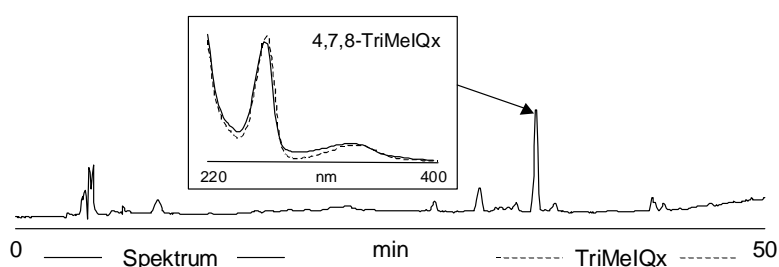


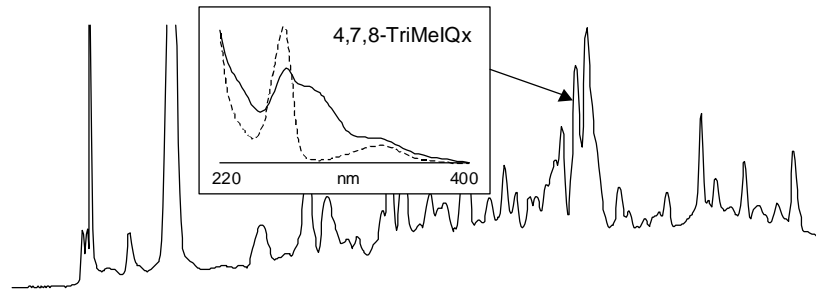
Abb. 17 Reaktionsaroma Langzeit-Niedertemperatur: Xylose/Fleischextrakt 1 : 1, aw = 0,52, T = 110 °C, 6 h HPLC-Chromatogramm mit 4,7,8-TriMeIQx dotiert; Supersphere RP-select b (4 µm) 250 x 3 mm; Lsg. A: 0,01 m TEAP (pH 2,8) Lsg. B: Acetonitril / 0,01 m TEAP (pH 3,2) 50 / 50 (v/v); Gradient, Teile A + Teile B: Start: 96 + 4; 30 min: 50 + 50; 40 min: 10 + 90; 50 min: 10 + 90; 55 min: 96 + 4; 70 min: 96 + 4; Flussrate: 0,3 ml/min; Detektion DAD (265 nm)

In den Abbildungen 16 und 17 wurde schrittweise die Effizienz der jeweiligen Extraktion und der nachfolgenden Reinigungsschritte an einem niedertemperatur-langzeiterhitzten, mit 4,7,8-TriMeIQx dotierten Reaktionsaroma mit einem Zusatz von 1 g Xylose pro g Fleischextrakt untersucht. Der aw-Wert wurde auf 0,52 eingestellt. Die Erhitzungstemperatur betrug 110 °C bei einer Erhitzungsdauer von 6 Stunden. Wie aus den Abbildungen 16 und 17 hervorgeht sind beide, jeweils aus mehreren aufeinanderfolgenden Reinigungsschritten bestehenden Methoden geeignet, die Extrakte aus dem von uns hergestellten niedertemperatur-langzeiterhitzten Reaktionsaroma wirkungsvoll zu reinigen.

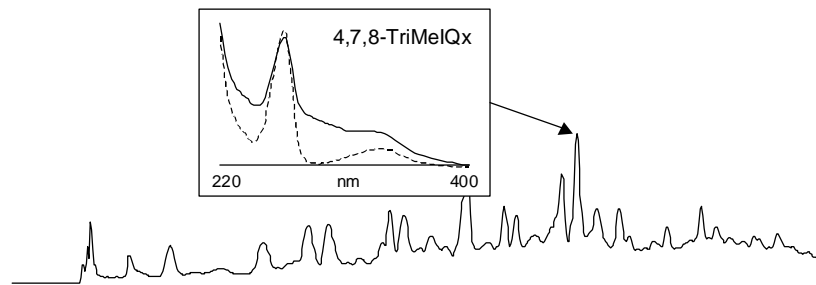
Hochtemperatur-kurzzeiterhitztes Reaktionsaroma:

In den Abbildungen 18 und 19 wurde wiederum schrittweise die Effizienz der jeweiligen Extraktions- und Reinigungsmethoden an einem hochtemperatur-kurzzeiterhitzten, ebenfalls mit TriMeIQx dotierten Reaktionsaroma mit einem Zusatz von 1 g Xylose pro g Fleischextrakt untersucht.

Schritt 1: Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan (Kap. 2.3.1)



Schritt 2: Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Ammoniak (Kap. 2.3.1)



Schritt 3: Festphasenextraktion an SCX (Kap.2.4)

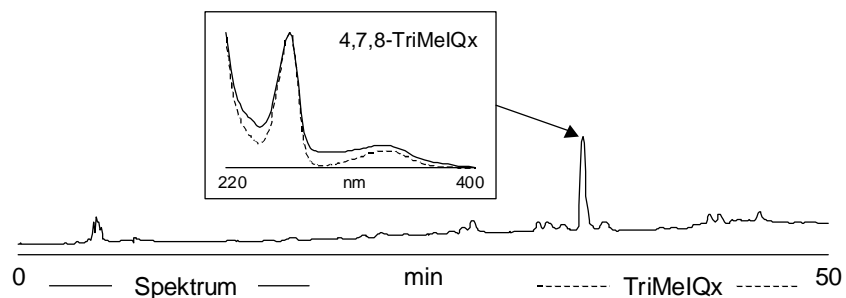
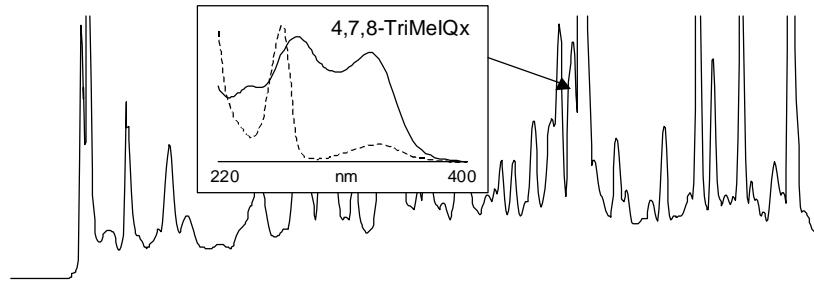


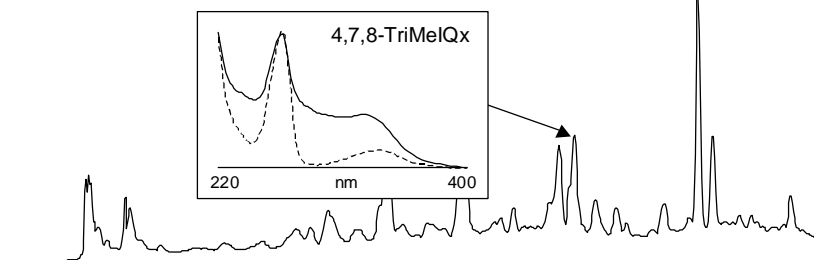
Abb. 18 Reaktionsaroma Kurzzeit-Hochtemperatur: Xylose/Fleischextrakt 1 : 1, aw = 0,52, T = 150 °C, 1 h HPLC-Chromatogramm mit 4,7,8-TriMeIQx dotiert; Supersphere RP-select b (4 µm) 250 x 3 mm; Lsg. A: 0,01 m TEAP (pH 2,8) Lsg. B: Acetonitril / 0,01 m TEAP (pH 3,2) 50 / 50 (v/v); Gradient, Teile A + Teile B: Start: 96 + 4; 30 min: 50 + 50; 40 min: 10 + 90; 50 min: 10 + 90; 55 min: 96 + 4; 70 min: 96 + 4; Flussrate: 0,3 ml/min; Detektion DAD (265 nm)

Der aw-Wert wurde auf 0,52 eingestellt. Die Erhitzungstemperatur betrug 150 °C bei einer Erhitzungsdauer von 1 Stunde. Wie aus den Abb. 18 und 19 hervorgeht, sind beide Methoden geeignet, die Extrakte aus dem von uns hergestellten hochtemperatur-kurzzeiterhitzten Reaktionsaroma wirkungsvoll zu reinigen.

Schritt 1: Flüssig-Flüssig-Verteilung an Extrelut (Kap. 2.3.2)



Schritt 2: Festphasenextraktion an Kieselgel (Kap. 2.3.2)



Schritt 3: Festphasenextraktion an SCX (Kap.2.4)

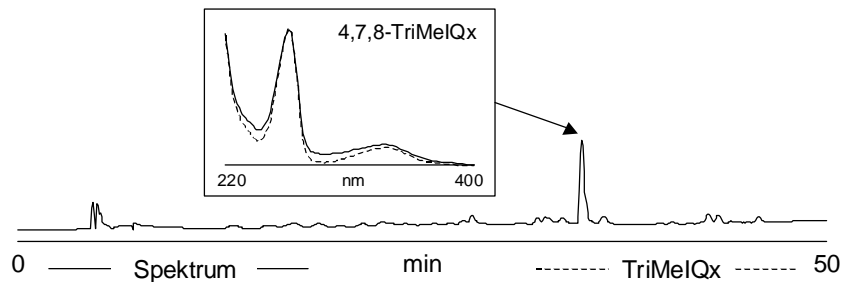


Abb. 19 Reaktionsaroma Kurzzeit-Hochtemperatur: Xylose/Fleischextrakt 1 : 1, aw = 0,52, T = 150 °C, 1 h HPLC-Chromatogramm mit 4,7,8-TriMeIQx dotiert; Supersphere RP-select b (4 µm) 250 x 3 mm; Lsg. A: 0,01 m TEAP (pH 2,8) Lsg. B: Acetonitril / 0,01 m TEAP (pH 3,2) 50 / 50 (v/v); Gradient, Teile A + Teile B: Start: 96 + 4; 30 min: 50 + 50; 40 min: 10 + 90; 50 min: 10 + 90; 55 min: 96 + 4; 70 min: 96 + 4; Flussrate: 0,3 ml/min; Detektion DAD (265 nm)

Modellsysteme:

Schuirman beobachtete einen exponentiellen Anstieg der HAA-Bildung in wasserarmen Modellsystemen aus Glucose, Glycin und Kreatinin bis 150 °C [43], während andere Arbeitsgruppen den Einfluss der Temperatur auf die HAA-Bildung auch über 150 °C untersuchten (Kap. 3.1, Tabelle 8) und dabei feststellten, dass die HAA-Bildung bei höheren Temperaturen innerhalb kurzer Zeit ein Maximum erreicht. Ausgehend von den Modellsystemen von Schuirman wollen wir den Einfluss der Temperatur, auch über 150 °C, auf die HAA-Bildung bei Verwendung von Xylose untersuchen und mit dem Einfluss der Glucose auf die HAA-Bildung vergleichen. Dabei war zu beobachten, dass mit steigender

Temperatur die Anzahl der Störpeaks zunimmt. Aus Abbildung 20 wird ersichtlich, dass uns die beschriebenen Aufarbeitungsmethoden es ermöglichen, reine Extrakte selbst für wasserarme Modellsysteme, die einer Temperatur von 200 °C ausgesetzt wurden, zu gewinnen.

Die genaue Zusammensetzung und die verwendeten Reaktionsbedingungen der in der Abbildung 20 untersuchten Modellsysteme wird in Kapitel 3.2.2 beschrieben.

Bei beiden Extraktionsmethoden lag die Wiederfindungsrate der von uns untersuchten HAAs, in Abhängigkeit von der Matrix, maßgeblich in Abhängigkeit von der Erhitzungstemperatur (Abb. 20), zwischen 35 bis 80 %. Zum Vergleich: Bei der Verwendung von HAA-Standardlösung (Kap. 7.1) lag die Wiederfindungsrate der HAAs zwischen 60 und 80 %.

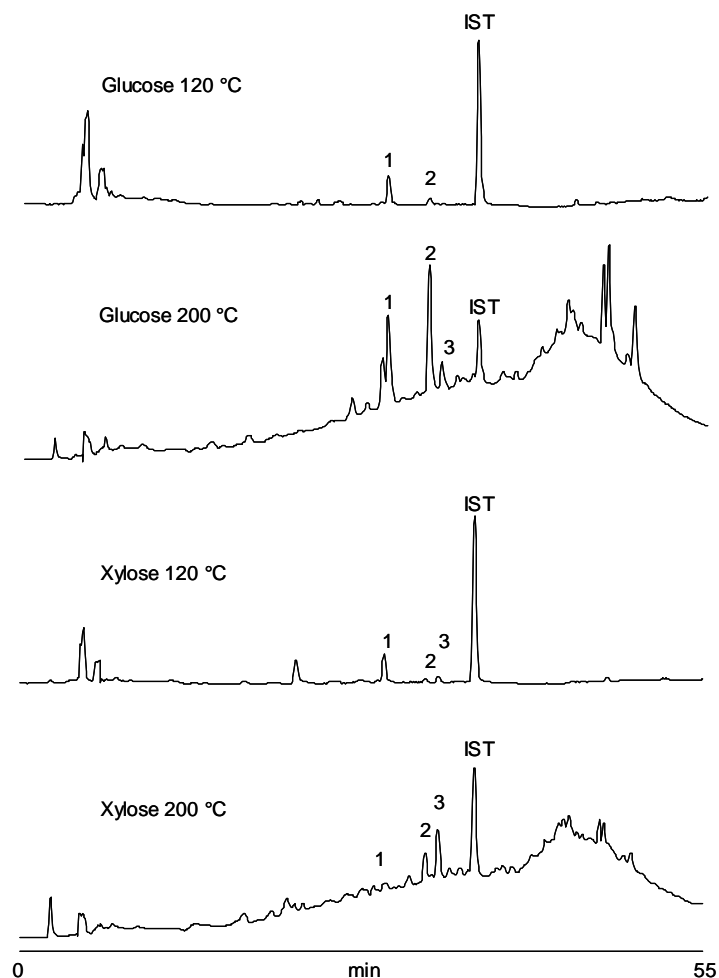


Abb. 20 Modellsysteme, red. Zucker : Glycin : Kreatinin in den Molmengenverhältnissen 0,5 : 1 : 1 auf Avicel; aw = 0,75, Erhitzungstemperaturen: 120 und 200 °C, Erhitzungsdauer 1 Stunde
HPLC-Chromatogramm: MeIQx (1), 7,8-DiMeIQx (2), 4,8-DiMeIQx (3), 4,7,8-TriMeIQx (IST), Supersphere RP-select b (4 µm) 250 x 3 mm; Lsg. A: 0,01 m Ammoniumformiat (pH 3,2) Lsg. B: Acetonitril / 0,01 m Ammoniumformiat (pH 3,2) 50 + 50 (v/v); Gradient, Teile A + Teile B : Start: 90 + 10; 30 min: 45 + 55; 40 min: 0 + 100; 55 min: 0 + 100; 60 min: 90 + 10; 80 min: 90 + 10; Flussrate: 0,3 ml/min; UV-Detektion (DAD): 265 nm

2.5 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

2.5.1. Auswahl des Säulenmaterials und der Fließmittel

Die meisten Untersuchungen der HAAs erfolgten mittels der HPLC, so dass diese als etabliert angesehen werden kann. Der Vorteil gegenüber der GC ist, dass sich alle HAAs, sowohl polare als auch apolare HAAs, problemlos trennen lassen. Bei den HAAs handelt es sich um basische Aromaten, deren Polarität stark vom pH-Wert abhängt (Kap. 2.1, 2.3). Als stationäre Phasen finden bevorzugt Reversed Phase-Materialien (RP), selten Kationenaustauscher Anwendung. Wir haben uns deshalb für den Einsatz von RP als stationäre Phase entschieden.

Bis auf Harman und Norharman besitzen die von uns untersuchten HAAs eine exocyclische Aminogruppe, die mit freien OH-Gruppen der RP-Phase über Wasserstoffbrückenbindung eine Wechselwirkung eingehen kann, so dass deshalb eine starke Bandenverbreiterung und unsymmetrischen Peaks die Folge sind. Dieses würde zu einer erhebliche Einbuße der Trennleistung und Empfindlichkeit führen, was in den von uns untersuchten Konzentrationsbereichen innerhalb der vorliegenden komplexen Matrices dazu führen würden, dass die HAAs nicht mehr detektierbar sind. Um dieses zu vermeiden, werden verschiedene Strategien angewandt.

Die noch freien OH-Gruppen der RP-Phase werden durch chemische Modifizierung (Endcapping) passiviert, so dass nur noch eine geringe Restaktivität vorliegt. Eine sterische Abschirmung der OH-Gruppen kann mit Hilfe von Isopropylseitenketten erzielt werden. Als sehr effektiv hat sich der Einsatz eines „Modifiers“ bewährt. Hierbei wird ein Amin im Überschuss zur mobilen Phase gegeben, welches dann die freien OH-Gruppen der RP-Phase belegt. Wahlweise kann man hierfür Triethylamin, Ammoniumacetat oder Ammoniumformiat einsetzen. Bei der Verwendung von Triethylamin lässt sich mit Phosphorsäure der gewünschte pH-Wert einstellen, so dass man einen Puffer erhält. Bei der Verwendung von Ammoniumacetat erfolgt die Einstellung des pH-Wertes mit Essigsäure und bei Ammoniumformiat mit Ameisensäure als korrespondierende Säure. Liegt der pH-Wert unter 3,5, werden die freien OH-Gruppen vollständig protoniert, was zu einer Erhöhung der Peaksymmetrie führt.

Da die Polarität der von uns untersuchten HAAs zum z.T. sehr unterschiedlich ist (Kap 2.4 Abb. 13), ist eine isokratische Trennung unmöglich. Stattdessen erfolgte die Trennung durch Gradientenelution unter Verwendung eines polaren organischen Lösungsmittels. Neben Methanol hat sich dabei besonders Acetonitril bewährt. In unseren

Untersuchungen standen uns RP-select b, RP-18e und Phenylphasen zur Verfügung. Im Zuge der stetigen Entwicklung effizienter stationärer Phasen sollen pentafluorierte Phenylphasen, die routinemäßig in der Drogenanalytik zur Trennung von aromatischen Aminen eingesetzt werden, nicht unerwähnt bleiben. Zum einen liegt hier ein aromatisches, planares System vor, welches die planaren HAAs hervorragend retiniert. Des Weiteren werden im Vergleich zu Phenylphasen die Wasserstoffatome durch Fluoratome ausgetauscht, so dass das freie Elektronenpaar des Stickstoffs nicht mehr mit dem Wasserstoff Wasserstoffbrückenbindungen eingehen kann. Beide Ursachen führen zu einer hohen Peaksymmetrie und somit zu einer verbesserten Trennleistung und Empfindlichkeit.

Bereits Schuirmann [43] verwendete eine LiChrospher 60 RP select b-Säule (250 x 4 mm, Korngröße 5 µm) in Verbindung mit einem Triethylammoniumphosphat-Puffer (TEAP), der auf einen pH-Wert von 3 eingestellt wurde, als mobile Phase. Um die Trennleistung zu optimieren, nutzte er eine Gradientenelution mit Acetonitril und erzielte damit gute Trennleistungen (Abb. 21). In unseren Untersuchungen wurde hingegen neben den von Schuirmann untersuchten HAAs auch IQx, Harman, Norharman und MeAαC untersucht, was dazu führte, dass mit der von Schuirmann entwickelten Methode sowohl IQx von IQ als auch Norharman von 4,8-DiMeIQx nicht ausreichend getrennt wurden. Um eine Trennung zu ermöglichen, wurde der von Schuirmann entwickelte Lauf modifiziert. Durch eine geringfügige Erhöhung des pH-Wertes auf 3,1 und durch die Verwendung eines steileren Gradienten war es uns möglich, alle 11 HAAs problemlos mit derselben Säule und derselben stationären Phase zu trennen (Abb. 22).

Um eine weitere Absicherung der Ergebnisse zu ermöglichen, kann die Polarität der zu untersuchenden HAAs über den pH-Wert variiert werden. Des Weiteren verschiebt sich das Absorptionsmaximum der HAAs mit dem pH-Wert, so dass neben einer zweiten Retentionszeit die Wellenlängenverschiebung zur Absicherung der Ergebnisse herangezogen werden kann (Kap. 2.5.2).

Vollenbröker [46] entwickelte aus diesem Grunde einen weiteren HPLC-Lauf bei einem pH-Wert von 7 (Abb. 23). Dabei ändert sich die Polarität der HAAs derart, dass sich die Reihenfolge, mit der sie von der stationären Phase eluiert werden, im Vergleich zum pH-Wert von 3 (Abb. 21), verändert. Der entscheidende Nachteil dieser Methode ist aber, dass die HAAs 7,8-DiMeIQx und 4,8-DiMeIQx nicht getrennt werden. Da sich unsere Untersuchungen auch eingehender mit der Bildung von 7,8-DiMeIQx neben 4,8-DiMeIQx beschäftigten, war eine Optimierung des von Vollenbröker entwickelten HPLC-Laufs zwingend notwendig.

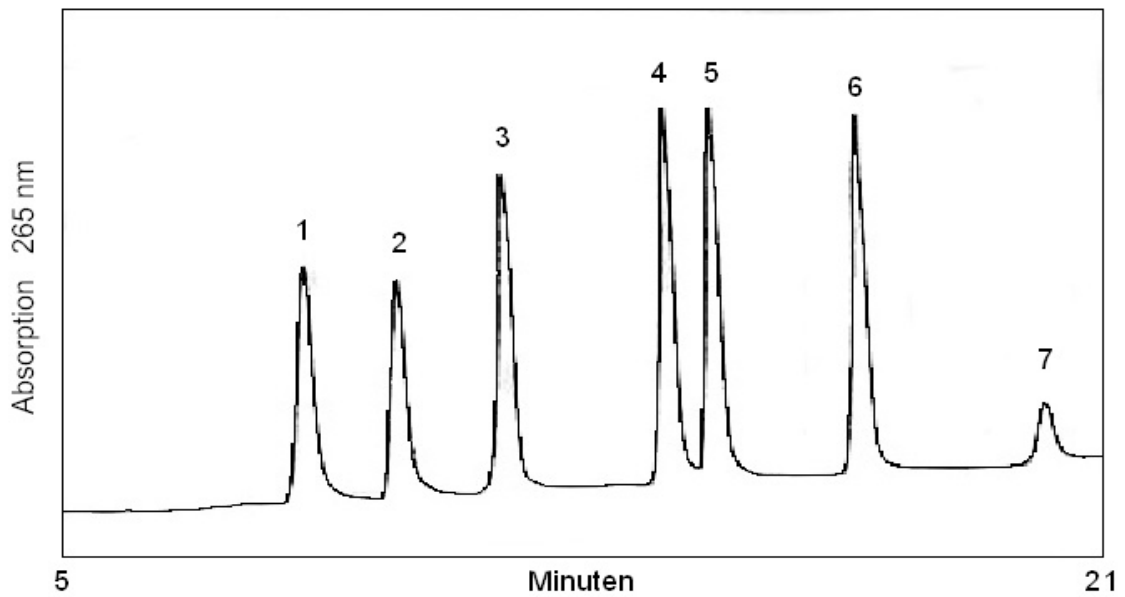


Abb. 21 HPLC-Chromatogramm von IQ (1), MeIQ (2), MeIQx (3), 7,8-DiMeIQx (4), 4,8 DiMeIQx (5), 4,7,8-TriMeIQx (6) und PhIP (7);

LiChrospher 60 RP-select b (5 μ m) 250 x 4 mm; Lsg. A: 0,01 m TEAP (pH 3,0); Lsg. B: Acetonitril / 0,01 m TEAP (pH 3,0) 50 / 50 (v/v); Gradient, Teile A + Teile B: Start: 90 + 10; 20 min: 50 + 50; 25 min 10 + 90; 27 – 40 min: 90 + 10; Flussrate: 1 ml/min; UV-Detektion: 265 nm

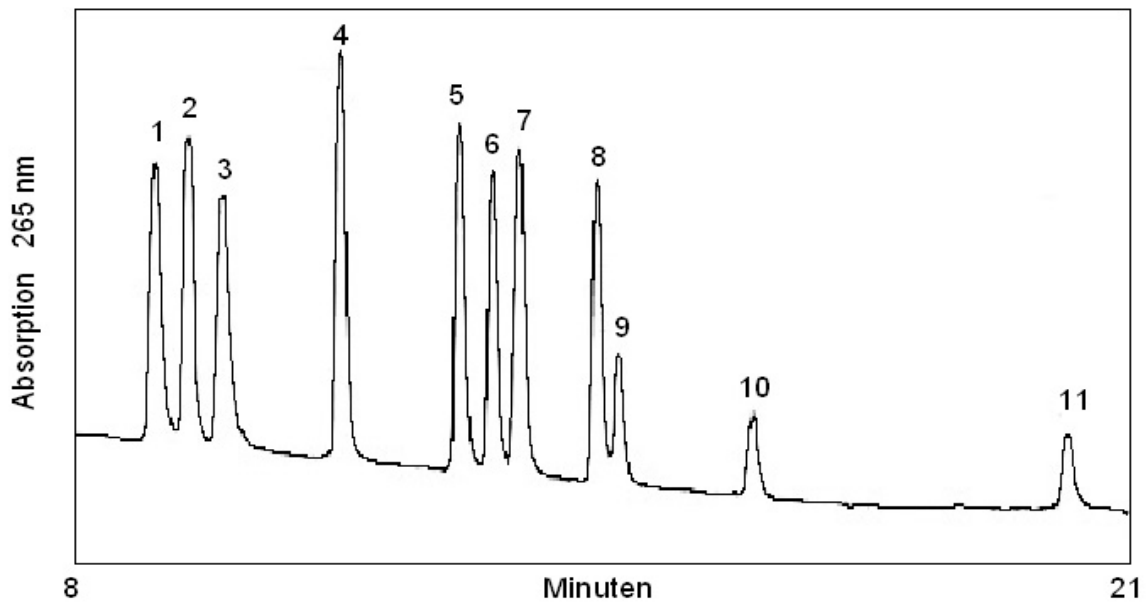


Abb. 22 HPLC-Chromatogramm von IQ (1), IQx (2), MeIQ (3), MeIQx (4), 7,8 DiMeIQx (5), 4,8-DiMeIQx (6), Norharman (7), 4,7,8-TriMeIQx (8), Harman (9), PhIP (10) und MeA α C (11).

LiChrospher 60 RP-select b (5 μ m) 250 x 4 mm; Lsg. A: 0,01 m TEAP (pH 3,1); Lsg. B: Acetonitril / 0,01 m TEAP (pH 3,1) 50 / 50 (v/v); Gradient, Teile A + Teile B: Start: 90 + 10; 20 min: 10 + 90; 25 min: 10 + 90; 27 min: 90 + 10; 40 min: 90 + 10 Flussrate: 1 ml/min; UV-Detektion: 265 nm

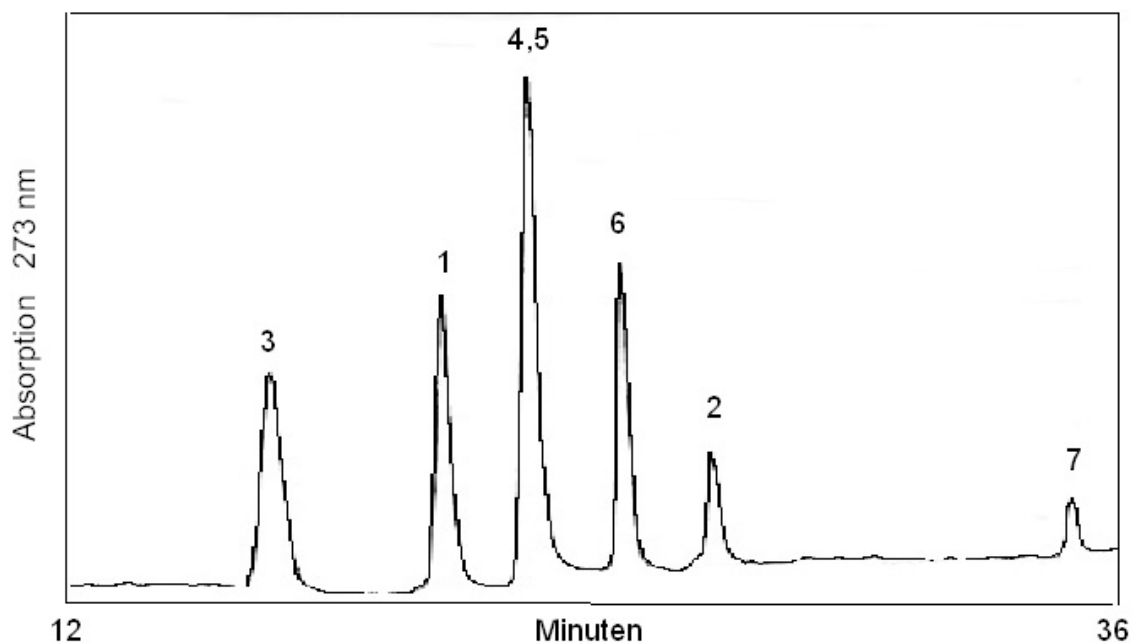


Abb. 23 HPLC-Chromatogramm von IQ (1), MeIQ (2), MeIQx (3), 7,8-DiMeIQx (4), 4,8-DiMeIQx (5), 4,7,8-TriMeIQx (6) und PhIP (7).

Zorbax SP-Phenyl (5 μ m) 250 x 4 mm; Lsg. A: 0,01 m TEAP (pH 7); Lsg. B: Acetonitril / 0,01 m TEAP (pH 7) 50 / 50 (v/v); Gradient, Teile A + Teile B: Start 70 + 30, 12 min: 70 + 30; 33 min: 0 + 100; 43 min: 0 + 100; 45 min: 70 + 30, 55 min: 70 + 30; Flussrate: 1 ml/min; UV-Detektion: 273 nm

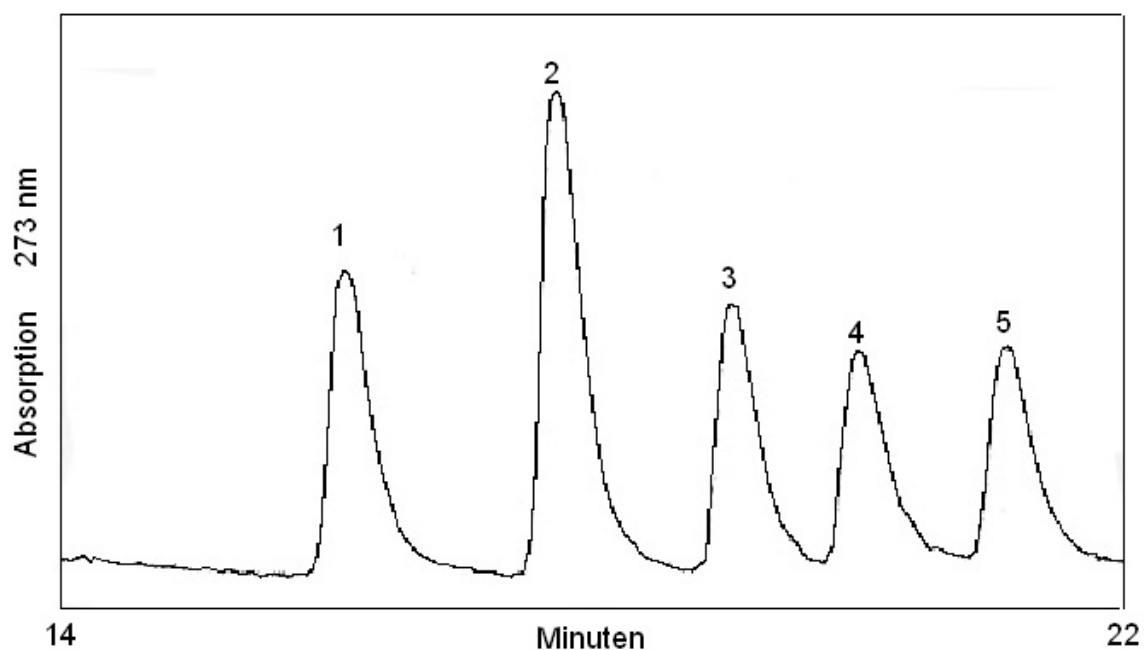


Abb. 24 HPLC-Chromatogramm von IQx (1), MeIQx (2), 7,8 DiMeIQx (3), 4,8-DiMeIQx (4) und 4,7,8-TriMeIQx (5).

LiChrospher 60 RP-select b; Lsg. A: 0,01 m TEAP (pH 7); Lsg. B: Acetonitril / 0,01 m TEAP (pH 7) 50 / 50 (v/v); Gradient, Teile A + Teile B : Start: 90 + 10, 25 min: 10 + 90; 30: min 10 + 90; 35 min: 90 + 10; 48 min: 10 + 90; Flussrate: 1 ml/min; UV-Detektion: 273 nm

Vollenbröker verwendete eine Säule, die mit Zorbax SP-Phenyl als stationäre Phase befüllt war, während wir als stationäre Phase LiChrosphere 60 RP select b verwendeten. Des Weiteren wurden von uns die Trennbedingungen so gewählt, dass wir mit dem Start der Gradientenelution bei niedrigeren Acetonitrilgehalten als Vollenbröker begonnen haben und der Gradient steiler verlief. Wie aus der Abb. 24 hervorgeht, kann durch die beschriebene Modifizierung der Trennbedingungen eine gute Trennung von 7,8-DiMeIQx und 4,8-DiMeIQx erzielt werden. Mit der Trennung beider HAAs bei einem pH-Wert von 7 war somit eine Absicherung der Ergebnisse durch einen zweiten HPLC-Lauf möglich.

In den letzten Jahren haben sich die Säulendurchmesser und die Partikelgröße der stationären Phasen in der HPLC verkleinert, so dass bei einer gleichzeitig erhöhten Trennleistung über die vergrößerte Oberfläche die Flussrate vermindert und damit auch der Lösungsmittelverbrauch deutlich reduziert werden kann.

Als Trennsäule verwendeten wir eine Narrowborsäule mit 2 mm Durchmesser und einer Länge von 250 mm sowie als stationäre Phase Supersphere RP-select b einer Korngröße von 4 µm. Durch die kleinere Körnung im Vergleich zu der vorher verwendeten Körnung von 5 µm liegt eine größere Oberfläche vor, so dass sowohl die Trennleistung als auch die Peaksymmetrie zunimmt, was auch zu einer Steigerung der Empfindlichkeit führt. Durch Flussraten von 0,2 ml/min konnten wir den Lösungsmittelverbrauch um 80 % reduzieren.

Von Nachteil war aber, dass der HPLC-Lauf bei Flussraten von 0,2 ml/min mit der von uns verwendeten HPLC-Anlage deutlich störanfälliger war als bei einer Flussrate von 1 ml/min, unter Verwendung der herkömmlichen Säulendurchmesser, wodurch sich IQ und IQx nicht optimal trennen ließen (Abb. 25).

Es war somit naheliegend, Säulen mit einem Durchmesser von 3 mm zu verwenden, um sowohl den Lösungsmittelverbrauch zu reduzieren als auch die Trennleistung zu optimieren. Alle von uns untersuchten 11 HAAs ließen sich mit einer mit Supersphere RP-select b (4 µm) gefüllten 250 mm langen Säule von 3 mm Durchmesser sowohl bei einem pH-Wert von 2,8 (Abb. 26) als auch von 7 (Abb.27) problemlos trennen.

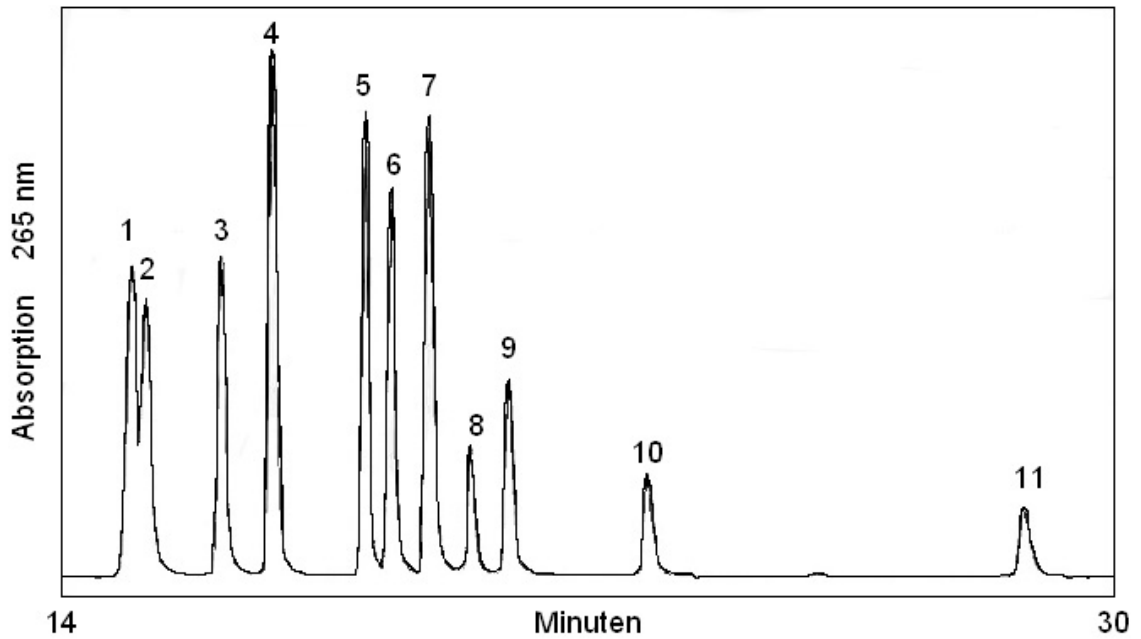


Abb. 25 HPLC-Chromatogramm von IQ (1), IQx (2), MeIQ (3), MeIQx (4), 7,8 DiMeIQx (5), 4,8-DiMeIQx (6), Norharman (7), 4,7,8-TriMeIQx (8), Harman (9), PhIP (10) und MeA α C (11).
Supersphere RP-select b (4 μ m) 250 x 2 mm; Lsg. A: 0,01 m TEAP (pH 3,1) Lsg. B: Acetonitril / 0,01 m TEAP (pH 3,1) 50 / 50 (v/v); Gradient, Teile A + Teile B: Start: 90 + 10; 20 min: 10 + 90; 35 min: 10 + 90; 37 min: 90 + 10; 50 min: 90 + 10; Flussrate: 0,2 ml/min; UV-Detektion (DAD): 265 nm

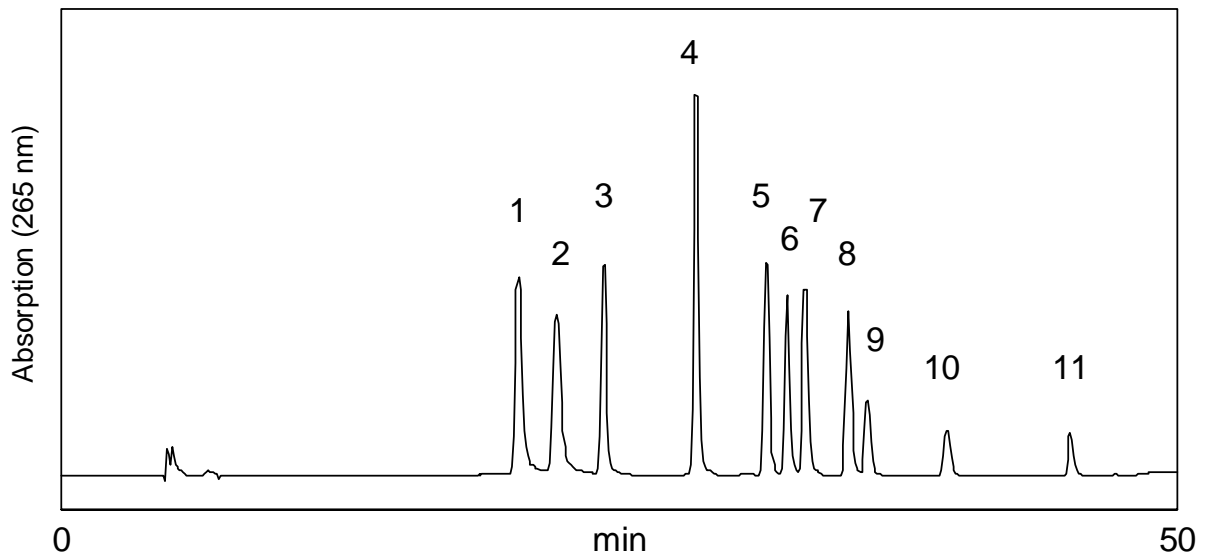


Abb. 26 HPLC-Chromatogramm von IQ (1), IQx (2), MeIQ (3), MeIQx (4), 7,8 DiMeIQx (5), 4,8-DiMeIQx (6), Norharman (7), 4,7,8-TriMeIQx (8), Harman (9), PhIP (10) und MeA α C (11).
Supersphere RP-select b (4 μ m) 250 x 3 mm; Lsg. A: 0,01 m TEAP (pH 2,8); Lsg. B: Acetonitril / 0,01 m TEAP (pH 3,2) 50 / 50 (v/v); Gradient, Teile A + Teile B: Start: 96 + 4; 30 min: 50 + 50; 40 min 10 + 90; 50 min: 10 + 90; 55 min: 96 + 4; 70 min: 96 + 4; Flussrate: 0,3 ml/min; UV-Detektion: 265 nm

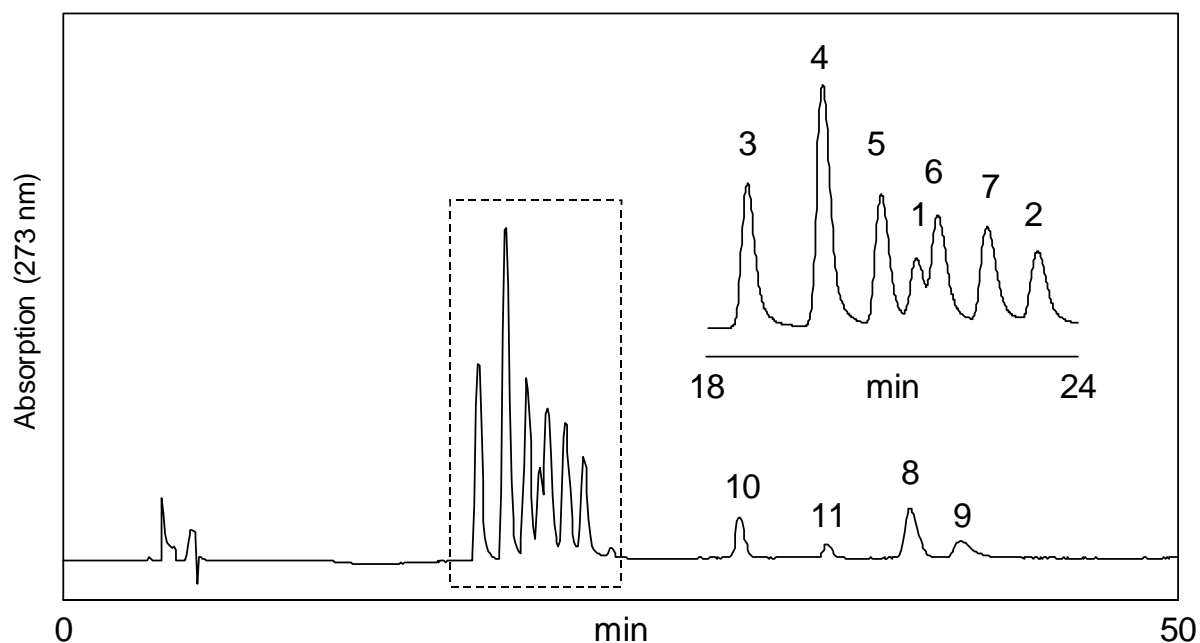


Abb. 27 HPLC-Chromatogramm von IQ (1), IQx (2), MeIQ (3), MeIQx (4), 7,8 DiMeIQx (5), 4,8-DiMeIQx (6), Norharman (7), 4,7,8-TriMeIQx (8), Harman (9), PhIP (10) und MeAc α C (11).
Supersphere RP-select b (4 μ m) 250 x 3 mm; Lsg. A: 0,01 m TEAP (pH 7,0); Lsg. B: Acetonitril / 0,01 m TEAP (pH 7,0) 50 / 50 (v/v); Gradient, Teile A + Teile B: Start: 80 + 20; 20 min: 0 + 100; 50 min 0 + 100; 55 min: 80 + 20; 75 min: 80 + 20; Flussrate: 0,3 ml/min; UV-Detektion: 265 nm

Es konnte beobachtet werden, dass bei der Verwendung von TEAP als Puffer die Peaksymmetrie mit steigender Anzahl der HPLC-Läufe abnahm [43, 89]. Diese Beobachtung konnte auch von uns bestätigt werden. Als Folge musste die Säule nach 30 bis 50 HPLC-Läufen konditioniert werden, was bei den niedrigen Flussraten sehr zeitaufwendig war. Mit einem von uns an Stelle des TEAP-Puffers eingesetzten Ammoniumformiatpuffer blieb die Trennleistung der Säule einen längeren Zeitraum (mindestens 1 Jahr) erhalten. Ein weiterer Vorteil des Ammoniumformiatpuffers gegenüber dem TEAP-Puffer war seine nahezu unbegrenzte Lagerstabilität.

2.5.2 Detektion

2.5.2.1 Photodiodenarray-Detektor (DAD)

UV-Vis Detektoren finden in der HAA-Analytik praktisch keine Anwendung mehr und sind fast vollständig durch den Einsatz von DADs verdrängt worden. Ein entscheidender Nachteil der UV-Vis-Detektoren ist, dass die Detektion nur bei einer konstanten Wellenlänge erfolgt. Für die routinemäßige Analytik von Verbindungen mit einem hohen molaren Extinktionskoeffizienten im Konzentrationsbereich von wenigen μ g/g bis mg/g liefert der UV-Vis Detektor auch meist zufriedenstellende Ergebnisse.

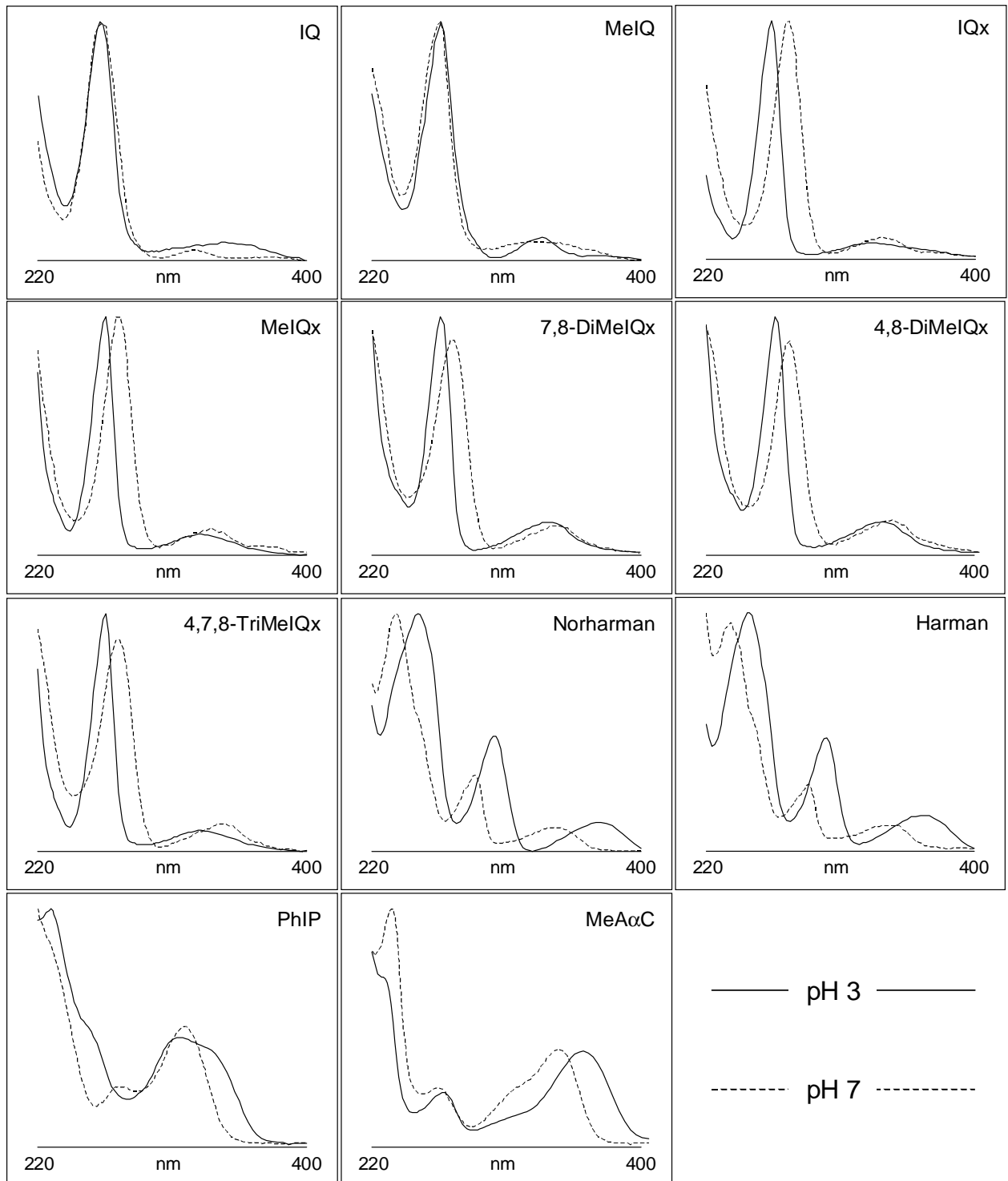


Abb. 28 UV-Absorptionsspektren verschiedener HAAs

Die von uns untersuchten HAAs liegen aber nur im Konzentrationsbereich von wenigen pg bis ng/g in einer komplexen Matrix vor (Kap. 1.4, Tabelle 3). Störpeaks können so nicht von HAAs unterschieden werden, was zwangsläufig zu Fehlinterpretationen führt. Der DAD ermöglicht eine Lichtabsorptionsmessung in einem definierten Wellenlängenbereich. Neben

der Retentionszeit kann somit das UV-Spektrum zur Absicherung der Ergebnisse herangezogen werden, was zu einer Erhöhung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse führt (Kap. 2.4, Abb. 16 - 19, UV-Spektrum von 4,7,8-TriMeIQx). Wie aus Abbildung 28 hervorgeht, haben die von uns untersuchten HAAs charakteristische UV-Spektren, die vom pH-Wert abhängen. Während die Chinoline IQ und MeIQ sowohl bei einem pH-Wert von 3 als auch von 7 ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 265 nm haben, liegt das Absorptionsmaximum der Chinoxaline bei einem pH-Wert von 3 bei 265 nm und bei einem pH-Wert von 7 bei 273 nm. Eine Abhängigkeit des UV-Spektrums vom pH-Wert ist auch bei Harman, Norharman, PhIP und MeAaC zu beobachten.

2.5.2.2 Elektrochemischer Detektor

Zur weiteren Absicherung der Ergebnisse kann ein elektrochemischer Detektor verwendet werden. Er besticht durch eine hohe Selektivität und Empfindlichkeit. Das Potential kann im Bereich von - 1,2 bis + 1,4 V variiert werden; unterhalb dieses Intervalls erfolgt eine Zersetzung des Wassers und oberhalb des Intervalls eine Oxidation des gelösten Sauerstoffs. Durch das Anlegen einer entsprechenden Spannung können die HAAs, die eine exocyclische Aminogruppe enthalten, oxidiert werden. Demzufolge ist die Oxidation aller von uns untersuchten HAAs bis auf Harman und Norharman (Kap. 1.2) im Prinzip möglich. Beim Messprinzip kann in amperometrische und coulometrische Detektion unterschieden werden. Bei der amperometrischen Detektion erfolgt ein Stoffumsatz im Bereich von 10 %, während er bei der coulometrischen Detektion bis zu 100 % betragen kann, da die Umsetzung an einer vergrößerten Elektrodenoberfläche aus porösem Graphit erfolgt. Daraus ergibt sich aber keine zehnfache Empfindlichkeit gegenüber der amperometrischen Detektion, da bei der coulometrischen Detektion auch das Untergrundsignal verstärkt wird. Ein entscheidender Vorteil der coulometrischen Detektion ist aber, dass hier die oxidierten HAAs in einer zweiten Zelle wieder reduziert werden können, während die meisten bereits oxidierten Störsubstanzen nicht mehr reduziert werden. Erst durch die Peakflächenverhältnisse der durch die Oxidation und Reduktion gewonnenen Chromatogramme kann eine Absicherung erfolgen, ob es sich tatsächlich um die gesuchte Verbindung handelt. Um die Empfindlichkeit zu steigern, ist das Vorschalten einer Zelle, deren Potential so eingestellt wird, dass nur die Störsubstanzen und nicht die HAAs oxidiert werden, sinnvoll. Durch die vergrößerte Oberfläche der Messelektrode ergibt sich bei der coulometrischen Detektion ein erheblicher Vordruck, der ein Vorschalten eines DAD unmöglich macht, da sonst die DAD-Zelle durch den Druck zerstört würde. Ein Nachschalten des DADs hinter eine coulometrische Messzelle

ist ungünstig, da durch eine Bandenverbreiterung die Empfindlichkeit beeinträchtigt wird. Um eine parallele Detektion der HAAs mit dem DAD und mit dem elektrochemischen Detektor zu ermöglichen, haben wir uns für die amperometrische Detektion entschieden. Die alleinige Detektion der HAAs mit einem ELCD bietet, anders als bei einem DAD, (Kap. 2.5.2.1) nicht die Möglichkeit, abzuschätzen, ob es sich bei dem vorliegenden Peak tatsächlich um die vermutete Verbindung handelt.

Das elektrochemische Potential, welches für die Oxidation der HAAs benötigt wird, ist vom pH-Wert abhängig. Bei einem pH-Wert von 3 erfolgt die Oxidation bei 1,05 V, während sie bei einem pH-Wert von 7 bei einem Potential von 0,75 V erfolgt, was zur weiteren Absicherung genutzt werden kann.

Bereits Schuirmann [43] und Nutt [89] setzten elektrochemische Detektoren in ihren Untersuchungen zu den HAAs ein. Da bei beiden die Trennung der HAAs durch Gradientenelution erfolgte, war ein z.T. starkes Driften der Basislinie zu beobachten. In unseren Untersuchungen wurden anders als bei Schuirmann nicht nur 7 HAAs getrennt sondern 11, so dass die Gradientenelution zur besseren Trennleistung steiler verlaufen musste. Demzufolge ergab sich in unseren Untersuchungen ein noch stärkeres Driften der Basislinie, was die Auswertung erschwerte. Des Weiteren können, wie bereits erwähnt, Harman und Norharman nicht elektrochemisch detektiert werden. Diese beiden Verbindungen konnten aber in z.T. erheblichen Mengen in Rindfleischextrakt und Reaktionsaromen nachgewiesen werden (Kap. 1.4, Tabelle 3). Auch standen uns am Ende unserer Untersuchungen eine verlässliche GC- [123] und LC-MS-Methode zur Verfügung, so dass die Absicherung der Ergebnisse durch die wesentlich aussagekräftigeren Massenspektren (Mutter- und Tochterionen) erfolgen konnte.

2.5.2.3 Fluoreszenzdetektor

Als weitere Möglichkeit der Detektion bietet sich für Harman, Norharman, PhIP und MeAαC die Fluoreszenz an. Über die delokalisierten π -Elektronensysteme der HAAs wird Lichtenergie absorbiert. Typisch für diese starren Strukturen ist das Phänomen der Fluoreszenz, wo die Energie in Form von Licht niedrigerer Energie als die durch Absorption aufgenommene Energie wieder abgegeben wird. Bei den Chinolinen und Chinoxalinen ist eine Fluoreszenzmessung bei der HPLC nicht möglich, da das Absorptionsspektrum und das Emissionsspektrum zu eng zusammen liegen [89]. Ein erheblicher Vorteil ist jedoch die hohe Selektivität und Empfindlichkeit.

In komplexer Matrix ist Fluoreszenzlöschung nicht auszuschließen; weiterhin ist in der Spurenanalytik bei dem derzeitigen Stand der Technik eine Wiederfindung von 100 % utopisch. Aus den oben genannten Gründen ist somit eine quantitative Bestimmung der Analyten über die Verwendung des internen Standards 4,7,8-TriMeIQx nicht möglich. Die Gehalte der gesuchten Verbindung müssen daher über eine wesentlich ungenauere externe Kalibrierung ermittelt werden. Alternativ kann die Genauigkeit der quantitativen Bestimmung über das zeitaufwendige Standardadditionsverfahren gesteigert werden. Die Identifizierung der HAAs kann aber in den meisten Fällen einfach über die Peakflächenverhältnisse aus DAD und Fluoreszenzdetektion abgesichert werden.

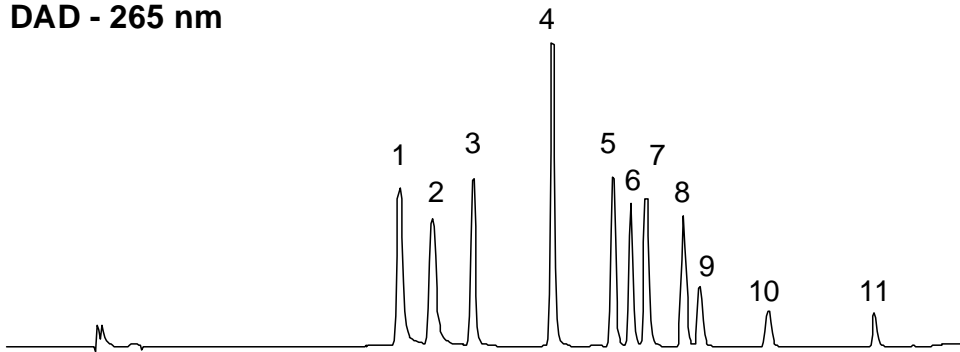
Bei der fluorimetrischen Detektion der genannten, fluoreszenzaktiven HAAs erfolgt die Anregung bei einer Wellenlänge von 333 nm und die Emission bei einer Wellenlänge von 388 nm. Im Vergleich zum DAD ist die Empfindlichkeit bei PhIP etwa um drei Zehnerpotenzen und für Harman, Norharman und MeA α C um bis zu 2 Zehnerpotenzen größer.

Zusammenfassend werden die beschriebenen Detektionsmethoden in den Abbildungen 29 und 30 dargestellt.

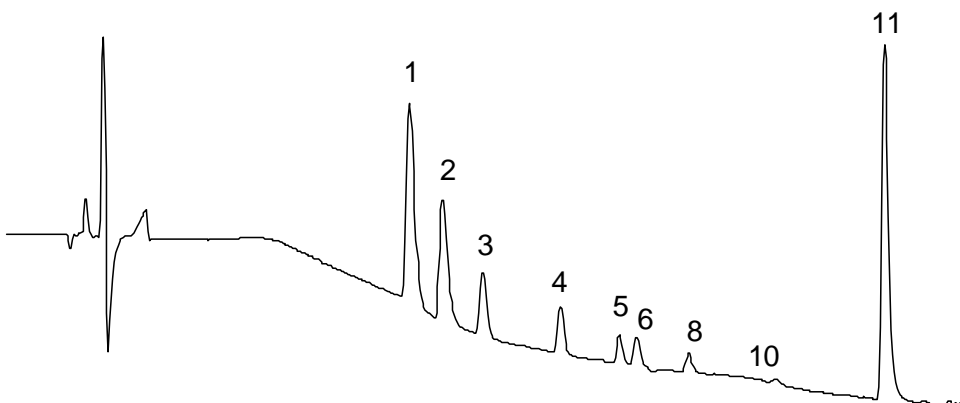
Bei einem pH-Wert von 2,8 (Abb. 29) können alle 11 HAAs mit dem DAD quantitativ bestimmt und über das UV-Spektrum identifiziert werden (Kap. 2.5.2.1, Abb. 28). Zu berücksichtigen ist, dass das in Abbildung 29 dargestellte Chromatogramm bei einer konstanten Wellenlänge von 265 nm, also im Absorptionsmaximum der Chinoline und Chinoxaline, aufgenommen wurde.

Bei der elektrochemischen Detektion ist durch das Driften der Basislinie eine empfindliche Detektion nur bei MeA α C, IQx, IQ, MeIQx und MeIQx möglich. Da bei der elektrochemischen Detektion vom internen Standard 4,7,8-TriMeIQx nur ein sehr schwaches Signal ausgeht, ist hier eine quantitative Bestimmung der HAAs mit Hilfe des ELCD mit großen Fehlern behaftet, zumal der interne Standard sich bezüglich des Responsefaktors nahezu identisch verhalten sollte wie die zu quantifizierenden Verbindungen. Eine quantitative Bestimmung mit Hilfe des ELCDs wäre also nur bei einer isokratischen Trennung möglich, die aber aufgrund der Trennansprüche, die in unseren Untersuchungen gestellt werden, nicht zu realisieren ist. Wie zu erwarten, sind keine Signale von Harman und Norharman zu beobachten.

DAD - 265 nm



ELCD - 1,05 V



Fluoreszenz - 333/388 nm

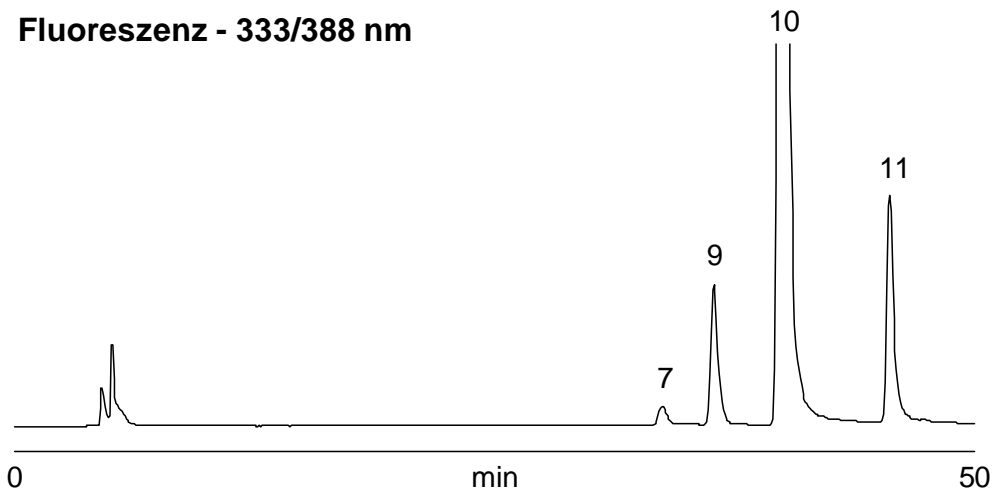


Abb. 29 Gegenüberstellung verschiedener Detektionsmethoden bei der HPLC-Trennung von HAAs bei pH 2,8: IQ (1), IQx (2), MeIQ (3), MeIQx (4), 7,8 DiMeIQx (5), 4,8-DiMeIQx (6), Norharman (7), 4,7,8-TriMeIQx (8), Harman (9), PhIP (10) und MeA α C (11). Supersphere RP-select b (4 μ m) 250 x 3 mm; Lsg. A: 0,01 m TEAP (pH 2,8) Lsg. B: Acetonitril / 0,01 m TEAP (pH 3,2) 50 / 50 (v/v); Gradient, Teile A + Teile B: Start: 90 + 4; 30 min: 50 + 50; 40 min 10 + 90; 50 min: 10 + 90; 55 min 96 + 4; 70 min 96 + 4 Flussrate: 0,3 ml/min

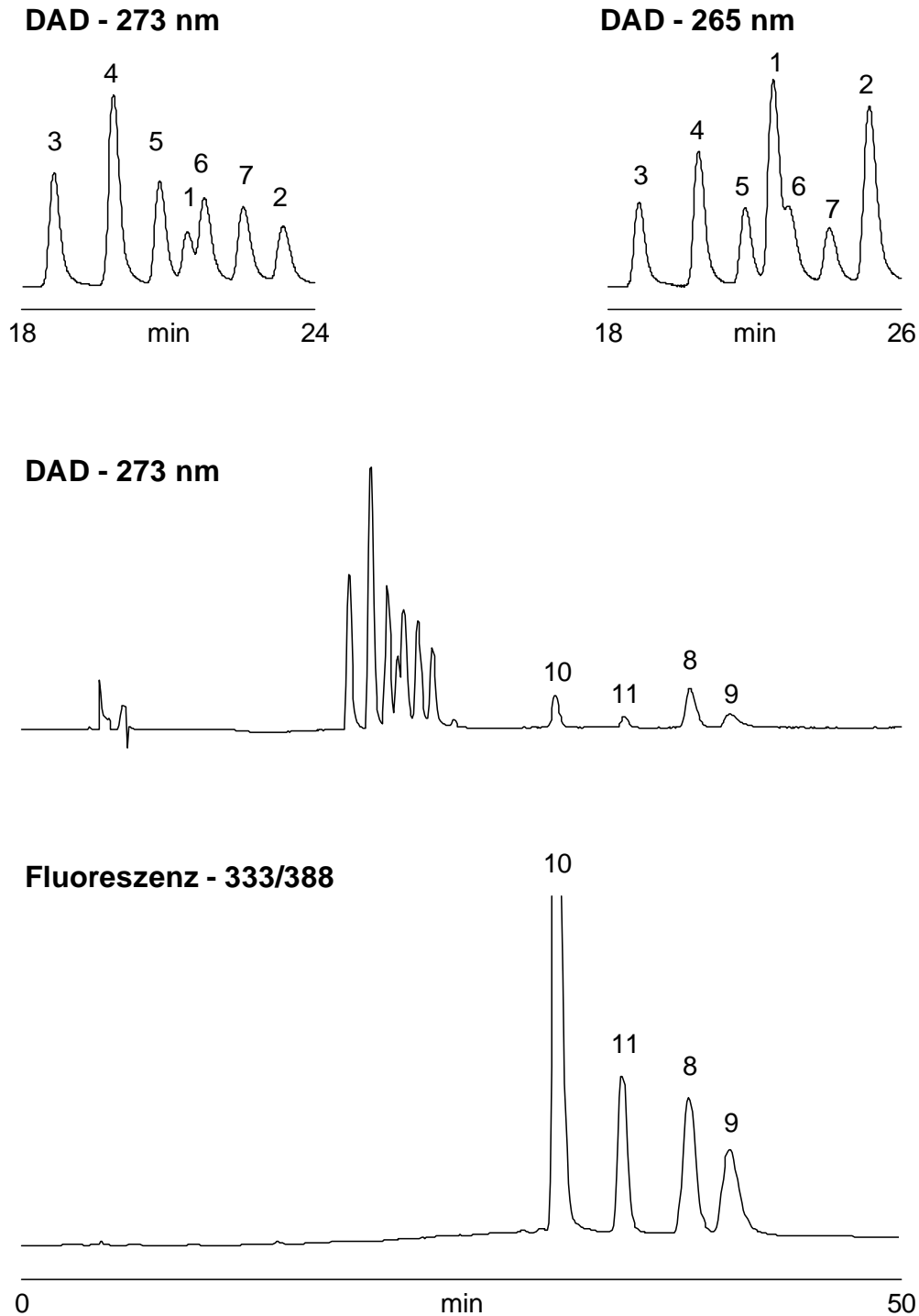


Abb. 30 Gegenüberstellung verschiedener Detektionsmethoden bei der HPLC-Trennung von HAAs bei pH 7,0: IQ (1), IQx (2), MeIQ (3), MeIQx (4), 7,8 DiMeIQx (5), 4,8-DiMeIQx (6), Norharman (7), 4,7,8-TriMeIQx (8), Harman (9), PhIP (10) und MeAαC (11).

Supersphere RP-select b (4 μ m) 250 x 3 mm; Lsg. A: 0,01 m TEAP (pH 7,0) Lsg. B: Acetonitril / 0,01 m TEAP (pH 7,0) 50 / 50 (v/v); Gradient, Teile A + Teile B: Start: 80 + 20; 20 min: 0 + 100; 50 min: 0 + 100; 55 min: 80 + 20; 75 min: 80 + 20; Flussrate: 0,3 ml/min

Die Fluoreszenzdetektion stellt insbesondere für PhIP eine sehr empfindliche Detektionsmethode dar, während bei der selben Verbindung im ELCD nur ein sehr schwaches Signal zu beobachten ist. Diese Methode ist auch sehr gut geeignet für die Detektion von MeA α C, Harman, eingeschränkt auch für Norharman.

Die quantitative Bestimmung erfolgt in unseren Untersuchungen über den DAD. Hierbei muss aber berücksichtigt werden, dass die Extrakte ausreichend rein sein müssen, da sonst die Nachweisgrenze (Kap. 2.1, Tabelle 6) möglicherweise höher ist als die Gehalte an HAAs in der zu untersuchenden Probe. In Tabelle 7 wird das Detektionslimit (absolut) der HAAs aufgeführt. Definitionsgemäß handelt es sich hierbei um das dreifache Signal-Rauschverhältnis bei der Verwendung eines Standards. Mit Hilfe der Tabelle 7 lässt sich ermitteln, wie viel Probe mindestens eingewogen werden muss, um eine Detektion der HAAs zu ermöglichen, und wie viel interner Standard dabei benötigt wird.

Tabelle 7 Detektionslimit (absolut) der HAAs mit dem DAD; pH 2,8

HAA	Detektionslimit [ng]	Wellenlänge
IQ	0,2	265
MeIQ	0,2	265
Iqx	0,2	265
MeIQx	0,2	265
7,8-DiMeIQx	0,2	265
4,8-DiMeIQx	0,2	265
4,7,8-TriMeIQx	0,2	265
Harman	0,3	250
Norharman	0,3	250
PhIP	1,2	315
MeA α C	0,4	357

Auch bei einem pH-Wert von 7,0 (Abb. 30) können alle 11 HAAs (IQ und 4,8-DiMeIQx durch Fällung des Lotes) mit dem DAD quantitativ bestimmt und über das UV-Spektrum identifiziert werden (Kap. 2.5.2.1, Abb. 28). Die Trennleistung bei einem pH-Wert von 7 ist aber der Trennleistung bei einem pH-Wert von 2,8 unterlegen, da die Peaks der HAAs IQ und 4,8-DiMeIQx nicht vollständig aufgelöst werden. Sie lassen sich jedoch problemlos bei unterschiedlichen Wellenlängen von 273 nm und 265 nm voneinander unterscheiden, da beide Verbindungen bei einem pH-Wert von 7 ein unterschiedliches

Absorptionsmaximum haben. So liegt bei einem pH-Wert von 7 das Absorptionsmaximum der Chinoline bei 265 nm, während das Absorptionsmaximum der Chinoxaline bei 273 nm liegt. Neben einer Verschiebung der Retentionszeit wird zudem das Absorptionsmaximum, bis auf das von IQ und MeIQ, verschoben, was zur einer weiteren Absicherung der Ergebnisse führt.

Zur weiteren Absicherung der durch den DAD gewonnenen Ergebnisse stellt die Fluoreszenzdetektion bei einem pH-Wert von 7 eine Ergänzung für den Nachweis von PhIP, MeA α C, Harman und Norharman dar.

2.6 Gaschromatographie

Mit der von Frandrup-Kuhr [123] entwickelten GC-Methode zur Trennung von HAAs stand uns zur Absicherung der aus der HPLC gewonnenen Ergebnisse eine weitere Methode zur Verfügung (Abb. 31). Da die Trennung der von uns untersuchten HAAs bei der GC vorwiegend über den Siedepunkt und nicht wie bei der HPLC vorwiegend über die Polarität verläuft, handelt es sich hier nicht nur um eine Alternative, sondern um ein völlig anderes physikalisches Trennprinzip. Wie bereits erwähnt, gestaltet sich die Trennung der polaren HAAs mit der Kapillar-GC äußerst schwierig, da diese zu einer Bandenverbreiterung neigen, wodurch die Empfindlichkeit erheblich beeinträchtigt wird. Somit war es für Frandrup-Kuhr entscheidend, ein geeignetes Derivatisierungsmittel für die polaren HAAs zu finden. Hierfür hat sich, aus der Aminosäureanalytik abgeleitet, eine 1 %ige Lösung aus tert-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMSCI) in N-Methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl)-trifluoracetamid (MTBSTFA) bewährt. Ein entscheidender Vorteil besteht darin, dass im SIM-Modus unerwünschte Störsubstanzen quasi „ausgeblendet“ werden können. Eine hohe Empfindlichkeit von nur wenigen ng/g ist mit dieser Methode auch in komplexer Matrix wie Reaktionsaromen zu realisieren (Abb. 31).

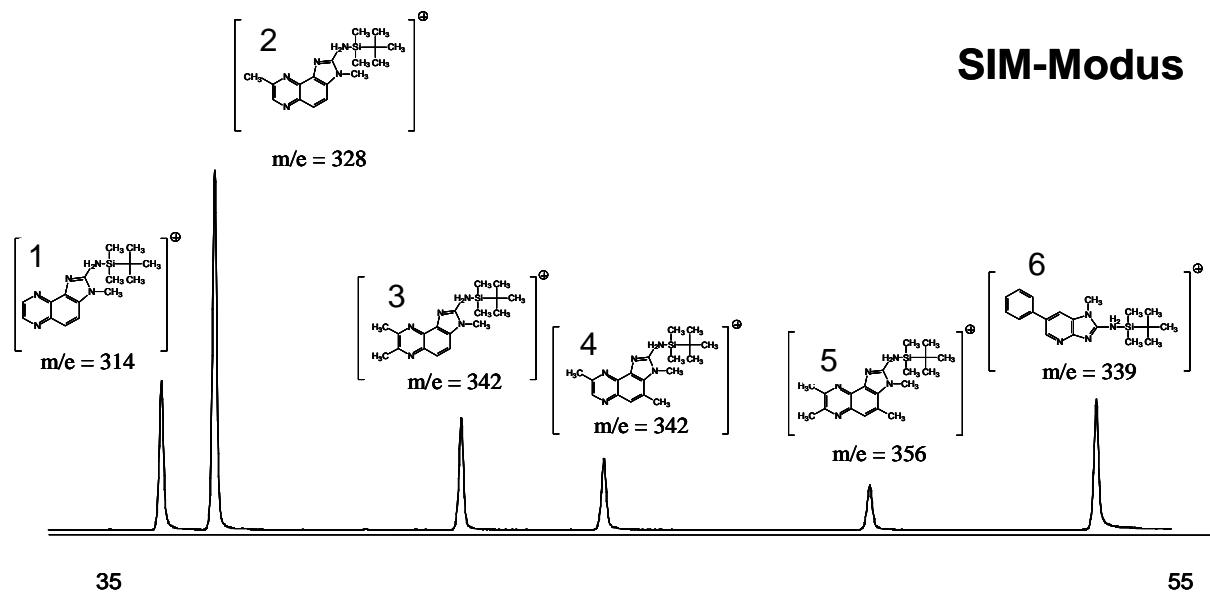


Abb. 31 GC-MS-Chromatogramm von IQx (1), MeIQx (2), 7,8-DiMeIQx (3), 4,8-DiMeIQx (4), 4,7,8-TriMeIQx (5), PhIP (6) nach Derivatisierung mit TBDMSCI.

Kapillar-Säule J&W DB-1, 60,0 m x 0,25 mm, 0,25 μm ; Positive Chemische Ionisation: CI-Gas: Ammoniak 3,8 W, 0,9 ml/min Direkteinlass, SIM-Modus (jeweils $[\text{M} + \text{H}]^+$); Inlet: Pulsed Splitless, 300 $^{\circ}\text{C}$; Initial Temp: 180 $^{\circ}\text{C}$; min: 5, 235 $^{\circ}\text{C}$; min: 6, 270 $^{\circ}\text{C}$; min: 16, 300 $^{\circ}\text{C}$; min: 41, 320 $^{\circ}\text{C}$; min: 66, 340 $^{\circ}\text{C}$

2.7 Hochdruckflüssigkeitschromatographie - Massenspektrometrie (LC-MS)

In den letzten Jahren hält die LC-MS zunehmend Einzug in die Analytik der HAAs [91, 95 - 106]. Die massenspektrometrische Detektion hat eine hohe Selektivität und Empfindlichkeit. Hierbei werden die Molekülmassen der ionisierten HAAs detektiert. Durch Fragmentierung des „Mutterions“ entstehen in der Regel eine Vielzahl an Tochterionen, die wie ein „Fingerabdruck“ zur Absicherung der Ergebnisse herangezogen werden können (Anlage Massenspektren). Als bevorzugte Ionisierungstechniken haben sich die Thermospray-Elektrospray (ESI)- und die „Atmospheric Pressure Chemical ionization“ (APCI-Interface-Ionisation) etabliert.

Bei der Thermospray-Ionisation werden Molekülonen $[\text{M} + \text{H}]^+$ gebildet. Ein Vorteil ist, dass man mittels isopenmarkierter Standards die Genauigkeit der Ergebnisse im Vergleich zu klassischen Detektionsmethoden wie der HPLC-DAD deutlich steigern kann. Da es sich bei den HAAs um stabile Verbindungen handelt, wird eine Bildung von Fragmenten kaum beobachtet.

Die Elektronenspray-Ionisierung (ESI) gehört zu den sanften Ionisierungsmethoden, bei denen die HAAs als protonierte Ionen in die Gasphase gelangen. In unseren Untersuchungen haben wir in Zusammenarbeit mit T. Bernsmann vom „Chemischen Landes-

und Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt“ (CVUA) in Münster und mit O. Frandrup-Kuhr von der Universität Münster eine LC-MS Methode zur Absicherung unserer Ergebnisse entwickelt, die diese Art der Ionisierung nutzt. Zwar konnte auch von uns beobachtet werden, dass die HAAs kaum Fragmente bilden, dennoch lagen neben dem Mutterion (Molekülion) weitere Tochterionen vor (Anlage Massenspektren), die zur Absicherung der Ergebnisse herangezogen werden konnten.

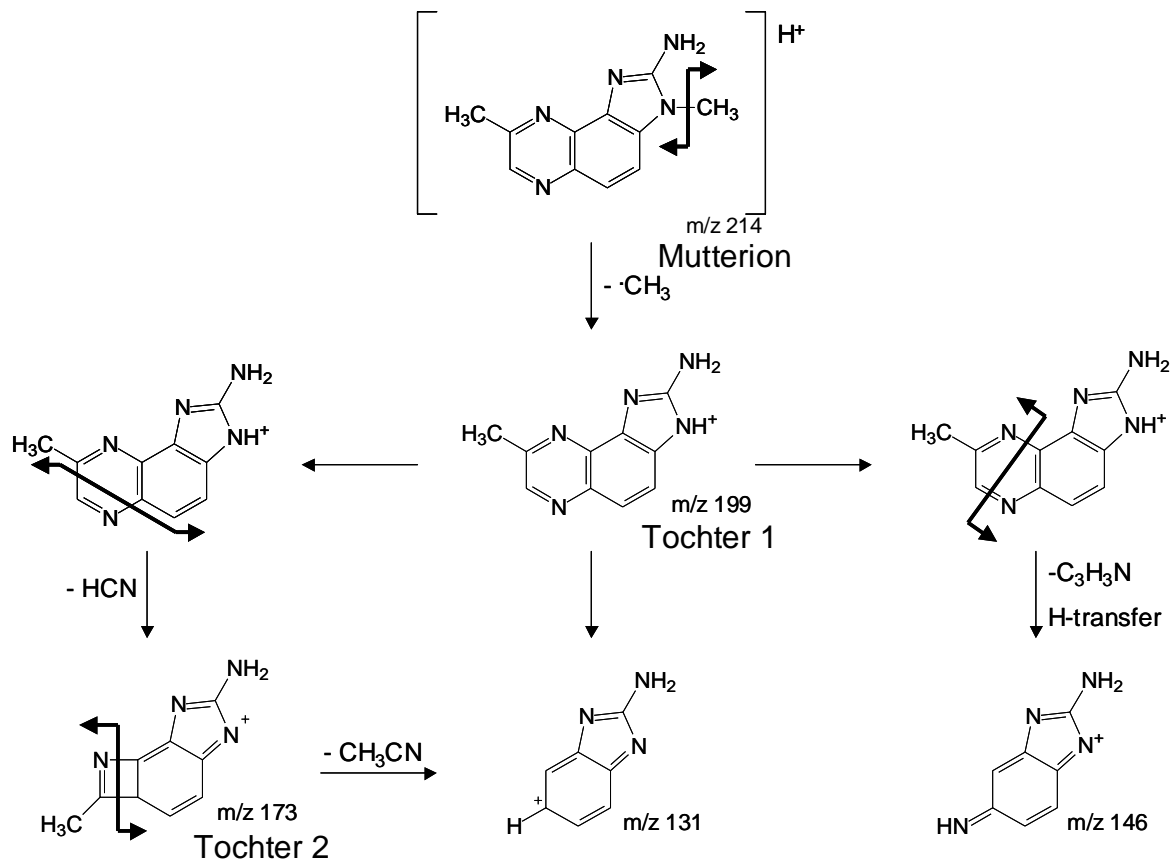


Abb. 32 Fragmentierung der AIAs am Beispiel von MeIQx [124]

In den Abbildungen 32 und 33 wird die Fragmentierung der AIAs am Beispiel von MeIQx dargestellt. Der erste Schritt der Fragmentierung erfolgt hierbei durch das Abspalten einer CH_3 -Gruppe. In einem weiteren Fragmentierungsschritt wird HCN abgespalten, so dass von uns neben dem Mutterion zwei weitere Tochterionen zur Identifizierung verwendet werden konnten (Abb. 32).

In Abbildung 34 werden die Hauptspuren der AIAs IQx, IQ, MeIQx, MeIQ, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx (beide über den Massenzahlen 213 und 160 detektierbar) und 4,7,8-TriMeIQx dargestellt.

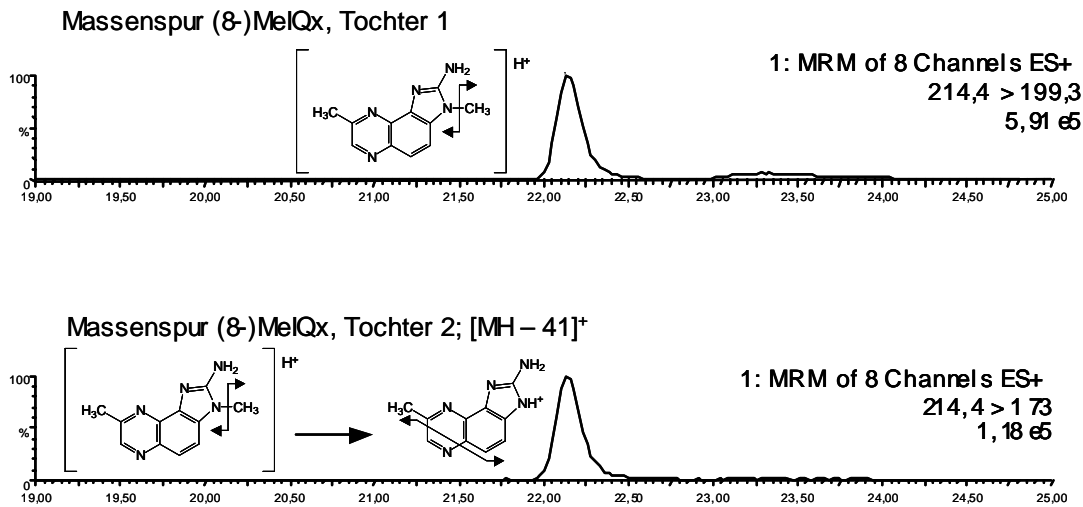


Abb. 33 Massenspektren der Tochterionen 1 und 2 von MeIQx

HPLC-Chromatogramm: MeIQx Supersphere RP-select b (4 μ m) 250 x 3 mm; Lsg. A: 0,01 m Ammoniumformiat (pH 3,2) Lsg. B: Acetonitril / 0,01 m Ammoniumformiat (pH 3,2) 50 + 50 (v/v); Gradient, Teile A + Teile B: Start: 90 + 10; 30 min: 45 + 55; 40 min: 0 + 100; 55 min: 0 + 100; 60 min: 90 + 10; 80 min: 90 + 10; Flussrate: 0,15 ml/min; ESI

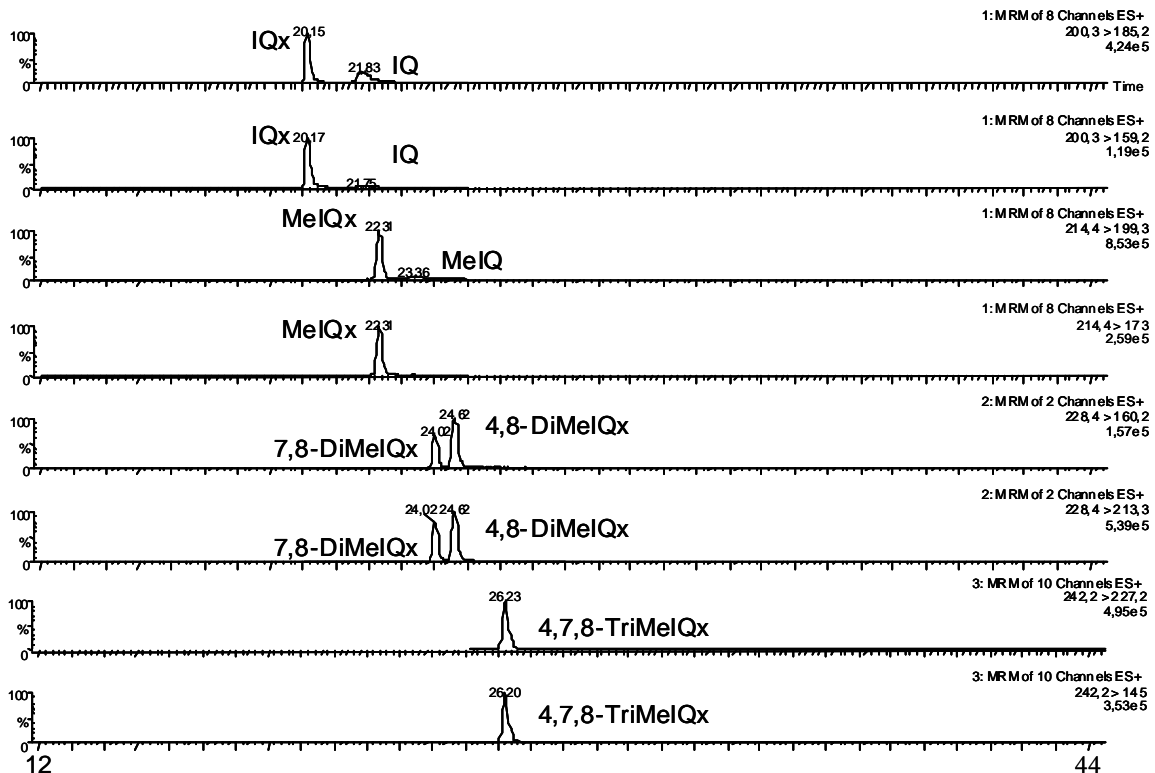


Abb. 34 Hauptspuren der AIAs IQx, IQ, MeIQx, MeIQ, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx und 4,7,8-TriMeIQx

HPLC-Chromatogramm: MeIQx Supersphere RP-select b (4 μ m) 250 x 3 mm; Lsg. A: 0,01 m Ammoniumformiat (pH 3,2) Lsg. B: Acetonitril / 0,01 m Ammoniumformiat (pH 3,2) 50 + 50 (v/v); Gradient, Teile A + Teile B: Start: 90 + 10; 30 min: 45 + 55; 40 min: 0 + 100; 55 min: 0 + 100; 60 min: 90 + 10; 80 min: 90 + 10; Flussrate: 0,15 ml/min; ESI

Anders als im Scan-Modus werden durch den (SIM)-Modus (Selected Ion Monitoring, s. Abb. 32) nur die Massen der jeweils interessierenden Verbindungen detektiert. Dieses führt weitestgehend zu einem „Ausblenden“ störender Matrixbestandteile und somit zu einer hohen Selektivität und Empfindlichkeit.

In unseren Untersuchungen verwendeten wir die multidimensionale Massenspektrometrie in Form der Hochdruckflüssigkeitschromatographie/Elektrospray-Tandem-MS-Kopplung (HPLC/ESI-MS-MS). So lag in unseren Untersuchungen der HAAs in Reaktionsaromen die Nachweisgrenze bei der LC-MS zwischen 0,02 und 0,1 ng pro g, während sie bei der HPLC-DAD zwischen 0,5 und 50 ng pro g lag.

Insbesondere für die Spurenanalytik in komplexer Matrix, in unserem Fall die Analytik der HAAs in Reaktionsaromen, ist die LC-MS die Methode der Wahl, zumal die Ergebnisse aus der HPLC-DAD (Kap. 2.3) und LC-MS nahezu deckungsgleich sind, während die Ergebnisse aus der HPLC-DAD und GC-MS (Kap. 2.4) z.T. voneinander abweichen können.

3 Untersuchungen zur Bildung von HAAs in Modellsystemen

3.1 Einleitung

3.1.1 Allgemeines

Lebensmittel unterliegen zum Teil deutlichen biologischen Schwankungen, auch sind die Rezepturen zusammengesetzter Lebensmittel und die genauen Bedingungen bei ihrer Verarbeitung und Lagerung im Einzelnen meist unbekannt. Durch die Komplexität der Lebensmittel lassen sich klare Zusammenhänge, ob deren Zusammensetzung oder die gewählten Bedingungen während der Lebensmittelzubereitung und Verarbeitung die Hauptrolle bei der Bildung von HAAs spielen, nur schwer abschätzen. Inwieweit sich die Vielzahl der bekannten und unbekannt Parameter sogar wechselseitig chemisch und physikalisch beeinflussen, ist schwer vorhersehbar. In erhitzten Lebensmitteln werden HAAs in Konzentrationen im Bereich von pg/g bis ng/g gebildet, während eine unüberschaubare Anzahl von Störsubstanzen in Folge der Maillard-Reaktion in deutlich höheren Konzentrationen entstehen, was die Analytik erheblich erschwert.

Bei Modellsystemen sind die Zusammensetzung und die Bedingungen, denen sie ausgesetzt wurden, hinreichend bekannt und überschaubar, so dass reproduzierbare Ergebnisse erreicht werden können und durch eine gezielte Veränderung der Zusammensetzung und der Reaktionsbedingungen die daraus resultierenden Ergebnisse miteinander vergleichbar sind. Da schon Untersuchungen mit Modellsystemen durchgeführt wurden (Kap 3.1.1 Tabelle 8), unter anderem auch, um die Bildungswege von HAAs aufzuklären [33, 34, 35] (Kap. 1.2.2), hat man auch die Möglichkeit, diese miteinander zu vergleichen und den Nachweis zu erbringen, ob eine bestimmte Verbindung unter definierten Bedingungen in der Lage ist, die Bildung von HAAs im Besonderen zu fördern oder zu unterdrücken.

In den Modellsystemen sind die gebildeten Mengen an HAAs in der Regel bei geeigneten Reaktionsbedingungen deutlich größer als die in erhitzten Lebensmitteln gebildeten Mengen, was die Analytik erleichtert.

Der Vorteil der Modellsysteme ist auch gleichzeitig deren Nachteil. Ein Modellsystem kann nur einen Teilaspekt darstellen und nicht die komplexen Verhältnisse in einem Lebensmittel. Aus diesem Grund ist es notwendig, Ergebnisse, die aus den Modellsystemen gewonnen wurden, gezielt auf Lebensmittel, in unserem Fall auf Reaktionsaromen, zu übertragen.

Da die Mengen der gebildeten HAAs in Modellsystemen deutlich größer sind als die in Lebensmitteln, sind weniger die absoluten Mengen von Interesse, sondern der Vergleich der verwendeten Reaktanden und der gewählten Bedingungen miteinander.

Tabelle 8 HAA-Bildung in Modellsystemen auf der Basis von Aminosäuren und Kreatin(in) mit und ohne Zusatz von Zucker [47]

HAA	Aminosäure	Zucker	nmol HAA pro mmol Kreatinin	Bedingungen	Autor	Jahr
IQ	Gly	Fru	1	Rückfluss	Grivas et al.	1986
	Ser		3,7	Trocken	Knize et al.	1988
	Phe		3	Trocken	Felton & Knize	1990
	Phe	Glc	13,5	Trocken	Felton & Knize	1990
	Pro		0,4	Trocken	Yoshida et al.	1984
MeIQ	Ala	Fru	nicht bestimmt	Rückfluss	Grivas et al.	1985
IQx	Gly	Glc	3,1 ± 0,8	Wasser	Johansson et al.	1995
	Ala	Glc	5,0	Wasser	Johansson et al.	1995
	Val	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995
	Leu	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995
	Ile	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995
	Ser		2,7	Trocken	Knize et al.	1988
	Ser	Glc	6,5	Wasser	Johansson et al.	1995
	Thr	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Skog & Jägerstad	1993
	Thr	Glc	4,5	Wasser	Johansson et al.	1995
	Asp	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995
	Asn	Glc	2,9	Wasser	Johansson et al.	1995
	Gln	Glc	1,4	Wasser	Johansson et al.	1995
	Lys	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995
	Arg	Glc	3,7 ± 0,3	Wasser	Johansson et al.	1995
	His	Glc	1,8	Wasser	Johansson et al.	1995
	Phe	Glc	1,5 ± 0,3	Wasser	Johansson et al.	1995
	Tyr	Glc	2,6 ± 2,3	Wasser	Johansson et al.	1995
	Trp	Glc	0,7	Wasser	Johansson et al.	1995
	Cystin	Glc	0,1	Wasser	Johansson et al.	1995
Met	Glc	0,9	Wasser	Johansson et al.	1995	
MeIQx	Gly	Glc	4,4	Rückfluss	Jägerstad et al.	1984
	Gly	Fru	6,0 - 7,0	Rückfluss	Grivas et al.	1986
	Gly	Glc	4	DEG	Skog & Jägerstad	1990
	Gly	Glc	max 7,8	Avicel	Schuirman & Eichner	1992
	Gly	Fru	max 7,8	Avicel	Schuirman & Eichner	1992
	Gly	Glc	7,0 - 10,0	Wasser	Skog & Jägerstad	1993
	Gly	Glc	3,6 ± 1,2	Wasser	Johansson et al.	1995
	Gly	Glc	max 1,5	Avicel	Goldbeck & Eichner	2003
	Gly	Fru	max 1,5	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004
	Gly	Rib	0,3 - 0,5	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004

HAA	Aminosäure	Zucker	nmol HAA pro mmol Kreatinin	Bedingungen	Autor	Jahr
MeIQx	Gly	Ara	0,3 - 0,5	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004
	Gly	Xyl	0,3 - 0,5	Avicel	Goldbeck & Eichner	2003
	Gly	2-Desoxy-Glc	0,1 - 0,5	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004
	Gly	2-Desoxy-Rib	0,1 - 0,4	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004
	Gly		0,1 - 0,3	Avicel	Goldbeck & Eichner	2003
	Ala	Glc	0,9	Rückfluss	Muramatsu & Matsushima	1985
	Ala	Rib	1,8	Rückfluss	Muramatsu & Matsushima	1985
	Ala		nicht bestimmt	Rückfluss	Överik et al.	1989
	Ala	Glc	5,4 ± 5,1	Wasser	Johansson et al.	1995
	Ala	Glu	0,4	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004
	Ala	Xyl	0,3	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004
	Val	Glc	4,7 ± 3,5	Wasser	Johansson et al.	1995
	Leu	Glc	2,4	Wasser	Johansson et al.	1995
	Ile	Glc	2,7 ± 0,7	Wasser	Johansson et al.	1995
	Ser		nicht bestimmt	Trocken	Överik et al.	1989
	Ser	Glc	3,0 ± 1,7	Wasser	Johansson et al.	1995
	Thr	Glc	nicht bestimmt	Rückfluss	Negishi et al.	1985
	Thr	Glc	9	Wasser	Skog & Jägerstad	1993
	Thr	Glc	9,2 ± 2,1	Wasser	Johansson et al.	1995
	Asp	Glc	0,8 ± 0,6	Wasser	Johansson et al.	1995
	Asn	Glc	1,5	Wasser	Johansson et al.	1995
	Gln	Glc	0,6	Wasser	Johansson et al.	1995
	Lys	Rib	4,2	Rückfluss	Muramatsu & Matsushima	1985
	Lys	Glc	7,7 ± 3,7	Wasser	Johansson et al.	1995
	Arg	Glc	4,1 ± 0,7	Wasser	Johansson et al.	1995
	His	Glc	3,4 ± 3,2	Wasser	Johansson et al.	1995
	Phe	Glc	nicht bestimmt	DEG	Skog & Jägerstad	1991
	Phe	Glc	1,9 ± 0,7	Wasser	Johansson et al.	1995
	Tyr		nicht bestimmt	Trocken	Överik et al.	1989
	Tyr	Glc	3,6 ± 2,1	Wasser	Johansson et al.	1995
	Trp	Glc	5,0 ± 3,5	Wasser	Johansson et al.	1995
	Cys	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995
Cystein	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
Met	Glc	2,7 ± 0,5	Wasser	Johansson et al.	1995	
4,8-DiMeIQx	Gly	Glc	nicht bestimmt	DEG	Skog & Jägerstad	1990
	Gly	Glc	0 - 0,5	Avicel	Goldbeck & Eichner	2003
	Gly	Fru	0 - 0,5	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004
	Gly	Rib	0,2 - 0,4	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004
	Gly	Ara	0,2 - 0,4	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004
	Gly	Xyl	0,2 - 0,4	Avicel	Goldbeck & Eichner	2003
	Gly	2-Desoxy-Rib	0 - 0,1	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004
	Ala	Fru	1,9 - 2,6	Rückfluss	Grivas et al.	1985
	Ala	Glc	4,2	Rückfluss	Muramatsu & Matsushima	1985
	Ala	Rib	1,5	Rückfluss	Muramatsu & Matsushima	1985
	Ala	Glu	1,1	Rückfluss	Johansson et al.	1995

HAA	Aminosäure	Zucker	nmol HAA pro mmol Kreatinin	Bedingungen	Autor	Jahr	
4,8-DiMeIQx	Ala	Glu	0,1 - 0,2	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004	
	Ala	Xyl	0,2 - 0,4	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004	
	Thr	Glc	nicht bestimmt	Rückfluss	Negishi et al.	1985	
	Thr	Glc	30	Wasser	Skog & Jägerstad	1993	
	Thr	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Lys	Rib	26,1	Rückfluss	Muramatsu & Matsushima	1985	
	Lys	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Phe	Glc	nicht bestimmt	DEG	Skog & Jägerstad	1991	
	Phe	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Met	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
7,8-DiMeIQx	Gly	Glc	1,1	Rückfluss	Negishi et al.	1984	
	Gly	Glc	nicht bestimmt	DEG	Skog & Jägerstad	1990	
	Gly	Glc	nicht bestimmt	Avicel	Schuirman & Eichner	1992	
	Gly	Fru	nicht bestimmt	Avicel	Schuirman & Eichner	1992	
	Gly	Glc	0,3	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Gly	Glc	nicht bestimmt	Rückfluss	Lee et al.	1992	
	Gly	Glc	0,1 - 1,5	Avicel	Goldbeck & Eichner	2003	
	Gly	Fru	0,1 - 0,8	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004	
	Gly	Rib	0,1 - 0,4	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004	
	Gly	Ara	0,1 - 0,4	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004	
	Gly	Xyl	0,1 - 0,7	Avicel	Goldbeck & Eichner	2003	
	Gly	2-Desoxy-Glc	0,1 - 0,4	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004	
	Gly	2-Desoxy-Rib	0,1 - 0,4	Avicel	Goldbeck & Eichner	2004	
	Gly		0,05 - 0,2	Avicel	Goldbeck & Eichner	2003	
	Ala	Glc	0,7	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Val	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Leu	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Ile	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Ser	Glc	0,1	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Thr	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Asn	Glc	0,2	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Gln	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Lys	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Arg	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	His	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Phe	Glc	0,1	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Tyr	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Trp	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Met	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Pro	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	7,9-DiMeIQx	Thr	Glc	nicht bestimmt	200°C/5h	Nukaya et al.	1994
	4,7,8-TriMeIQx	Ala/Thr	Glc	6	DEG	Skog et al.	1992
	PhIP	Leu		nicht bestimmt	Trocken	Överik et al.	1989
Phe		Glc	3,6	Rückfluss	Shioya et al.	1987	

HAA	Aminosäure	Zucker	nmol HAA pro mmol Kreatinin	Bedingungen	Autor	Jahr	
PhIP	Phe		735	Trocken	Negishi et al.	1985	
	Phe	Glc	nicht bestimmt	Trocken	Överik et al.	1989	
	Phe	Glc	20,9	DEG	Skog & Jägerstad	1991	
	Phe	Glc	7,3 ± 4,2	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Phe		nicht bestimmt	DEG ¹	Knize et al.	1994	
	Phe	Glc	0,0061 - 0,9	60°C	Manabe et al.	1992	
	Phe	Gal	0,0012 - 0,008	60°C	Manabe et al.	1992	
	Phe	Rib	0,0101 - 0,0203	60°C	Manabe et al.	1992	
	Phe	Ara	0,0096 - 0,0235	60°C	Manabe et al.	1992	
	Phe	Ery	0,06 - 0,07	60°C	Manabe et al.	1992	
	Phe	Glyc	0,02 - 0,04	60°C	Manabe et al.	1992	
	Phe	Glc	0,002	Wasser 37°C/6 Wochen	Manabe et al.	1992	
	Phe	Rib	0,01	Wasser 37°C/6 Wochen	Manabe et al.	1992	
	Phe	D N A	0,005	Wasser 60°C/4 Wochen	Manabe et al.	1993	
	Phe	R N A	0,001	Wasser 60°C/4 Wochen	Manabe et al.	1993	
	Phe			Rückfluss	Murcovic et al.	1998	
	Phe	Glc	16	Avicel	Vollenbröcker & Eichner	2000	
	Phe		110	Avicel	Vollenbröcker & Eichner	2000	
		Ile	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995
		Tyr	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995
Trp-P-1	Trp	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Ile	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
Trp-P-1	Trp	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
Norharman	Ile	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Arg	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Phe	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Trp	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Tyr	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
Harman	Ile	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Arg	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Phe	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	
	Trp	Glc	nicht bestimmt	Wasser	Johansson et al.	1995	

Aminosäuren: Gly = Gycin, Ala = Alanin, Val = Valin, Leu = Leucin, Ile = Isoleucin, Pro = Prolin, Phe = Phenylalanin, Trp = Tryptophan, Met = Methionin, Ser = Serin, Thr = Threonin, Cys = Cystein, Tyr = Tyrosin, Asn = Asparagin, Gln = Glutamin, Asp = Asparaginsäure, Glu = Glutaminsäure, Lys = Lysin, His = Histidin, Arg = Arginin

Zucker: Glc = Glucose, Fru = Fructose, Gal = Galactose, Rib = Ribose, Ara = Arabinose, Xyl = Xylose, Ery = Erythrose, Glyc = Gyceraldehyd, 2-Desoxy-Glc = 2-Desoxy-Glucose, 2-Desoxy-Rib = 2-Desoxy-Ribose

Bedingungen: Rückfluss : Rückfluss in Diethylenglykol/Wasser (5:1), 125 - 128°C, 2 h
Wasser : Geschlossene Gefäße, Wasser bei 180°C, 10 min
DEG : Geschlossene Gefäße, Diethylenglykol/Wasser (5:1) , 180 °C, 10 min
Trocken : Trocken bei 180 °C, 10 min
Avicel : Geschlossene Gefäße, Reaktanden auf Avicel aufgetragen, Wasseraktivität aw = 0,33 – 0,88 , 100 °C - 200°C, 10 min – 10 h
DEG¹ : 80 % Diethylenglykol, 150 – 200 °C, 10 – 30 min

3.1.2 Zusammensetzung der Modellsysteme

Bei den gängigen Modellsystemen ist die Zusammensetzung der eingesetzten Reaktanden möglichst einfach gehalten. Als Grundlage werden Aminosäuren verwendet. Aus diesen können aber erst bei sehr hohen Temperaturen, unter Pyrolyse, Aminocarboline gebildet werden. Erst bei der zusätzlichen Verwendung von Kreatin bzw. Kreatinin ist es möglich, dass Aminoimidazozaarene unter lebensmitteltechnologisch relevanten Bedingungen entstehen. Reduzierende Zucker verhalten sich bei der Entstehung der HAAs ambivalent. Dass der von Jägerstad [33] vorgeschlagene, die Anwesenheit von reduzierenden Zuckern voraussetzende Bildungsmechanismus nicht als einziger Reaktionsweg in Frage kommt, sieht man daran, dass auch ohne Zuckerzusatz bereits die Bildung von HAAs beobachtet werden kann (Tabelle 8). Werden reduzierende Zucker verwendet, steigt die HAA-Bildung deutlich an und erreicht bei einem Molmengenverhältnis des reduzierenden Zuckers zur Aminosäure und zum Kreatinin von 0,5 : 1 : 1 ihr Maximum [50]. Bei höheren Zuckeranteilen ist eine Abnahme der Bildung von HAAs zu beobachten. Reduzierende Zucker beeinflussen zwar die Bildung der HAAs maßgeblich, sind aber für ihre Bildung nicht zwingend erforderlich.

Reaktionsaromen dürfen gemäß der Aromenverordnung [125] aus reduzierenden Zuckern, Aminosäuren, Proteinhydrolysaten, Fleisch-, Hefe- und Pflanzenextrakten unter Hitzeeinwirkung hergestellt werden. Die größten Mengen an Aminoimidazozaarenen werden bei der Verwendung von Fleischextrakt gebildet, da hier eine Kreatin/Kreatinin-Quelle vorliegt. Zwar lassen sich größere Mengen an Aminoimidazozaarenen dadurch vermeiden, dass man auf den Einsatz von Fleischextrakt verzichtet, doch dieses wirkt sich meist ungünstig auf den Geruch und Geschmack des Reaktionsaromas aus; so kann z.B. bei der Verwendung von Hefeextrakt ein bitterer Beigeschmack entstehen. Des Weiteren werden hierbei anstelle der AIAs in größeren Mengen Harman und Norharman gebildet.

Die in Modellsystemen eingesetzten Reaktionspartner haben wir weitgehend auf reduzierende Zucker, Aminosäuren und Kreatinin beschränkt.

Die Modellsysteme lassen sich in stark wasserhaltige und wasserarme Modelle unterscheiden. Häufig findet man in der Literatur, dass in Diethylenglykol-Wasser-Gemischen unter Rückfluss erhitzt wird; auf diese Weise kann die gewünschte Temperatur exakt eingehalten werden. Für die Herstellung wasserarmer Modellsysteme wird der Reaktionsansatz im allgemeinen gefriergetrocknet; anschließend werden die Modelle in geschlossenen Gefäßen erhitzt und ggf. vorher an bestimmte Gleichgewichtsfeuchtigkeiten (Wasseraktivitäten) angeglichen. Je nachdem, ob es sich bei Reaktionsaromen um wässrige

oder um wasserarme Ansätze handelt, entstehen unterschiedliche Aromennoten, die bei wasserreichen Ansätzen bouillonartig sind und bei wasserarmen Ansätzen dem Charakter von Bratenaroma entsprechen.

Bei vielen Arbeiten wurde in einer Diethylenglykol-Wasser-Mischung unter Rückfluss erhitzt. Wir haben uns dafür entschieden, neben wässrigen Systemen insbesondere wasserarme Systeme zu betrachten, da Reaktionsaromen von der Industrie meist unter wasserarmen Bedingungen hergestellt werden. Als Trägermatrix für die wasserarmen Systeme haben wir mikrokristalline Cellulose (Avicel) verwendet. Mikrokristalline Cellulose wurde bereits von Schuirmann [43] eingesetzt, um den Einfluss des aw-Wertes, der Reaktionstemperatur und der Reaktionszeit auf die Bildung von HAAs in wasserarmen Modellsystemen zu untersuchen. Mikrokristalline Cellulose ist nicht quellfähig, chemisch inert und wurde bereits in zahlreichen Untersuchungen über die Bildung von Maillardprodukten in wasserarmen Modellsystemen verwendet [43, 46, 89]. Für die Herstellung dieser Modellsysteme werden die Reaktanden zunächst in Wasser gelöst und mit Avicel unter kräftigem Rühren zu einem Brei vermischt; die Mischung wird nach dem Gefriertrocknen fein gemahlen und die gewünschten Gleichgewichtsfeuchtigkeiten eingestellt. Die so hergestellten Modellmischungen werden in verschließbaren, desaktivierten Zentrifugengläsern verschlossen, gegebenenfalls mit Zusätzen versehen, im Trockenschrank erhitzt und entsprechend aufgearbeitet.

3.1.3 Einstellung der Gleichgewichtsfeuchtigkeiten

Definierte Gleichgewichtsfeuchtigkeiten der Modellsysteme lassen sich gemäß Rockland [126] dadurch einstellen, dass man trockene Proben in Vakuumexsikkatoren über gesättigten Salzlösungen lagert (Tabelle 9).

Tabelle 9 Relative Luftfeuchtigkeit verschiedener gesättigter Salzlösungen bei 20°C

Gesättigte Salzlösung	Relative Luftfeuchtigkeit bei 20 °C [%]	aw-Wert bei 20 °C	Wassergehalt [%] der Modellsysteme
Lithiumchlorid	12	0,12	0,4
Kaliumacetat	23	0,23	1,1
Magnesiumchlorid	33	0,33	2,1
Kaliumcarbonat	44	0,44	2,9
Magnesiumnitrat	52	0,52	4,0
Natriumchlorid	75	0,75	8,5
Kaliumchromat	88	0,88	18,4

Die Salzlösungen stehen mit bestimmten relativen Luftfeuchtigkeiten im Gleichgewicht, so dass sich die Proben entlang ihrer Sorptionsisothermen auf die entsprechenden Gleichgewichtfeuchtigkeiten bzw. Wasseraktivitäten (a_w) einstellen lassen, wobei bestimmte, den jeweiligen Sorptionsisothermen zu entnehmende Wassergehalte erreicht werden. Die Wassergehalte werden kontinuierlich durch Differenzwägung ermittelt. Anschließend werden die sich ergebenden Wassergehalte durch Vakuumtrocknung und Karl-Fischer-Titration abgesichert. Die a_w -Werte werden zudem durch ein a_w -Meter bestimmt.

3.2 Einfluss der Reaktionspartner auf die HAA-Bildung

3.2.1 Einfluss der Molmengenverhältnisse der Reaktionspartner

Das in Kapitel 1.3.4 beschriebene ambivalente Verhalten der reduzierenden Zucker bei der Bildung von HAAs geht auf Beobachtungen von Jägerstad und Skog [50] zurück. Dabei liegt das Maximum der MeIQ_x-Bildung bei einem Molmengenverhältnis der reduzierenden Zucker zu Aminosäure und Kreatinin von 0,5 : 1 : 1. Dies konnte auch von Vollenbröker bei der Verwendung von Xylose als reduzierendem Zucker beobachtet werden.

Vollenbröker [46] beobachtete weiterhin eine völlige Unterdrückung der MeIQ_x-Bildung bei einem Zusatz von 200 mg Xylose pro Gramm Fleischextrakt, was einem Molmengenverhältnis von drei Mol Xylose zu einem Mol Kreatinin entspricht. Bei der Verwendung von Glucose konnte demgegenüber Skog [50] erst ab einem Zusatz von 1000 mg pro Gramm Fleischextrakt eine völlige Unterdrückung der MeIQ_x-Bildung beobachten, was einem Molmengenverhältnis von 12 Mol Glucose zu einem Mol Kreatinin entspricht.

Diese Beobachtungen bilden den Ausgangspunkt unserer vergleichenden Untersuchungen des Reaktionsverhaltens dieser beiden Zucker. Dabei ist zu bemerken, dass der Gesetzgeber für die Verwendung von Xylose bei der Herstellung von Reaktionsaromen keine Zulassungsbeschränkung erlassen hat. Andererseits ist die Verwendung von Xylose bei der Herstellung von Reaktionsaromen in der Literatur noch nicht beschrieben worden.

Deshalb war es für uns von Interesse, auch den Einfluss von Xylose bei der Herstellung von Reaktionsaromen näher zu untersuchen, insbesondere unter dem Gesichtspunkt, dass im Vergleich zur Glucose bereits relativ geringe Mengen an Xylose auszureichen scheinen, um die HAA-Bildung zu unterdrücken. Von Interesse war dabei auch die Aufklärung der hierbei zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen.

Zunächst ist festzuhalten, dass die von Vollenbröker untersuchten Reaktionsaromen im wässrigen Medium hergestellt und untersucht wurden. Dabei wurde ein von Vollenbröker

selbst hergestelltes, Fleischextrakt enthaltendes Reaktionsaroma mit verschiedenen Xylosemengen versetzt, auf einen Wassergehalt von 65 % eingestellt und 6 Stunden bei 120 °C erhitzt. Demgegenüber haben wir es uns zum Ziel gesetzt, das Reaktionsverhalten von Xylose unter wasserarmen Bedingungen zu untersuchen.

Die allgemeine Herstellungsweise der von uns verwendeten, auf der Trägermatrix Avicel aufbauenden, Reaktionsaromen simulierenden wasserarmen Modellsysteme wurde bereits im Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Die genaue Zusammensetzung der Modellsysteme ist im Abschnitt 7 (Arbeitsvorschriften) wiedergegeben.

Da bei der Herstellung von Reaktionsaromen häufig Glucose verwendet wird und diese somit eine zentrale Rolle einnimmt, untersuchten wir neben wasserarmen Xylose-Modellsystemen auch entsprechende wasserarme Glucose-Modellsysteme, um so eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Zudem wurden schon zahlreiche Untersuchungen mit Glucose in trockenen Systemen beschrieben (Kap. 3.1.1, Tabelle 8).

Die Mengen an reduzierenden Zuckern wurden zunächst in den von Vollenbröker in seinen Versuchen mit Reaktionsaromen verwendeten molaren Verhältnissen der Zucker zu Kreatinin eingesetzt, da wir hier von einem ähnlichen Verhalten wie in den wässrigen Systemen ausgingen. Da in den Reaktionsaromen beispielhaft der Verlauf der MeIQx-Bildung untersucht werden sollte, haben wir als Aminosäure Glycin eingesetzt, die nach der „Las-Vegas-Hypothese“ (Kap. 1.2.2, Abb. 8a) über die Strecker-Reaktion Methanal bildet, welches mit dem im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildeten 2-Methylpyrazin und Kreatinin zu MeIQx reagiert.

Wie aus den Abbildungen 35 und 36 hervorgeht, wurde bei den Glucosemodellen die Bildung von MeIQx und 7.8-DiMeIQx beobachtet. Die Bildung beider HAAs kann durch den von Jägerstad (Kap. 1.2.2, Abb. 8a) postulierten Reaktionsweg erklärt werden.

Wie die Abbildungen 35 und 36 zeigen, liegt das Maximum der Bildung dieser beiden HAAs – selbst bei unterschiedlichen Erhitzungsbedingungen und Wassergehalten – im Bereich eines Molmengenverhältnisses von Glucose zu Glycin zu Kreatinin von 0,5 : 1 : 1, was in Übereinstimmung mit den Literaturangaben steht.

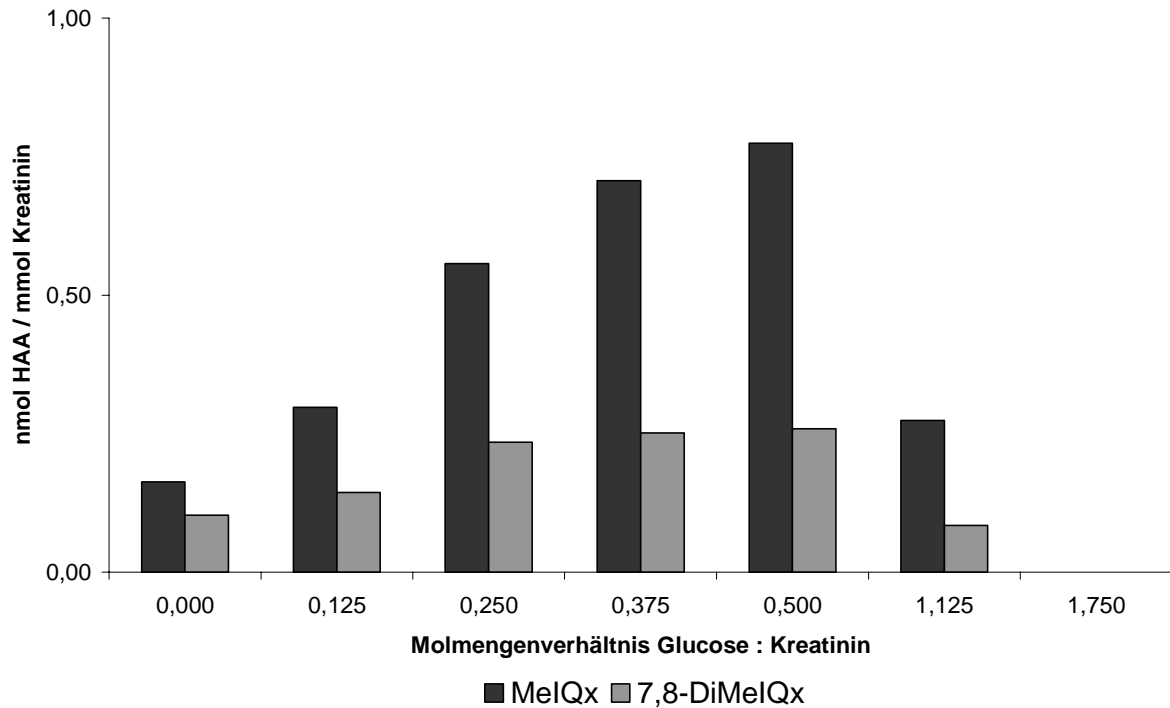


Abb. 35 Einfluss der molaren Verhältnisse Glucose : Kreatinin auf die HAA-Bildung in einem wasserarmen Modellsystem; Glycin : Kreatinin (1 : 1); 120 °C; 6 h im Trockenschrank; aw=0,52; verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml; verschlossen

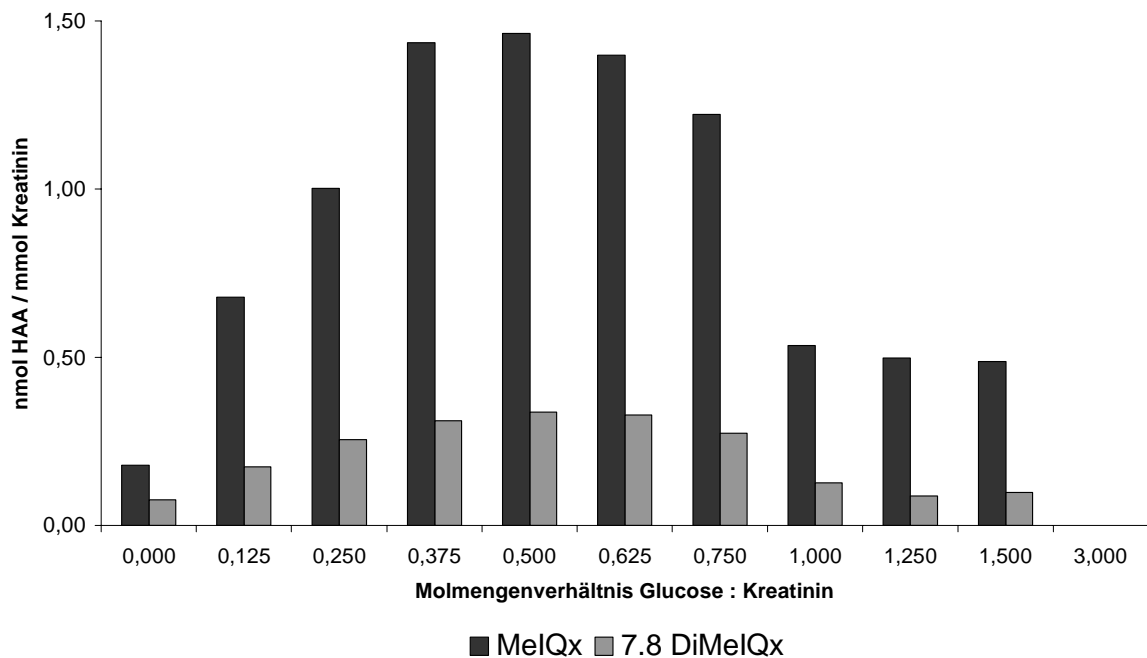


Abb. 36 Einfluss der molaren Verhältnisse Glucose : Kreatinin auf die HAA-Bildung in einem wasserarmen Modellsystem; Glycin : Kreatinin (1 : 1); 125 °C; 6 h im Trockenschrank; aw=0,75 ; verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml; verschlossen

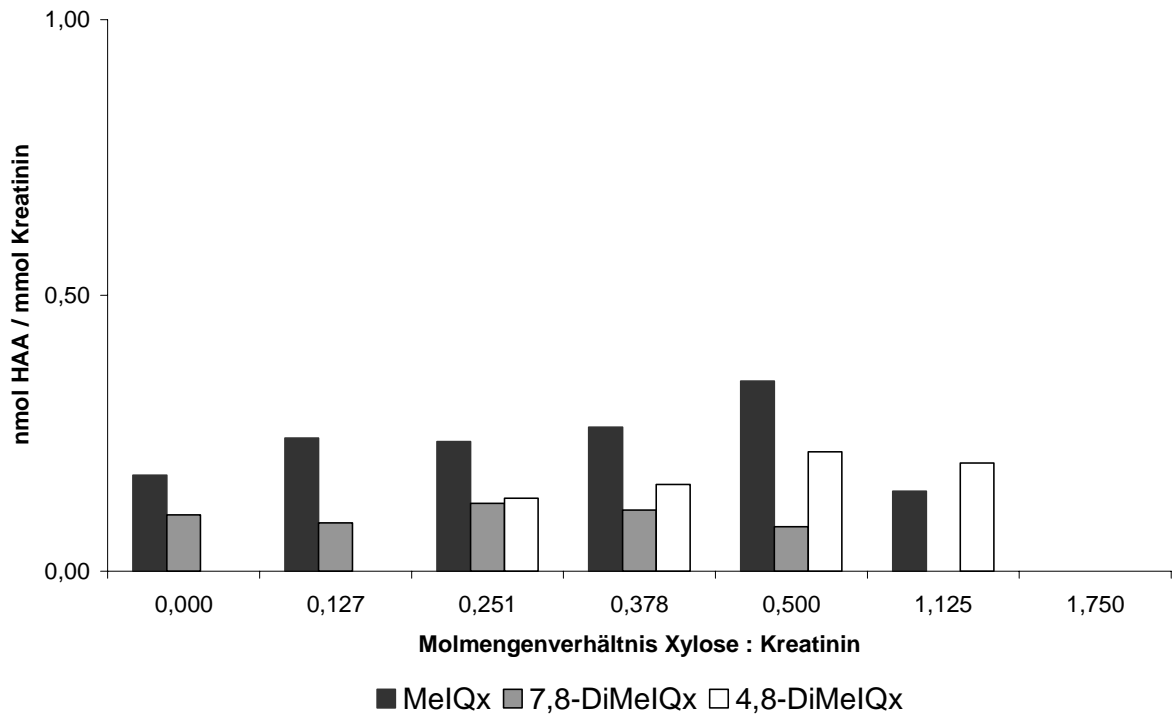


Abb. 37 Einfluss der molaren Verhältnisse Xylose : Kreatinin auf die HAA-Bildung in einem wasserarmen Modellsystem; Glycin : Kreatinin (1 : 1); 120 °C; 6 h im Trockenschrank ; aw=0,52; verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml; verschlossen

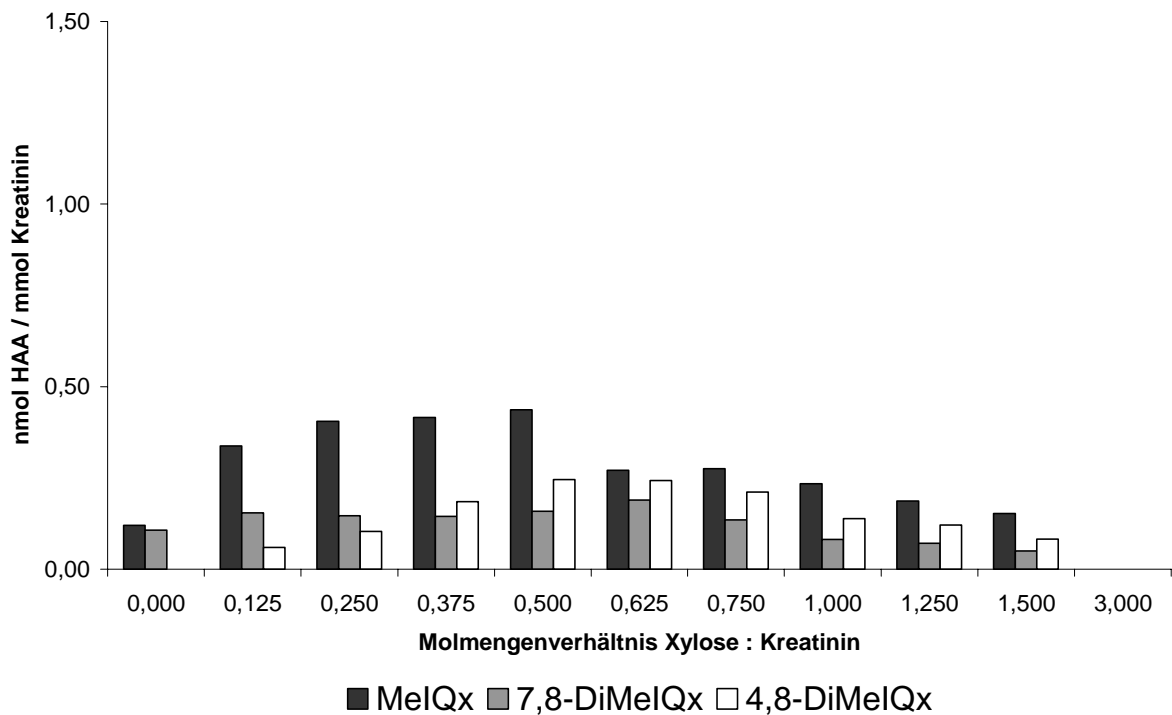


Abb. 38 Einfluss der molaren Verhältnisse Xylose : Kreatinin auf die HAA-Bildung in einem wasserarmen Modellsystem; Glycin : Kreatinin (1 : 1); 125 °C; 6 h im Trockenschrank; aw=0,75; verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml; verschlossen

Aus den Abbildungen 37 und 38 geht hervor, dass bei den Xylosemodellen die gebildeten Mengen an MeIQx deutlich niedriger liegen als bei den Glucosemodellen. Auffällig ist hier, dass beim Einsatz von Xylose das im gleichen Bereich wie bei der Verwendung von Glucose liegende Maximum der Bildung von HAAs im Vergleich zur Glucose wesentlich schwächer ausgeprägt ist und flacher verläuft.

Wie aus den Abbildungen 35 und 37 hervorgeht, können bei einem aw-Wert von 0,52 und einer Temperatur 120 °C sowohl beim Einsatz von Glucose als auch von Xylose bei einem Molmengenverhältnis von reduzierendem Zucker zu Kreatinin von 1,75 keine HAAs mehr nachgewiesen werden. Bei einem aw-Wert von 0,75 und einer Temperatur von 125 °C war hingegen die gebildete Menge an HAAs deutlich größer als unter den oben genannten Bedingungen und erst bei einem Molmengenverhältnis von reduzierendem Zucker zu Kreatinin von 3 : 1 waren keine HAAs mehr nachweisbar, wie die Abbildungen 36 und 38 zeigen.

Bemerkenswert ist, dass bei der Verwendung von Xylose neben der Bildung von MeIQx und 7,8-DiMeIQx (wie beim Einsatz von Glucose) auch die Bildung von 4,8-DiMeIQx beobachtet werden konnte.

Gemäß der „Las-Vegas-Hypothese“ wird MeIQx aus den Zwischenstufen 2,5-Dimethylpyrazin, Kreatinin und aus dem Strecker-Abbau von Glycin hervorgehendem Formaldehyd (Abb. 39a), 7,8-DiMeIQx aus den Zwischenstufen 2,3,5-Trimethylpyrazin, Kreatinin und Formaldehyd (Abb. 39b) gebildet. Das beim Einsatz von Xylose hier wider Erwarten gebildete 4,8-DiMeIQx entsteht dagegen – entsprechend der „Las-Vegas-Hypothese“ – aus 2,5-Dimethylpyrazin, Kreatinin und Acetaldehyd (Abb. 39c), der durch den Strecker-Abbau von Alanin gebildet würde.

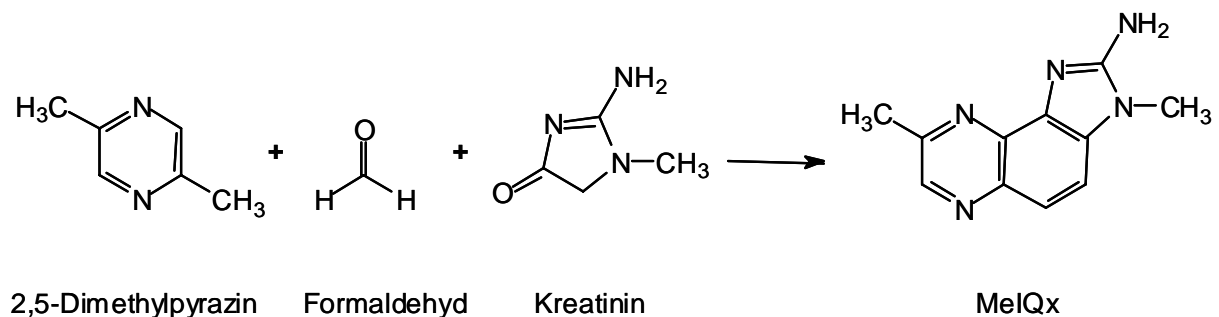


Abb. 39a MeIQx-Bildung

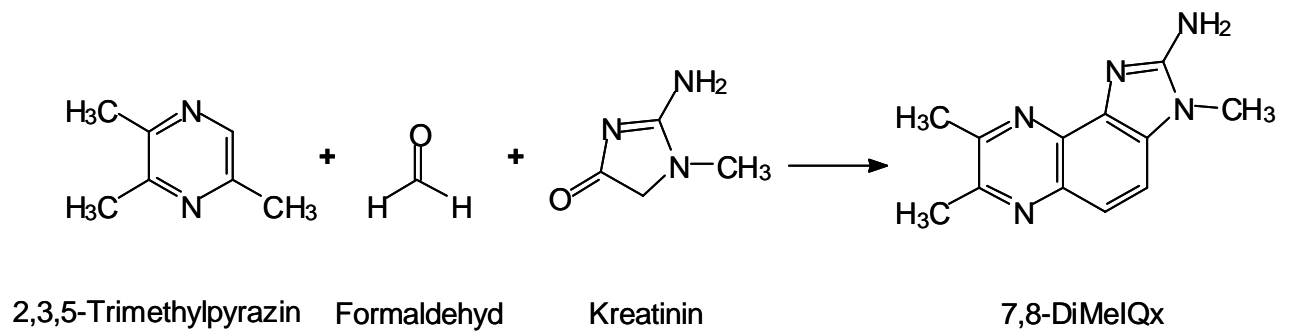


Abb. 39b 7,8-DiMeIQx-Bildung

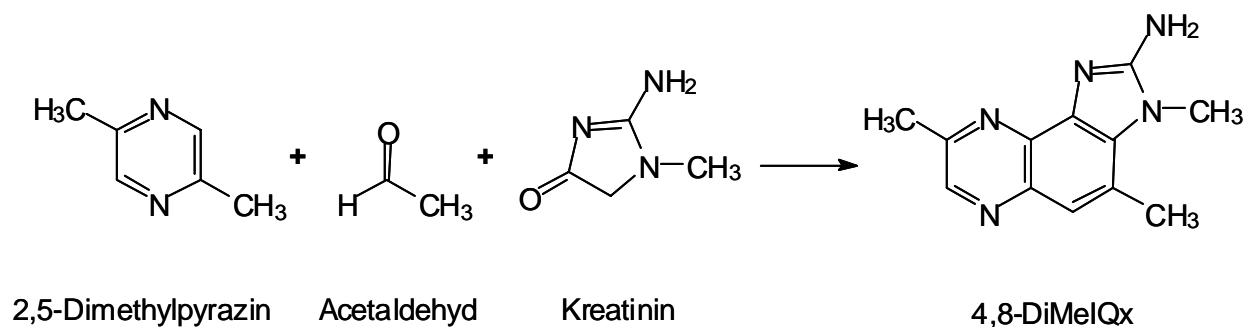


Abb. 39c 4,8-DiMeIQx-Bildung

Eine Erklärung für die Entstehung von 4,8-DiMeIQx in Gegenwart von Xylose und Glycin kann an dieser Stelle nicht gegeben werden. Es soll aber darauf hingewiesen werden, dass sowohl durch unsere Untersuchungen (Kap. 3.2.1 Abb. 35 – 38) als auch durch die Untersuchungen von Yoshida [36], Överik [37] und Taylor [38] festgestellt wurde, dass auch unter Ausschluss eines reduzierenden Zuckers, also nur in Anwesenheit einer Aminosäure und von Kreatinin, über einen noch nicht aufgeklärten Bildungsweg bereits HAAs gebildet werden können.

Wir untersuchten anschließend, wie sich ein wasserarmes Glucose-Modellsystem verhält, wenn es mit Xylose versetzt wird. Wie aus Abbildung 40 ersichtlich, wurden die molaren Verhältnisse in einem Modellsystem aus Glucose, Glycin und Kreatinin von 0,5 : 1 : 1 so gewählt, dass die HAA-Bildung im Maximum lag. Wie zu erwarten, wurde die HAA-Bildung durch den Zusatz von Xylose stärker unterdrückt als durch die gleichen molaren Mengen an Glucose (vgl. Abb. 36).

Des Weiteren setzte durch den Xylosezusatz die Bildung von 4,8-DiMeIQx ein, wengleich in geringerem Umfang als in den Modellen, in denen ausschließlich Xylose als reduzierender Zucker verwendet wurde (vgl. Abb. 38).

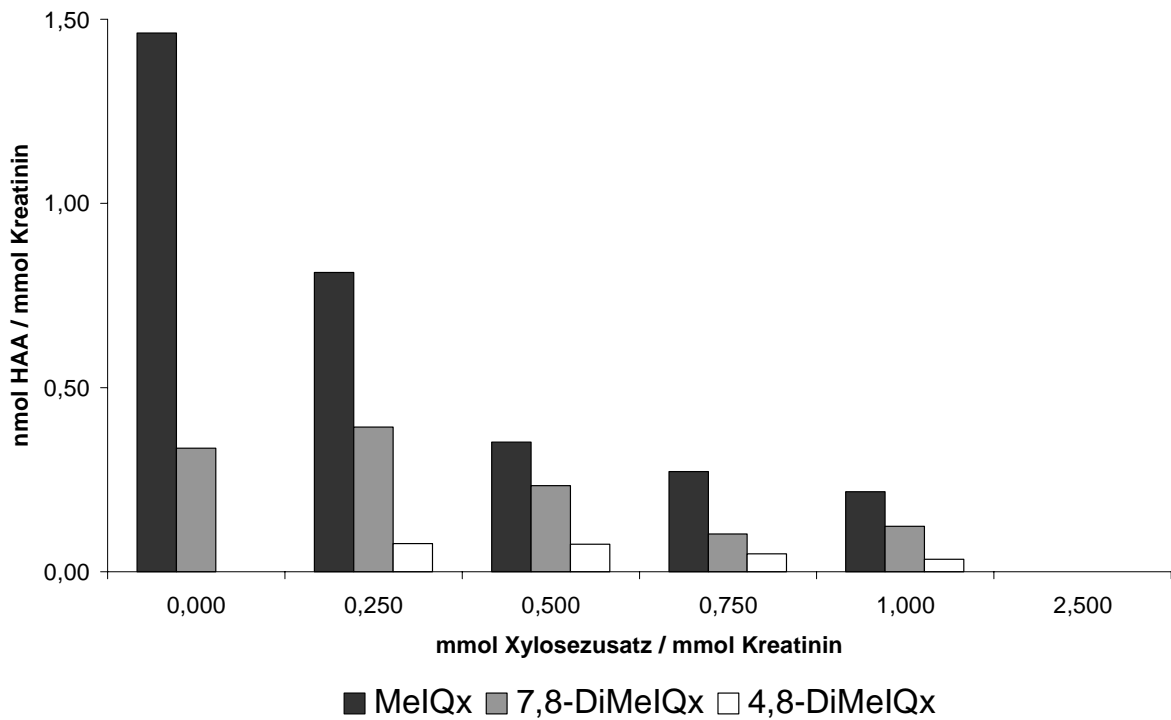


Abb. 40 Einfluss der Xylose auf die HAA-Bildung in einem wasserarmen Modellsystem; Glucose : Glycin : Kreatinin; 0,5 : 1 : 1; 125 °C; 6 h im Trockenschrank; aw=0,75; verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml; verschlossen

3.2.2 Einfluss der Temperatur auf die HAA-Bildung

Bei unseren Untersuchungen des Einflusses der Molmengenanteile von Glucose und Xylose in wasserarmen Modellsystemen, die Glycin und Kreatinin in äquimolaren Mengen enthielten, wurde festgestellt, dass die Bildung der HAAs bei einem aw-Wert von 0,75 und einer Temperatur von 125 °C größer ist als bei einem aw-Wert von 0,52 und einer Temperatur von 120 °C.

Es sollte daher getrennt der Einfluss der Temperatur und des aw-Wertes auf die HAA-Bildung untersucht werden. Die molaren Verhältnisse der Glucose bzw. der Xylose zu Glycin und Kreatinin wurden dabei so gewählt, dass sie bei 0,5 : 1 : 1 und somit im Maximum der HAA-Bildung lagen (Kap 3.2.1). Als Erhitzungszeit wurde einheitlich 6 Stunden gewählt, als aw-Werte 0,52 und 0,75.

In den von uns untersuchten Modellen zum Einfluss der Temperatur auf die HAA-Bildung konnte die Bildung von MeIQx, 7,8-DiMeIQx und 4,8-DiMeIQx beobachtet werden, nicht aber die Bildung anderer HAAs.

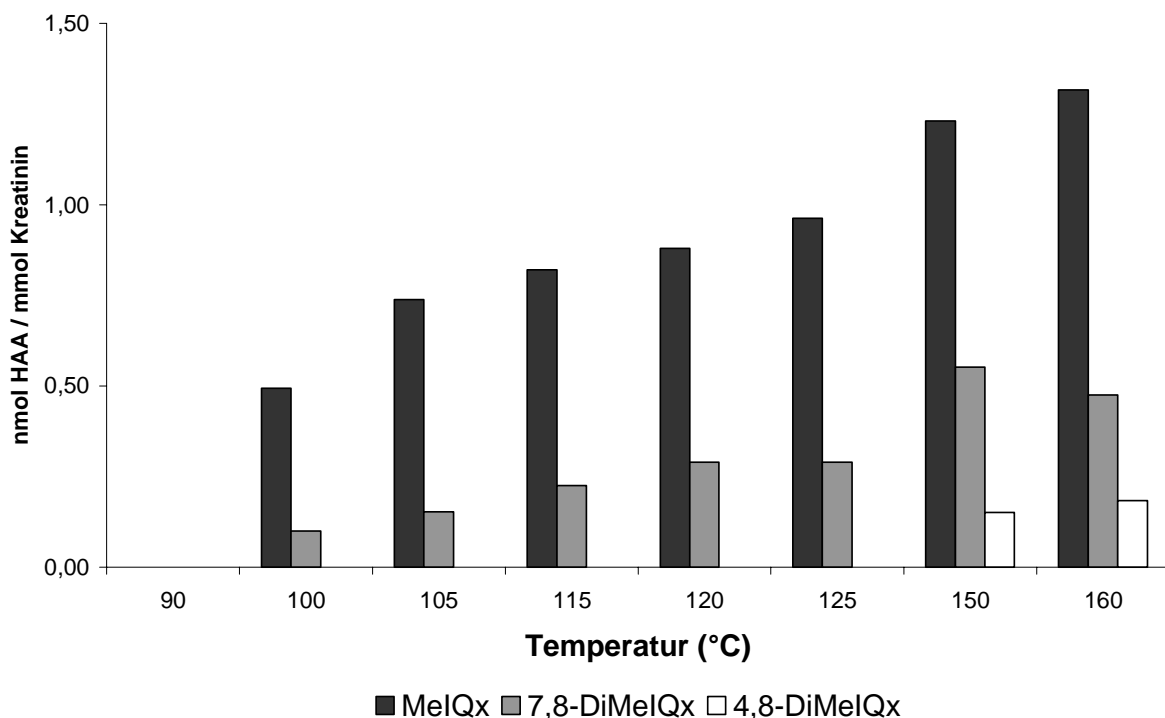


Abb. 41 Einfluss der Temperatur auf die Bildung von HAAs in einem wasserarmen Modellsystem aus Glucose, Glycin und Kreatinin mit den molaren Verhältnissen 0,5 : 1 : 1; aw=0,52; Trockenschrank; Erhitzungsdauer 6 h

Aus Abb. 41 geht hervor, dass die HAA-Bildung in einem glucosehaltigen Modell erst bei einer Temperatur von 100 °C mit einer Gesamtmenge aller nachgewiesener HAAs von 0,6 nmol pro mmol Kreatinin einsetzt und bis 160 °C kontinuierlich auf eine Gesamtmenge der unter diesen Bedingungen auftretenden HAAs von 2,0 nmol pro mmol Kreatinin ansteigt. Bis 125 °C wird neben MeIQx nur 7,8-DiMeIQx gebildet, wobei eine Gesamtmenge an HAAs von 1,2 nmol pro mmol Kreatinin entsteht. Ab einer Temperatur von 150 °C setzt dann zusätzlich die Bildung von 4,8-DiMeIQx ein. Skog und Jägerstad [140] (vgl. Kap. 3.1.1, Tabelle 8) haben in einem Modellsystem aus Glucose, Glycin und Kreatinin nach Erhitzen in einem Diethylenglykol-Wasser-Gemisch (5 : 1) bei einer Temperatur von über 150 °C bis zu 4 nmol MeIQx pro mmol Kreatinin nachgewiesen. Unter diesen Bedingungen wurde 4,8-DiMeIQx von den genannten Autoren jedoch nur in Spuren, die unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen, nachgewiesen. Erst bei der Verwendung von Alanin anstelle des Glycins neben Glucose und Kreatinin wurden von Matsushima [137] (vgl. Kap. 3.1.1, Tabelle 8) bis zu 4,2 nmol 4,8-DiMeIQx pro mmol Kreatinin festgestellt. Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse haben Skog und Jägerstad der Bildung von 4,8-DiMeIQx bei Verwendung von Glycin als Aminosäure nur eine untergeordnete Rolle bei der Bildung der HAAs beigemessen.

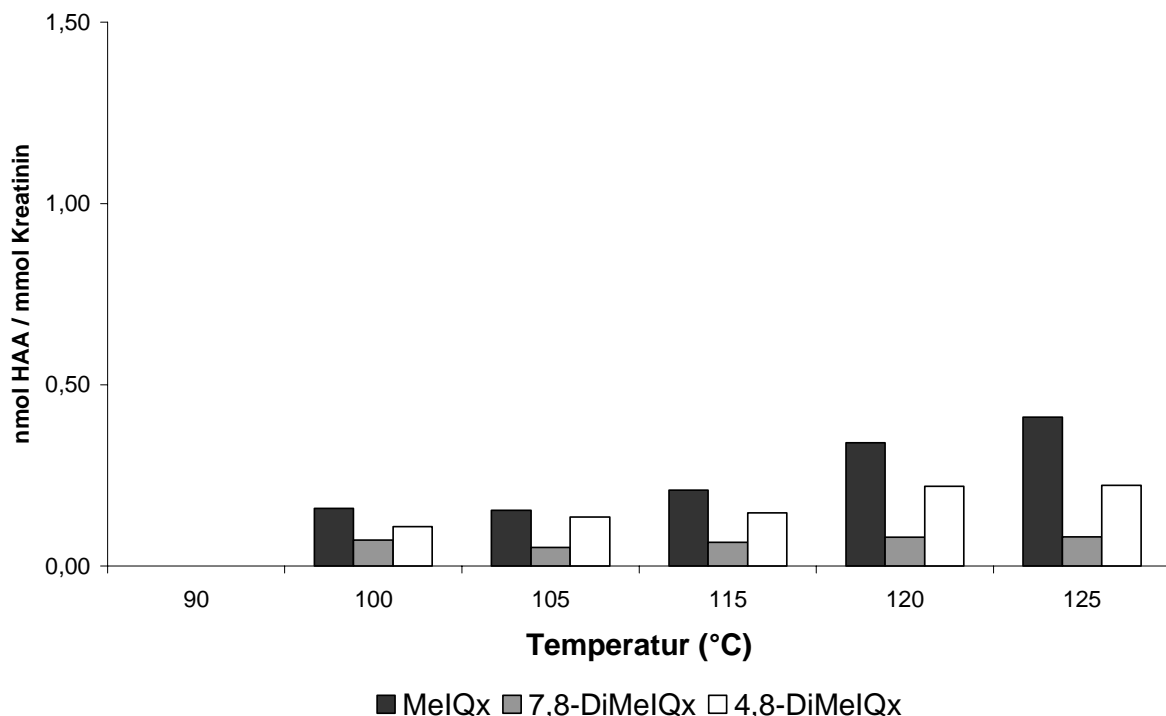


Abb. 42 Einfluss der Temperatur auf die Bildung von HAAs in einem wasserarmen Modellsystem aus Xylose, Glycin und Kreatinin mit den molaren Verhältnissen 0,5 : 1 : 1; $a_w=0,52$; Trockenschrank; Erhitzungsdauer 6 h

Anders als bei Skog und Jägerstad werden bei unseren wasserarmen Modellen mit Glucose oder Xylose, Glycin und Kreatinin nicht nur Spuren an 4,8-DiMeIQx, sondern Mengen um bis zu 0,2 nmol pro mmol Kreatinin gebildet (vgl. Abb. 41 und 42).

In weiteren Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf die HAA-Bildung haben wir anstelle der Glucose unter den gleichen Bedingungen Xylose verwendet. Wie die Abbildung 42 verdeutlicht, setzt auch bei der Verwendung von Xylose die HAA-Bildung bei 100 °C mit einer Gesamtmenge aller HAAs von etwa 0,3 nmol pro mmol Kreatinin ein; bei einer Temperatur von 125 °C wird eine Gesamtmenge von 0,7 nmol pro mmol Kreatinin erreicht.

Bei höheren Temperaturen werden bei den Xylosemodellen die Chromatogramme so stark von Störpeaks überlagert, dass sie nicht mehr auszuwerten sind.

Reaktionsaromen lassen sich in Langzeit-Niedertemperatur- und Kurzzeit-Hochtemperatur-Reaktionsaromen unterteilen. Bei den von uns untersuchten langzeiterhitzten Modellen (Abb. 41 und 42) war eine Auswertung der Chromatogramme bei höheren Temperaturen erschwert und bei der Verwendung von Xylose ab einer Temperatur von 125 °C nicht mehr möglich. Des Weiteren erreichten die Mengen an HAAs bei dem zunächst gewählten aw-Wert von 0,52 und Temperaturen um 125 °C nicht die Mengen an HAAs wie in den Versuchen zum Einfluss der Molmengenverhältnisse bei gleicher Temperatur und einem aw-Wert von 0,75 (vgl. Kapitel 3.2.1, Abb. 35 - 38). Somit entschieden wir uns, den aw-Wert der Modelle in einer weiteren Versuchsreihe auf 0,75 einzustellen und diese nur für eine Stunde im Trockenschrank zu erhitzen.

Unter den hier gewählten Bedingungen nahm die Anzahl der Störpeaks bei höheren Temperaturen zwar zu (Kap 2.4, Abb. 20), dennoch waren die Chromatogramme im Gegensatz zu den langzeiterhitzten Modellsystemen bis 200 °C problemlos auswertbar. Neben der Detektion mit dem DAD wurden die Ergebnisse mittels LC-MS und nach Derivatisierung mittels GC-MS abgesichert (Kap. 2.6 und 2.7).

In den auf einen aw-Wert von 0,75 eingestellten Glucose- und Xylosemodellen kann MeIQx bereits bei einer Temperatur von 100 °C in Spuren, die unterhalb der Bestimmungsgrenze liegen, nachgewiesen werden (Abb. 43 und 44).

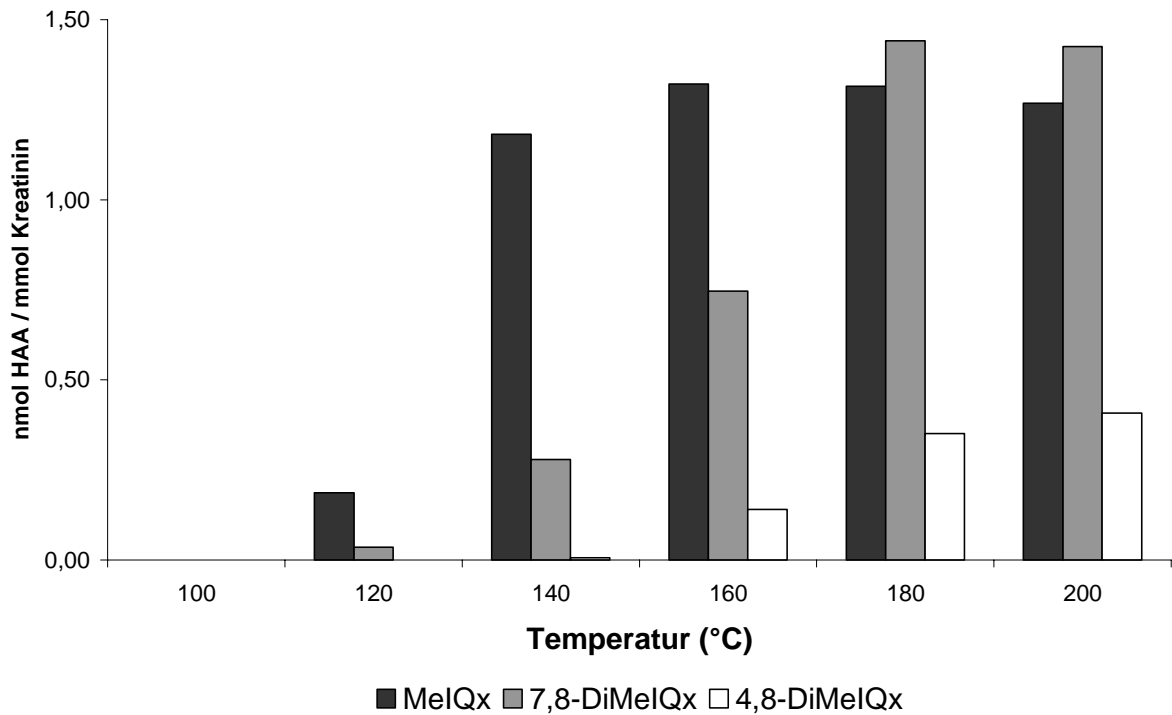


Abb. 43 Einfluss der Temperatur auf die Bildung von HAAs in einem Modellsystem aus Glucose, Glycin und Kreatinin mit den molaren Verhältnissen 0,5 : 1: 1; aw=0,75; Trockenschrank; Erhitzungsdauer 1 h

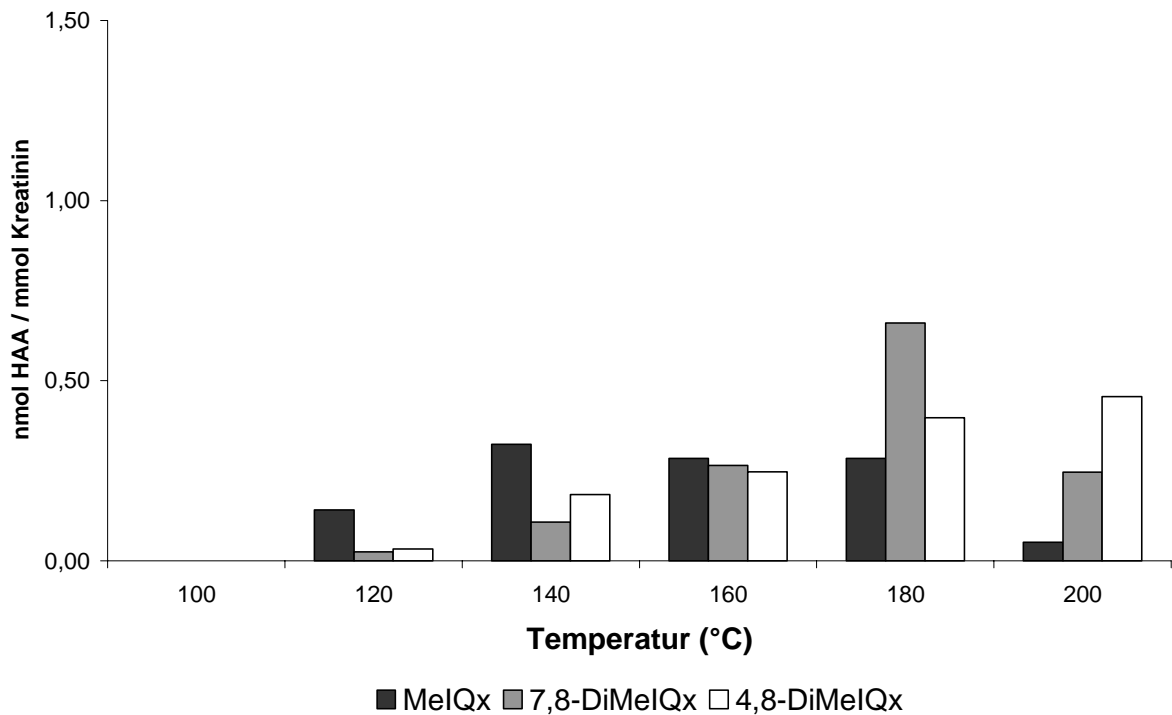


Abb. 44 Einfluss der Temperatur auf die Bildung von HAAs in einem Modellsystem aus Xylose, Glycin und Kreatinin mit den molaren Verhältnissen 0,5 : 1: 1; aw=0,75; Trockenschrank; Erhitzungsdauer 1 h

Abbildung 43 beschreibt bei dem hier eingestellten aw-Wert von 0,75 den Verlauf der HAA-Bildung bei Verwendung von Glucose als reduzierenden Zucker im Bereich zwischen 100°C und 200°C.

Bereits bei einer Temperatur von 100 °C kann MeIQx in Spuren nachgewiesen werden. Bei 140 °C steigt die HAA-Bildung sprunghaft an und erreicht eine Gesamtmenge aller nachgewiesener HAAs von 1,47 nmol pro mmol Kreatinin. Hier kann bereits das Einsetzen der Bildung von 4,8-DiMeIQx beobachtet werden. Die Mengen liegen dabei zunächst maximal bei 0,02 nmol pro mmol Kreatinin. Bei einer Temperatur von 160 °C erreicht die MeIQx-Bildung mit 1,32 nmol pro mmol Kreatinin ihr Maximum. Bis 200 °C bleibt dann die MeIQx-Bildung nahezu unverändert, während 7,8-DiMeIQx erst bei einer Temperatur von 180 °C mit 1,44 nmol pro mmol Kreatinin das Bildungsmaximum erreicht; die Menge des gebildeten 4,8-DiMeIQx steigt dagegen mit Erhöhung der Temperatur kontinuierlich an und erreicht bei 200 °C einen Wert von 0,41 nmol pro mmol Kreatinin bei einer Gesamtmenge aller nachgewiesener HAAs von 3,10 nmol pro mmol Kreatinin.

Schuirman stellte unter den gleichen Bedingungen in Glucose- und Fructosemodellsystemen im Temperaturbereich von 100 °C bis 110 °C nur einen sehr geringen Zuwachs der MeIQx-Bildung fest [43].

Erst ab einer Temperatur von 125 °C wurde von ihm ein exponentieller Anstieg der MeIQx-Bildung bis 150°C beobachtet. Die HAAs 7,8-DiMeIQx und 4,8-DiMeIQx wurden bei diesen Versuchen nicht von ihm erwähnt. Es war ihm jedoch mit seinen Untersuchungsmethoden nicht möglich, in Modellen, die bei einer höheren Temperatur als 150 °C erhitzt wurden, die HAA-Bildung zu untersuchen, da die HAAs in den Chromatogrammen zu stark von Störpeaks überlagert wurden.

In Abbildung 44 wird der Temperatureinfluss auf die HAA-Bildung unter Verwendung von Xylose anstelle von Glucose beschrieben. Die Bedingungen sind identisch mit denen in den Glucosemodellen. Bei einer Temperatur von 120 °C werden MeIQx, 7,8-DiMeIQx und 4,8-DiMeIQx mit einer Gesamtmenge von 0,20 nmol pro mmol Kreatinin gebildet; sie ist damit nur um 10 % niedriger als bei Verwendung von Glucose. Schon bei einer Temperatur von 140 °C erreicht die MeIQx-Bildung mit 0,32 nmol pro mmol Kreatinin ihr Maximum; bei Verwendung von Glucose wird demgegenüber unter gleichen Bedingungen etwa die vierfache Menge an MeIQx erreicht.

Wird die Temperatur auf 200 °C erhöht, können sogar nur noch 0,05 nmol MeIQx pro mmol Kreatinin nachgewiesen werden, was einem Anteil von lediglich 4 % des bei Verwendung von Glucose erreichten Wertes entspricht. Das Maximum der Bildung von

7,8-DiMeIQx liegt wie bei der Verwendung von Glucose bei einer Temperatur von 180 °C und beträgt 0,66 nmol pro mmol Kreatinin. Die Gesamtmenge aller HAAs ist bei dieser Temperatur bei Verwendung von Xylose mit 1,37 nmol pro mmol Kreatinin ebenfalls am größten, während die Bildung von 4,8-DiMeIQx weiterhin bis zu einer Temperatur von 200 °C auf 0,46 nmol pro mmol Kreatinin ansteigt.

Häufig wird in der Literatur nur MeIQx als Bewertungsgrundlage zur Beurteilung der HAA-Bildung herangezogen. Dies kann aber bei der Verwendung von Xylose zwangsläufig zu einer fehlerhaften Interpretation führen. Wie aus den dargestellten Ergebnissen hervorgeht, ist die MeIQx-Bildung bei Verwendung von Xylose deutlich geringer als bei Verwendung von Glucose. Legt man aber beim Vergleich der Xylose bzw. Glucose enthaltenden Modellsysteme die Summe der gebildeten HAAs zugrunde, sind die Unterschiede zwischen den beiden Modellen nicht mehr so groß wie bei der Verwendung von MeIQx als Vergleichsgrundlage. Trotzdem ist klar zu erkennen, dass sich durch einen Austausch der Glucose durch Xylose und bei der Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen die HAA-Bildung insgesamt deutlich verringern lässt.

3.2.3 Einfluss der Wasseraktivität auf die HAA-Bildung

Bereits Schuirmann konnte in Glucose enthaltenden Modellen nachweisen, dass bei einem aw-Wert von 0,44 bereits deutliche Mengen an MeIQx gebildet werden und bei einem aw-Wert von 0,75 ein Maximum der MeIQx-Bildung vorliegt [43]. Unter wasserarmen Bedingungen (Kap. 3.2.2) konnten wir auch die Bildung von 4,8-DiMeIQx nachweisen, welches in den Arbeiten von Schuirmann nicht erwähnt wurde. Zwar wurde von Schuirmann 7,8-DiMeIQx in wasserarmen Modellsystemen nachgewiesen, doch Angaben über die gebildeten Mengen liegen nicht vor. Der Einfluss des aw-Wertes auf die Bildung von 7,8-DiMeIQx und 4,8-DiMeIQx ist deshalb bisher ungeklärt geblieben. In Weiterführung der Arbeiten von Schuirmann wollten wir nun unterschiedliche wasserarme Modellsysteme daraufhin untersuchen, welchen Einfluss die Gleichgewichtsfeuchtigkeit bzw. der aw-Wert generell auf die Bildung der HAAs hat.

Bei Untersuchungen zum Temperatureinfluss auf wasserarme Modellsysteme (aw-Wert 0,52) bei sechsständiger Erhitzung von 90 ° bis 160 °C (Kap. 3.2.2) stellten wir fest, dass bei Temperaturen über 125 °C die Chromatogramme der Xylosemodelle nicht mehr auswertbar waren. Diese Hochtemperatur-Langzeit-Bedingungen wären für Reaktionsaromen auch unrealistisch. Da die Bildung der IQ-Verbindungen bei einer Temperatur von 100°C beginnt, ab 120 °C exponentiell ansteigt und ab 150 °C ein Maximum der MeIQx-Bildung bereits bei einer Erhitzungsdauer von weniger als einer Stunde erreicht wird, haben wir uns dafür entschieden, Modelle auf der Basis von Niedertemperatur-Langzeit- und Hochtemperatur-Kurzzeit-Reaktionsaromen zu untersuchen. Unter diesen Bedingungen waren alle Chromatogramme problemlos auswertbar. Für Modelle auf der Basis von Reaktionsaromen, die unter den Bedingungen einer Niedertemperatur-Langzeit-Erhitzung hergestellt wurden, wurde beispielhaft eine Temperatur von 100 °C (Beginn der HAA-Bildung, s. Kap. 3.2.2) und eine Erhitzungsdauer von 6 Stunden gewählt; für die Bedingungen einer Hochtemperatur-Kurzzeit-Erhitzung wurden die Modelle einheitlich eine Stunde bei 160 °C erhitzt.

Die eingesetzten Mengen von reduzierenden Zuckern, Glycin und Kreatinin in den Modellsystemen wurden so gewählt, dass ein Molmengenverhältnis von 0,5 : 1 : 1 vorlag, da hier die maximale Bildung von MeIQx erfolgt (Kapitel 3.2.1).

Wie die Abbildungen 45 und 46 zeigen, kann bei aw-Werten zwischen 0,33 und 0,88 in den Niedertemperatur-Langzeit- und Hochtemperatur-Kurzzeit-Modellen unter Verwendung von Glucose MeIQx und 7,8-DiMeIQx nachgewiesen werden.

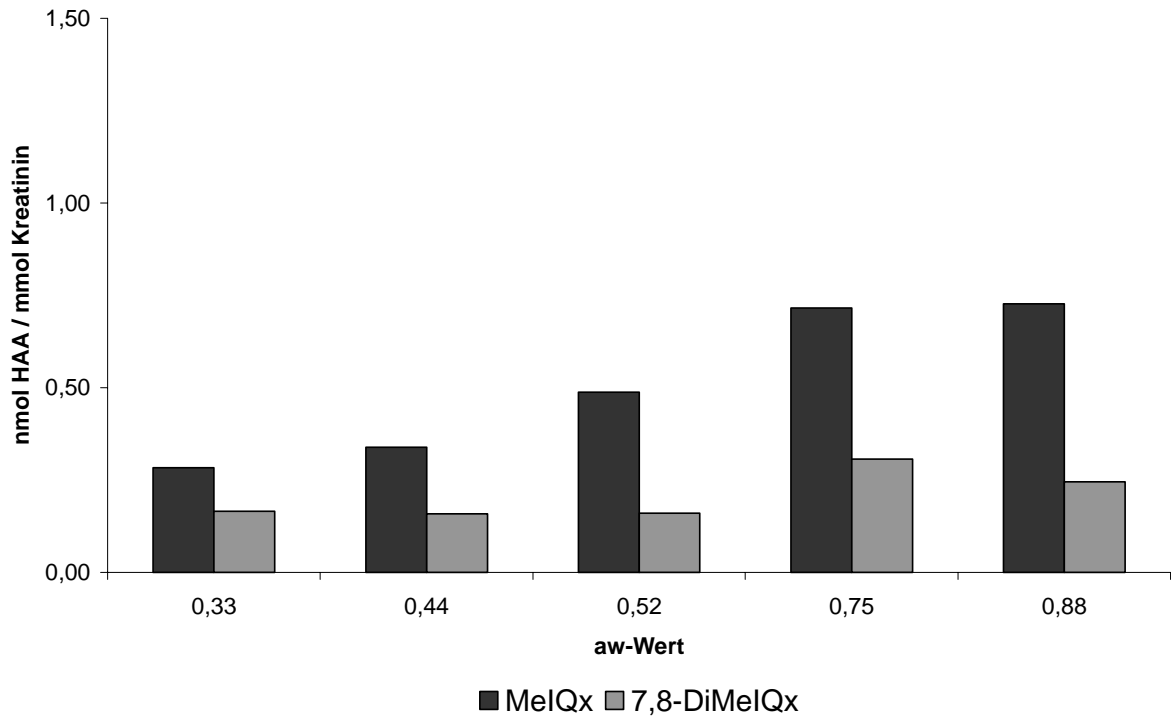


Abb. 45 Einfluss der Wasseraktivität auf die Bildung von HAAs in einem Modellsystem aus Glucose, Glycin und Kreatinin mit den molaren Verhältnissen 0,5 : 1: 1; T=100 °C; Trockenschrank; Erhitzungsdauer 6 h

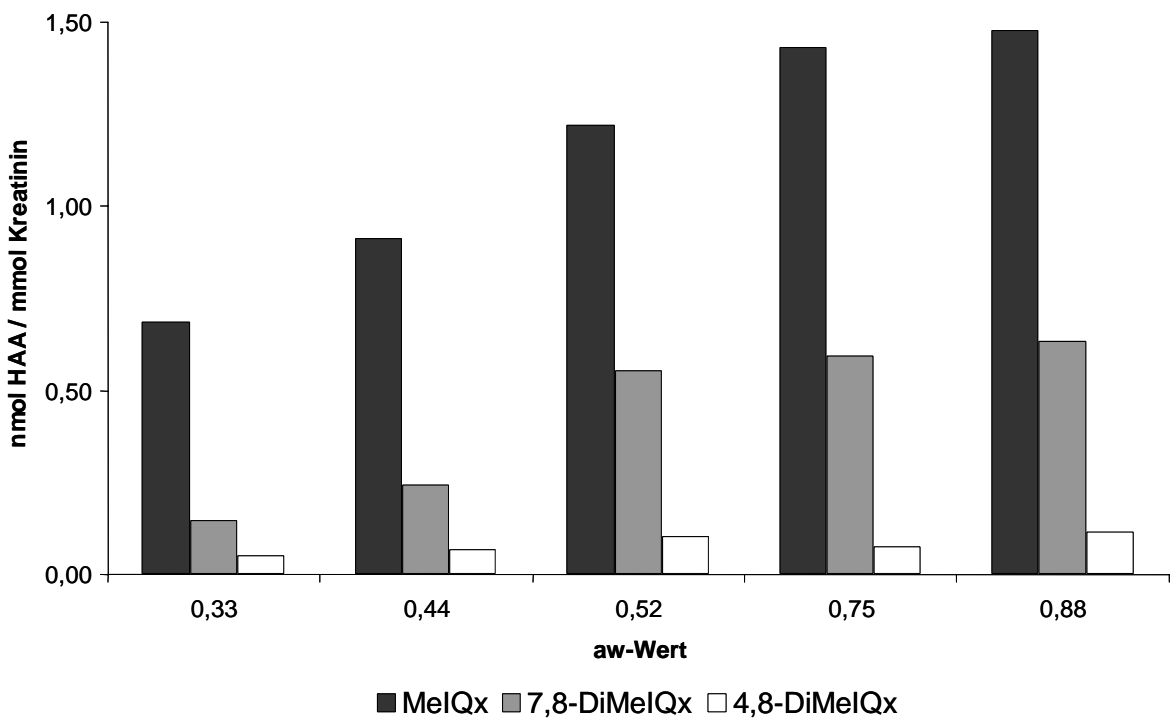


Abb. 46 Einfluss der Wasseraktivität auf die Bildung von HAAs in einem Modellsystem aus Glucose, Glycin und Kreatinin mit den molaren Verhältnissen 0,5 : 1: 1; T=150 °C; Trockenschrank; Erhitzungsdauer 1 h

4,8-Di-MeIQx wird bei Verwendung von Glucose nur im Hochtemperatur-Kurzzeit-Modell gebildet (Abb. 46). Bei den Glucosemodellen ist bis zu einer Wasseraktivität von 0,75 ein kontinuierlicher Anstieg der HAA-Bildung mit steigendem aw-Wert zu beobachten (Abb. 45 und 46). Das Maximum der HAA-Bildung wird bei einem aw-Wert von 0,75 beobachtet. In den Glucosemodellen werden unter den Bedingungen der Niedertemperatur-Langzeit-Erhitzung (Abb. 45) maximal 1,0 nmol HAAs pro mmol Kreatinin und unter den Bedingungen der Hochtemperatur-Kurzzeit-Erhitzung 2,1 nmol HAAs pro mmol Kreatinin nachgewiesen (Abb.46).

Bei Anwesenheit von Xylose als Reaktionspartner können bei aw-Werten zwischen 0,33 und 0,88 sowohl in den Niedertemperatur-Langzeit- als auch in den Hochtemperatur-Kurzzeit-Modellen (Abb. 47 und 48) MeIQx, 7,8-DiMeIQx und 4,8-DiMeIQx nachgewiesen werden.

In den in den Abbildungen 47 und 48 gezeigten Xylosemodellen ist ein Maximum der HAA-Bildung im Bereich von aw-Werten zwischen 0,75 und 0,88 zu beobachten. Unter den Bedingungen der Niedertemperatur-Langzeiterhitzung (Abb. 47) werden maximal 0,54 nmol HAAs pro mmol Kreatinin nachgewiesen; unter den Bedingungen der Hochtemperatur-Kurzzeiterhitzung (Abb. 48) beträgt die maximale Menge aller nachgewiesenen HAAs 0,7 nmol pro mmol Kreatinin.

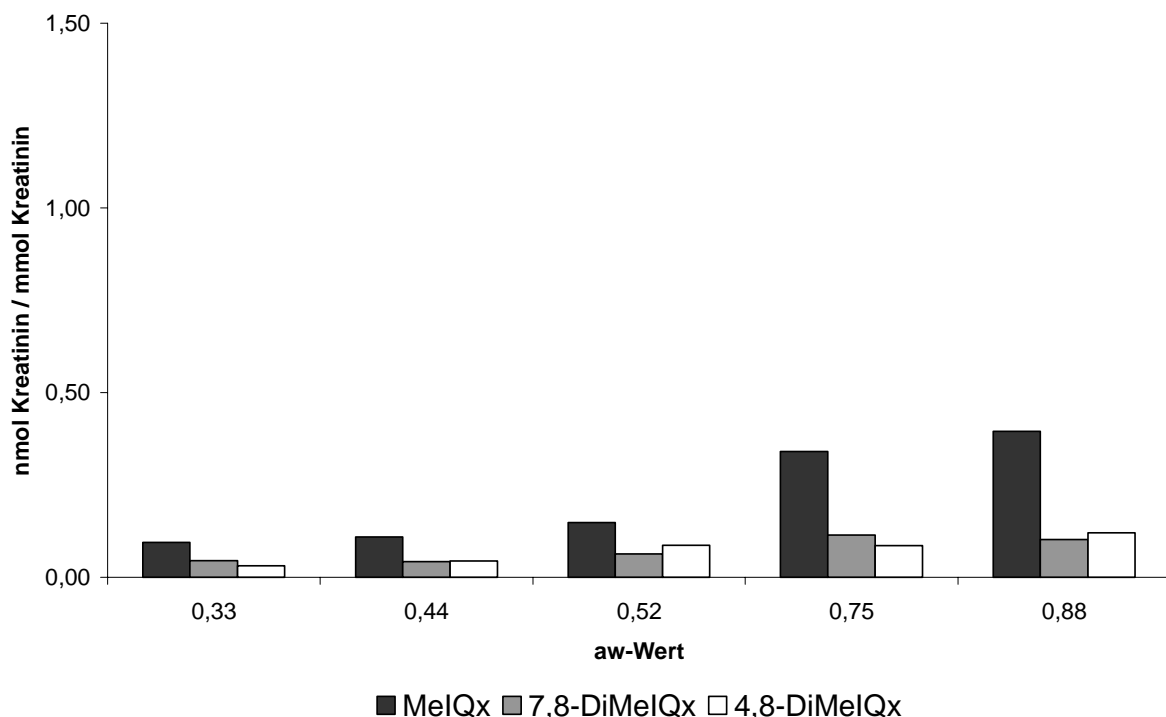


Abb. 47 Einfluss der Wasseraktivität auf die Bildung von HAAs in einem Modellsystem aus Xylose, Glycin und Kreatinin mit den molaren Verhältnissen 0,5 : 1: 1; T=100 °C; Trockenschrank; Erhitzungsdauer 6 h

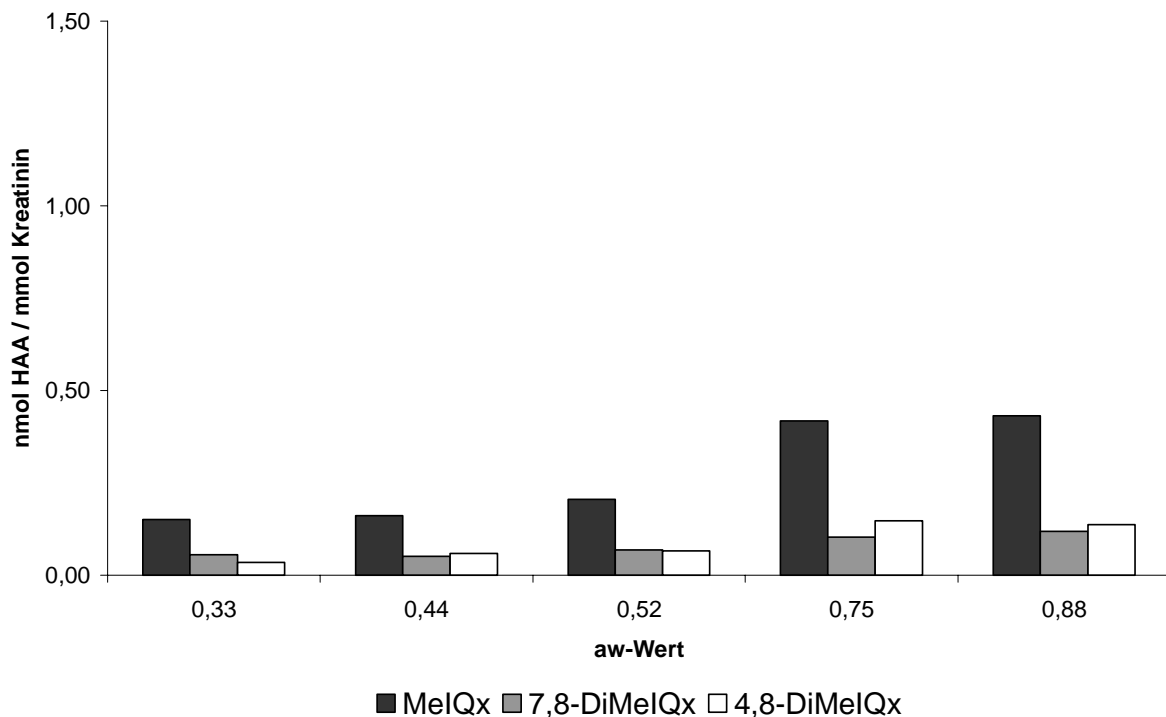


Abb. 48 Einfluss der Wasseraktivität auf die Bildung von HAAs in einem Modellsystem aus Xylose, Glycin und Kreatinin mit den molaren Verhältnissen 0,5 : 1: 1; T=150 °C; Trockenschrank; Erhitzungsdauer 1 h

Sowohl in den Glucose als auch Xylose enthaltenden Modellen ist mit dem Anstieg des aw-Wertes von 0,33 bis 0,75 ein Anstieg der Gesamtmenge aller nachgewiesener HAAs verbunden. Bei einer weiteren Steigerung des aw-Wertes auf 0,88 ist kaum noch eine Änderung zu beobachten.

Zum Vergleich haben wir ein wässriges Modellsystem mit einem Wassergehalt von 65 % untersucht. Nach sechsständiger Erhitzung bei 100 °C unter Verwendung von Glucose werden gerade einmal 0,23 nmol MeIQx pro mmol Kreatinin, bei der Verwendung von Xylose nur 0,08 nmol MeIQx pro mmol MeIQx nachgewiesen. Die Bildung anderer HAAs kann im wässrigen Modellsystem nicht beobachtet werden.

Zwar überwiegt der Einfluss der Temperatur gegenüber dem Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit, doch wasserarme und wässrige Modellsysteme unterscheiden sich deutlich voneinander. Unter wasserarmen Bedingungen sind sowohl die Mengen der nachgewiesenen HAAs als auch das Produktspektrum deutlich größer als im wässrigen Medium.

3.2.4 Einfluss der Reaktionszeit auf die HAA-Bildung

3.2.4.1 Einfluss der Erhitzungsdauer auf die HAA-Bildung bei Niedertemperatur-Langzeit-Erhitzung

Die Abbildungen 49 und 50 zeigen den Einfluss der Reaktionszeit auf die Bildung von HAAs in Modellen, die unter den Bedingungen der Niedertemperatur-Langzeiterhitzung hergestellt wurden. Einheitlich wurden eine Temperatur von 100 °C und ein aw-Wert von 0,75 gewählt. Die molaren Verhältnisse von reduzierendem Zucker zu Glycin und Kreatinin lagen bei 0,5 : 1 : 1 entsprechend dem Maximum der HAA-Bildung (vgl. Kap. 3.2.1).

Bei der Verwendung von Glucose steigt die nachgewiesene Menge der HAAs, bestehend aus MeIQx und 7,8-DiMeIQx, kontinuierlich nach 10 Stunden auf 1,42 nmol pro mmol Kreatinin an (Abb. 49). Dennoch ist ein Abflachen der Zunahme der HAAs mit zunehmender Reaktionszeit zu beobachten.

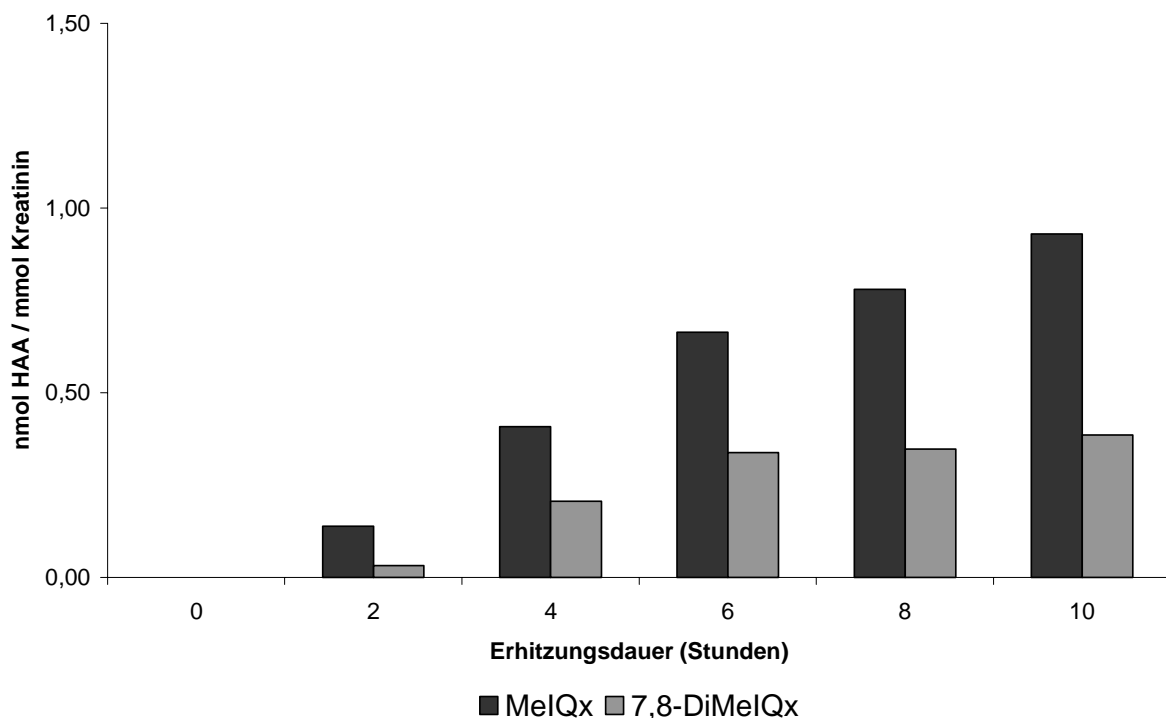


Abb. 49 Einfluss der Erhitzungsdauer auf die Bildung von HAAs in einem Glucose, Glycin und Kreatinin enthaltenden Modellsystem mit den molaren Verhältnissen 0,5 : 1 : 1; aw = 0,75; Erhitzungstemperatur 100 °C; Trockenschrank

Wie zu erwarten ist bei Verwendung von Xylose anstelle von Glucose der Anstieg der nachgewiesenen Mengen an HAAs mit der Reaktionszeit deutlich geringer (Abb. 50). Nach 6 Stunden beträgt die Gesamtmenge der HAAs, bestehend aus MeIQx, 7,8-DiMeIQx und 4,8-DiMeIQx, 0,52 nmol pro mmol Kreatinin. Bei einer längeren Reaktionszeit nimmt die Menge der nachgewiesenen HAAs kaum noch zu und erreicht nach 10 Stunden eine Gesamtmenge von 0,64 nmol pro mmol Kreatinin.

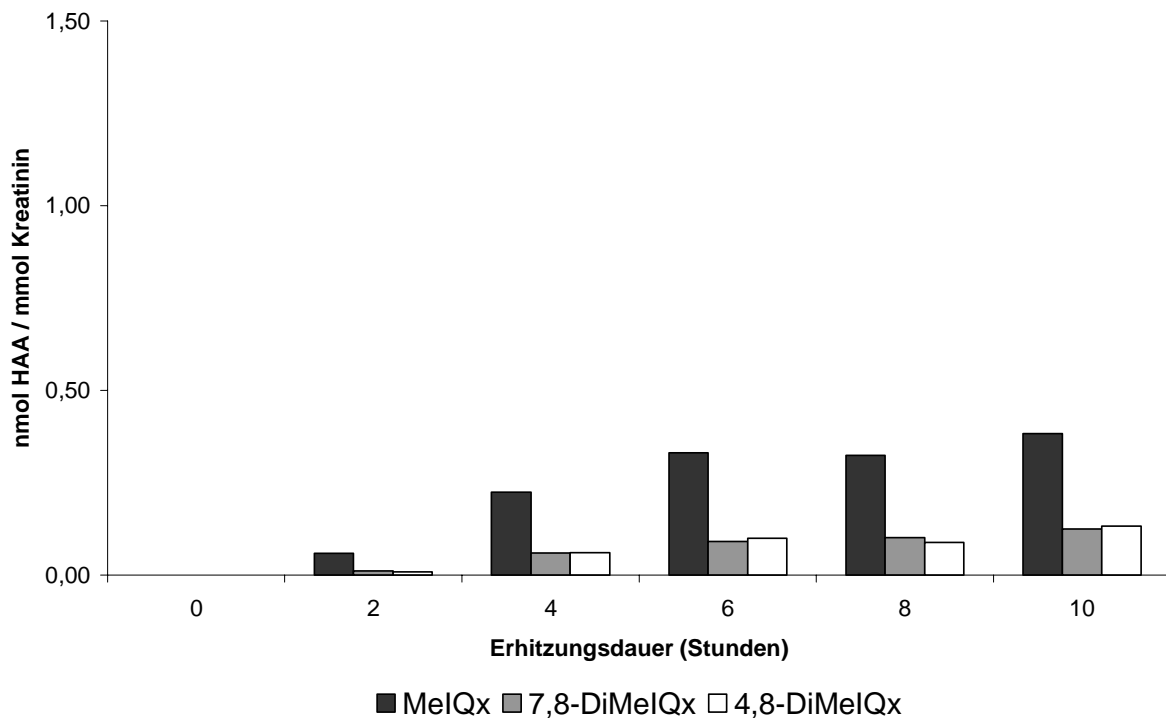


Abb. 50 Einfluss der Erhitzungsdauer auf die Bildung von HAAs in einem Xylose, Glycin und Kreatinin enthaltenden Modellsystem mit den molaren Verhältnissen 0,5 : 1: 1; $a_w = 0,75$; Erhitzungstemperatur 100 °C; Trockenschrank

3.2.4.2 Einfluss der Erhitzungsdauer auf die HAA-Bildung bei Hochtemperatur-Kurzzeit-Erhitzung

Die Abbildungen 51 und 52 zeigen den Einfluss der Reaktionszeit auf die Bildung von HAAs in den Modellen unter den Bedingungen der Hochtemperatur-Kurzzeit-Erhitzung. Einheitlich wurde eine Temperatur von 150 °C und ein a_w -Wert von 0,75 gewählt. Die molaren Verhältnisse waren identisch mit denen in den unter den Bedingungen einer Niedertemperatur-Langzeit-Erhitzung hergestellten Modellen (Kap. 3.2.4.1).

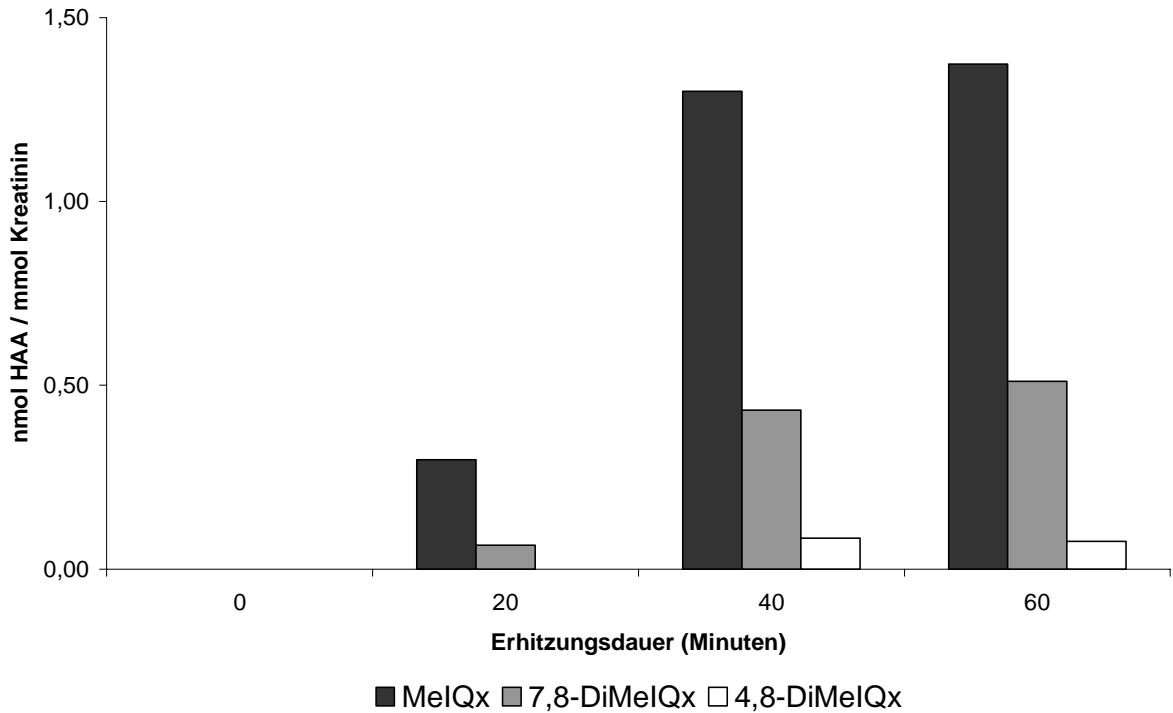


Abb. 51 Einfluss der Erhitzungsdauer auf die Bildung von HAAs in einem Glucose, Glycin und Kreatinin enthaltenden Modellsystem mit den molaren Verhältnissen 0,5 : 1: 1; $a_w = 0,75$; Erhitzungstemperatur 150 °C; Trockenschrank

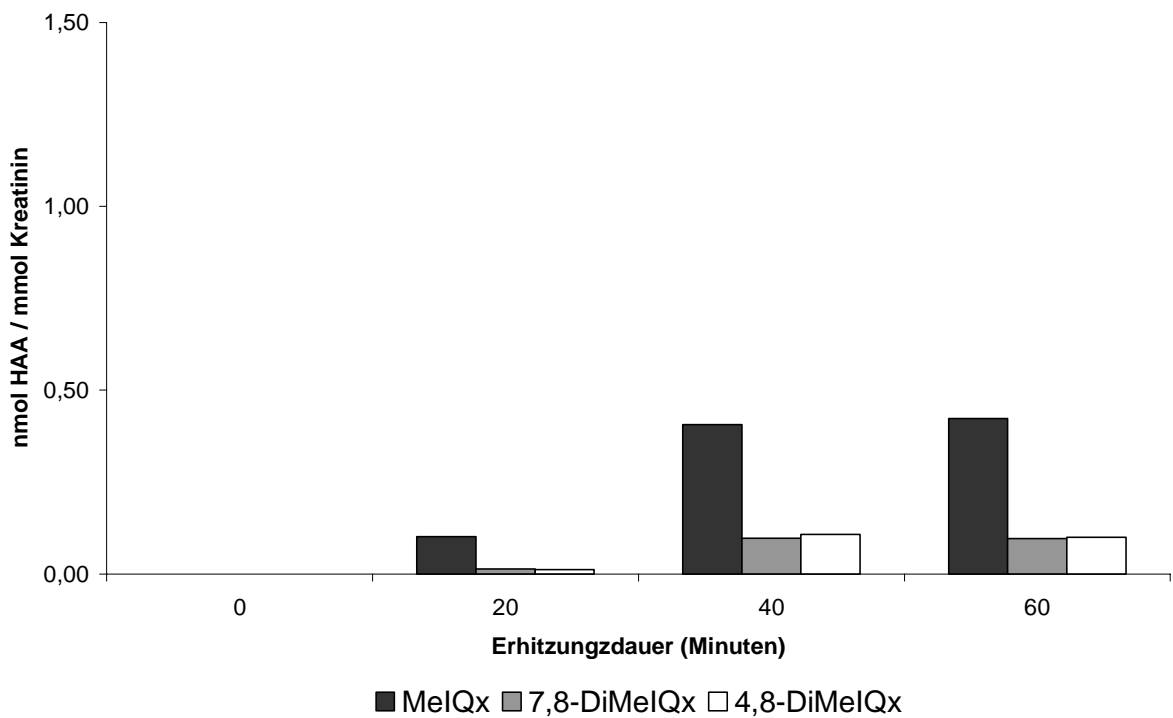


Abb. 52 Einfluss der Erhitzungsdauer auf die Bildung von HAAs in einem Xylose, Glycin und Kreatinin enthaltenden Modellsystem mit den molaren Verhältnissen 0,5 : 1: 1; $a_w=0,75$; Erhitzungstemperatur 150 °C; Trockenschrank

Aus Abb. 51 geht hervor, dass bei Verwendung von Glucose nach 20 Minuten MeIQx und 7,8-DiMeIQx mit einer Gesamtmenge von 0,36 nmol pro mmol Kreatinin gebildet werden. Bereits nach 40 Minuten kann neben MeIQx und 7,8-DiMeIQx auch 4,8-DiMeIQx nachgewiesen werden; damit erreichen alle nachgewiesenen HAAs eine Gesamtmenge von 1,81 nmol pro mmol Kreatinin. Nach 60 Minuten erhöht sich die gebildete Menge aller nachgewiesenen HAAs nur noch geringfügig auf 2,0 nmol pro mmol Kreatinin. Der Vergleich mit Abbildung 49 ergibt, dass unter den hier herrschenden Bedingungen deutlich größere Mengen an HAAs gebildet werden als unter den Bedingungen der Niedertemperatur-Langzeit-Erhitzung.

Aus Abbildung 52 geht hervor, dass bei Verwendung von Xylose nach 20 Minuten bei 150 °C MeIQx, 7,8-DiMeIQx und 4,8-DiMeIQx mit einer Gesamtmenge von nur 0,12 nmol pro mmol Kreatinin gebildet werden. Nach 40 Minuten steigt die Gesamtmenge auf 0,62 nmol pro mmol Kreatinin an. Wird die Reaktionszeit auf 60 Minuten erhöht, kann keine weitere Zunahme der HAA-Bildung beobachtet werden.

Von Frandrup–Kuhr [123] wurde bei Untersuchungen der Reaktionswege der Maillard-Reaktion beobachtet, dass eine Vielzahl an reaktiven Zuckerabbauprodukten die Bildung der HAAs maßgeblich beeinflussen. Insbesondere bei der Verwendung von Methylglyoxal wurde bezüglich der HAA-Bildung kein ambivalentes Verhalten wie bei der Verwendung von reduzierenden Zuckern beobachtet (Kapitel 3.2.1). Stattdessen stellte Frandrup-Kuhr fest, dass mit steigenden Mengen an Methylglyoxal ein kontinuierlicher Anstieg der MeIQx-Bildung zu beobachtet ist.

Mit fortschreitender Reaktionszeit und Erhöhung der Temperatur werden die Zucker zunehmend zu reaktiven Vorstufen der HAA-Bildung abgebaut. Vollenbröker [46] führte Untersuchungen an wasserarmen Avicel-Modellsystemen, die Glucose, eine Aminosäure und Kreatinin in den molaren Verhältnissen 0,5 : 1 : 1 enthielten, durch. Dabei beobachtete er, dass bei einem aw-Wert von 0,52 und einer Temperatur von 140 °C die Glucose bereits nach 10 Minuten um mehr als 95 % abgebaut wird. Es ist naheliegend, dass auch die von Frandrup-Kuhr untersuchten Vorstufen kontinuierlich mit der Reaktionszeit und der Erhöhung der Temperatur weiterreagieren, während sie in immer geringerem Umfang nachgebildet werden, da die Menge an reduzierendem Zucker während der Reaktion rasch abnimmt. So können z.B. einige der beim Abbau der Glucose bzw. Xylose gebildeten Vorstufen mit Aminosäuren Pyrazine bilden, die gemäß der „Las-Vegas-Hypothese“ (Kap. 1.2.2) zu HAAs weiterreagieren. Heinzler [127] untersuchte die Bildung von Pyrazinen aus Amadori-Verbindungen, die aus reduzierenden Zuckern und Aminosäuren gebildet werden und die die

erste Stufe der Maillard-Reaktion darstellen. Bei höheren Temperaturen reagieren diese unter Wasserabspaltung und Fragmentierung rasch zu den von Frandrup-Kuhr untersuchten Zuckerabbauprodukten weiter. Mit zunehmender Temperatur nimmt dabei auch die Anzahl der Abbau- und Folgeprodukte der Maillard-Reaktion zu. Heinzlers Untersuchungen belegen, dass die Bildung der Pyrazine parallel zum Abbau der Amadoriverbindungen erfolgt. Unter Röstbedingungen wurde von Heinzler aber auch dann noch eine Zunahme der Pyrazine beobachtet, als die Amadori-Verbindungen schon abgebaut waren.

Des Weiteren wird für die Bildung der HAAs Stickstoff aus einer Aminosäure, in unseren Modellen Glycin, benötigt. Glycingebundener Stickstoff und reduzierende Zucker können aber bei fortschreitender Reaktionszeit zu stabileren Verbindungen, z.B. Melanoidinen weiterreagieren, die nicht mehr in der Lage sind, zur HAA-Bildung beizutragen.

Betrachtet man die Reaktionsbedingungen Temperatur, aw-Wert und Reaktionszeit, so ist die Temperatur bei der Bildung der HAAs sowohl in den Glucose als auch Xylose enthaltenden Modellsystemen von größter Bedeutung. Andererseits ist der Temperatureinfluss und die Wirkung anderer reaktionsbeschleunigender Einflussgrößen bei der Verwendung der Xylose deutlich geringer als bei der Verwendung von Glucose.

Hieraus ergeben sich bisher folgende Überlegungen zur Verringerung der HAA-Bildung:

1. Bei der Zubereitung von Lebensmitteln und bei der Herstellung von Reaktionsaromen wäre zwar eine Verringerung der HAA-Bildung grundsätzlich durch eine Erniedrigung der Temperatur möglich. Die Begrenzung dieser Maßnahme liegt jedoch darin, dass erst bei Temperaturen von über 170 °C Grill- und Bratenaromen in größeren Mengen gebildet werden; bei diesen Temperaturen erreicht jedoch die HAA-Bildung ihr Maximum in nur wenigen Minuten.
2. Für die Bildung der spezifischen Aromakomponenten in Fleisch sind in erster Linie die Aminosäurezusammensetzung und die Temperatur verantwortlich. Zu hohe Zuckermengen würden zu fehlerhaften Aromanoten wie z.B. süß und karamellartig führen. Bei sehr hohen Temperaturen, unter Röstbedingungen, kann das Röstprodukt unter Verwendung von sehr hohen Zuckermengen sogar „verbrannt“ schmecken. Bei einem mindestens dreifachen molaren Zuckerüberschuss zum vorliegenden Kreatinin ist zwar mit einer verminderten HAA-Bildung zu rechnen, das dabei entstehende Aroma hingegen

kann bei derartigen Zuckermengen vom Verbraucher als negativ empfunden werden.

3. Beim Einsatz von Xylose wurden in wasserarmen Modellen unter allen untersuchten Bedingungen immer deutlich weniger HAAs gebildet als bei der Verwendung von Glucose. Die Verwendung von Xylose anstelle von Glucose wäre somit eine Alternative zur Vermeidung der HAA-Bildung bei der Herstellung von Reaktionsfleischaromen.
4. Da der Kreatin(in)gehalt entscheidend für die gebildete Menge an HAAs ist, sind Fleischextrakte mit niedrigem Kreatin(in)gehalt bevorzugt zu verwenden.

3.2.5 Vergleich der Reaktionsweise reduzierender Zucker bei der HAA-Bildung

Aufgrund der bisherigen Untersuchungsergebnisse stellte sich uns die Frage, wie die HAA-Bildung bei der Verwendung anderer reduzierender Monosacharide als Glucose und Xylose erfolgen würde. Unsere bisherigen Untersuchungen haben ergeben, dass eine Pentose (Xylose) deutlich weniger HAAs bildete als eine Hexose (Glucose). Des Weiteren gingen wir davon aus, dass unter den von uns gewählten wasserarmen Reaktionsbedingungen neben der Aminosäure auch die Kettenlänge des Zuckers dafür verantwortlich ist, welche HAAs gebildet werden, da in unseren Untersuchungen bei Verwendung von Xylose als Pentose und Glucose als Hexose unterschiedliche Produktspektren an HAAs entstehen (Kap. 3.2.1 Abb. 35 bis 38), obwohl gemäß der gängigen „Las-Vegas-Hypothese“ (Kap. 1.2.2, Abb. 8a) lediglich die Aminosäuren für das Produktspektrum der gebildeten HAAs verantwortlich sein sollten. In den meisten Untersuchungen (Kap. 3.1.1; Tabelle 8) wurde Glucose als reduzierender Zucker in Kombination mit verschiedenen Aminosäuren verwendet. In den Untersuchungen von Nyhammar [34] zu den Reaktionswegen der HAA-Bildung und denjenigen von Schuirmann [43] zu den Einflüssen der Reaktionsbedingungen auf die HAA-Bildung wurde neben der Glucose auch Fructose eingesetzt. Dabei wurde festgestellt, dass sich beide Zucker bei der HAA-Bildung nahezu identisch verhalten. Folglich scheint es unerheblich für die HAA-Bildung zu sein, ob es sich bei dem verwendeten Zucker um eine Aldose oder eine Ketose handelt. Da Schuirmann in seinen Untersuchungen zwar die Bildung von MeIQx beschrieben hat, aber auf die Bildung von 7,8-DiMeIQx und 4,8-DiMeIQx nicht näher einging, wollten wir neben der Glucose den Einfluss der Fructose auf die Bildung unterschiedlicher HAAs in wasserarmen Systemen untersuchen.

Aus unseren Untersuchungen geht hervor, dass die Kettenlänge des an der HAA-Bildung beteiligten Zuckers einen erheblichen Einfluss auf die HAA-Bildung hat. Diese These sollte in den folgenden Versuchen bestätigt werden, indem wir neben der Xylose die Diastereomeren Arabinose und Ribose als Edukte zur HAA-Bildung einsetzten. Da in den ersten Schritten der Maillard-Reaktion α -Dicarbonylverbindungen in Form von Desoxyosonen gebildet werden (Kap. 1.2.2, Abb. 6), über die der Strecker Abbau der Aminosäuren erfolgt (Kap. 1.2.2, Abb. 7), haben wir zum Vergleich auch das Reaktionsverhalten von 2-Desoxyzuckern hinsichtlich der HAA-Bildung untersucht. Hierbei verwendeten wir 2-Desoxyglucose und 2-Desoxyribose, da diese keine α -Dicarbonylstruktur bilden können und damit keine Strecker-Reaktion mit Aminosäuren eingehen können. Durch diese Untersuchungen sollte die Bedeutung des Strecker-Abbaus von Aminosäuren für die HAA-Bildung unterstrichen werden.

Des Weiteren entstehen während des Strecker Abbaus Aminoketone (Kap. 1.2.2, Abb. 7), die zu Pyrazinen weiterreagieren können. Pyrazine und Streckeraldehyde bilden dann bei Anwesenheit von Kreatinin nach der Las-Vegas-Hypothese“ die entsprechenden HAAs (Kap. 1.2.2, Abb.8a)

Die verwendeten Mengen an reduzierenden Zuckern, von Glycin und Kreatinin wurden in den von uns hergestellten Modellsystemen wiederum so gewählt, dass sich ein Molmengenverhältnis von 0,5 : 1 : 1 ergab, da hier die maximale Bildung von MeIQ_x erfolgt (Kapitel 3.2.1). Einheitlich wurde ein aw-Wert von 0,75 gewählt. Zur Kontrolle wurde ein zuckerfreies Modell unter identischen Bedingungen hergestellt.

Hierbei haben wir uns dafür entschieden, unsere Modelle auf der Basis der Herstellung von Reaktionsaromen zu erhitzen, also unter den Bedingungen der Niedertemperatur-Langzeit-Erhitzung und der Hochtemperatur-Kurzzeit-Erhitzung. Aus den vorangegangenen Untersuchungen geht hervor, dass bei einem aw-Wert von 0,75 das Maximum der MeIQ_x-Bildung bei einer Erhitzungstemperatur von 125 °C nach 6 Stunden und bei einer Erhitzungstemperatur von 160 °C bereits nach einer Stunde erreicht wird (Kapitel 3.2.2). Die meisten Vergleichswerte aus unseren vorangegangenen Untersuchungen lagen uns bei einer Temperatur von 125 °C vor. Daher haben wir uns zunächst statt einer Hochtemperatur-Kurzzeit-Erhitzung, die erst ab 150 °C beginnt, für eine Niedertemperatur-Langzeit-Erhitzung bei 125 °C für 6 Stunden entschieden. Für die Modelle auf Basis der Hochtemperatur-Kurzzeiterhitzung haben wir eine Erhitzungsdauer von einer Stunde und eine Temperatur von 160 °C gewählt, da bei dieser Temperatur die maximale MeIQ_x-Bildung in weniger als einer Stunde erfolgt (Kap. 3.2.4).

Aus Abb. 53 geht hervor, dass sich bei Verwendung Glucose und Fructose unter den Bedingungen der Niedertemperatur-Erhitzung die gebildeten Mengen an HAAs, bestehend aus MeIQx und 7,8-DiMeIQx, nur geringfügig voneinander unterscheiden. Wird hingegen 2-Desoxyglucose verwendet, so ist die nachgewiesene Menge an HAAs wesentlich geringer. Vergleicht man das Ergebnis der HAA-Bildung unter Verwendung der 2-Desoxyglucose mit dem Kontrollwert ohne Zucker, so erkennt man, dass hier der Zuckerzusatz nur zu einer geringfügigen Zunahme der HAA-Bildung führt. Im Vergleich mit den Hexosen Glucose und Fructose wird bei der Verwendung von 2-Desoxyglucose wesentlich weniger MeIQx gebildet, woraus hervorgeht, dass die beim Abbau von Glucose und Fructose entstehende α -Dicarbonylfunktion für die Bildung der HAAs ganz wesentlich ist.

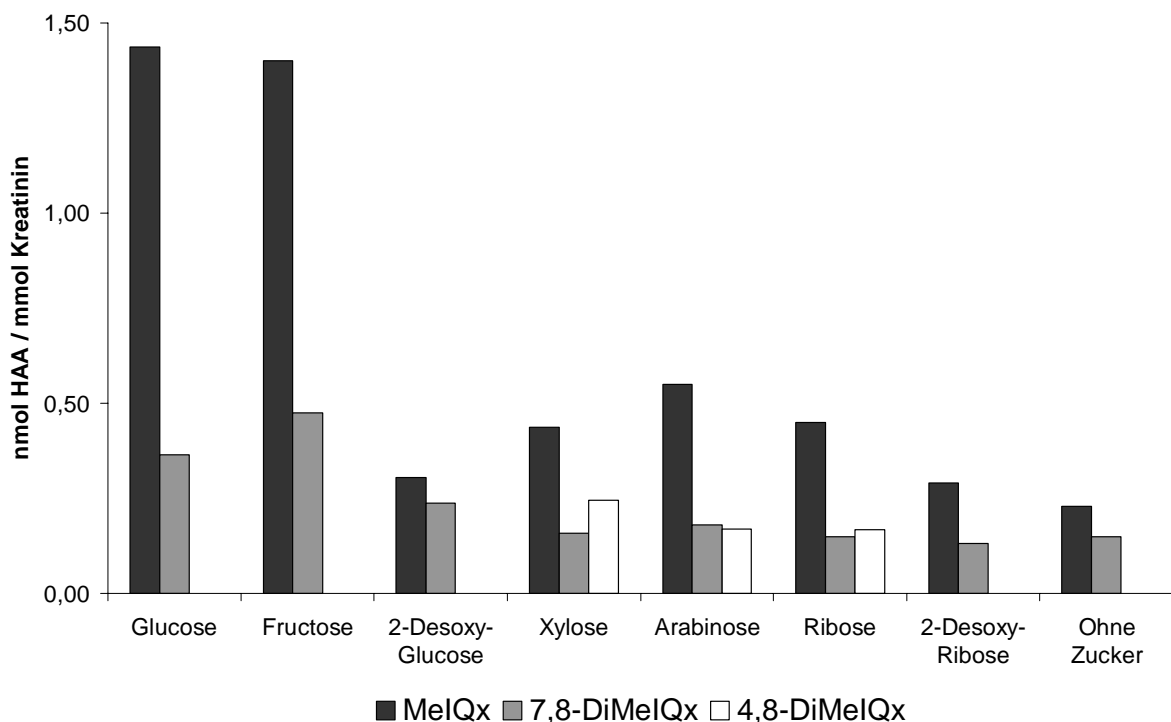


Abb. 53 HAA-Bildung in einem Modellsystem aus reduzierenden Zuckern, Glycin und Kreatinin in den Molmengenverhältnissen 0,5 : 1 : 1; Kontrollmodell ohne Zuckerzusatz; aw-Wert 0,75; Temperatur 125 °C; Trockenschrank; Erhitzungsdauer 6 h

Bei der Verwendung der Diastereomeren Xylose, Arabinose und Ribose wird, wie zu erwarten, neben MeIQx und 7,8-DiMeIQx auch 4,8-DiMeIQx gebildet. Die mit den eingesetzten Pentosen gebildeten Mengen an HAAs unterscheiden sich aber dabei kaum voneinander. Wird hingegen 2-Desoxyribose verwendet, können nur MeIQx und 7,8-

DiMeIQx nachgewiesen werden. Die gebildeten Mengen unterscheiden sich hier wiederum kaum vom zuckerfreien Kontrollmodell. Die gebildete Menge an HAAs ist im Vergleich mit allen anderen untersuchten Zuckern am geringsten.

Aus Abb. 54 geht hervor, dass sich Glucose und Fructose auch unter den Bedingungen der Hochtemperatur-Kurzzeit-Erhitzung wiederum kaum in der HAA-Bildung unterscheiden. Unter diesen Bedingungen kann neben MeIQx und 7,8-DiMeIQx sowohl beim Einsatz von Glucose als auch von Fructose 4,8-DiMeIQx nachgewiesen werden. Bei der Verwendung von 2-Desoxyglucose sind auch unter den hier gewählten Bedingungen die gebildeten Mengen an HAAs wiederum deutlich geringer als bei der Verwendung von Glucose und Fructose; sie unterscheiden sich allerdings etwas stärker vom Kontrollmodell ohne Zucker.

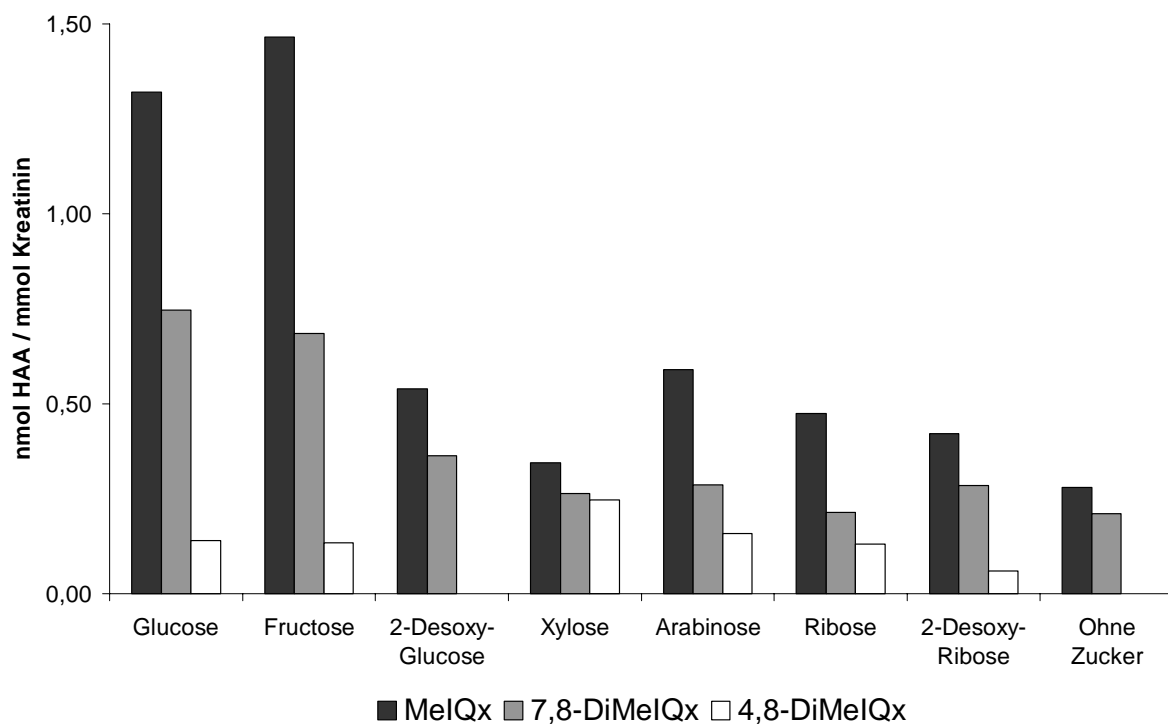


Abb. 54 HAA-Bildung in Modellsystemen aus reduzierenden Zuckern, Glycin und Kreatinin in den Molmengenverhältnissen 0,5 : 1 : 1; Kontrollmodell ohne Zuckerzusatz; aw-Wert 0,75; Temperatur 160 °C; Trockenschrank; Erhitzungsdauer 1 h

Vergleicht man die Pentosen Xylose, Arabinose, Ribose und 2-Desoxyribose hinsichtlich der HAA-Bildung unter den Bedingungen der Hochtemperatur-Erhitzung, so stellt man fest, dass sich auch hier die HAA-Bildung nahezu ähnlich verhält und deutlich niedriger ist als bei der Verwendung von Glucose oder Fructose (vgl. Abb. 53).

Im Vergleich der Abbildungen 53 und 54 ist durch eine Erhöhung der Temperatur insbesondere die Bildung von 7,8-DiMeIQx und 4,8-DiMeIQx begünstigt (Vergleich Kap. 3.2.2., Abb. 43 und 44).

Durch unsere Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass die Verwendung von Glucose und Fructose zu nahezu identischen Ergebnissen bei der HAA-Bildung führt. Ob es sich bei dem verwendeten Zucker um eine Aldose oder Ketose handelt, scheint somit nur von untergeordneter Bedeutung bei der HAA-Bildung zu sein. Hingegen wird durch unsere Untersuchungen deutlich, dass die Bildung von HAAs beim Einsatz von Pentosen wie Arabinose, Ribose oder Xylose gegenüber der Verwendung von Hexosen generell vermindert ist und somit von der Kettenlänge des verwendeten Zuckers abhängt.

Bei der Verwendung von 2-Desoxyzuckern ist eine wesentlich geringere HAA-Bildung zu beobachten als bei den anderen Zuckern entsprechender Kettenlänge. Besonders auffällig ist dies bei der Verwendung der 2-Desoxyglucose im Vergleich mit Glucose und Fructose.

Aus unseren Untersuchungen geht hervor, dass die Struktur des verwendeten reduzierenden Zuckers einen entscheidenden Einfluss auf die Art und die gebildete Menge der HAAs hat. Eine Reduzierung der HAA-Bildung kann im Allgemeinen durch den Einsatz einer Pentose anstelle einer Hexose erreicht werden.

3.2.6 Untersuchung der HAA-Bildung in wasserarmen Modellsystemen bei Verwendung von Alanin

Unsere Untersuchungen beschäftigten sich mit einem Teilaspekt der HAA-Bildung, da wir nur Glycin als Aminosäure verwendet haben. Nach der „Las-Vegas-Hypothese“ von Jägerstad (Kap. 1.2.2, Abb.8a) geht man davon aus, dass die Aminosäure für die jeweilige Art der gebildeten IQ- und IQx-Verbindung verantwortlich ist. Aus Glycin kann nach der gängigen Hypothese bei Anwesenheit eines reduzierenden Zuckers und Kreatinin MeIQx (Kap. 3.2.1, Abb. 39a) und 7,8-DiMeIQx (Kap. 3.2.1 Abb. 39b) entstehen, während aus Alanin 4,8-DiMeIQx gebildet werden kann (Kap. 3.2.1, Abb.39c). Aus unseren Untersuchungen geht darüber hinaus hervor, dass auch die Kettenlänge des verwendeten Zuckers einen entscheidenden Einfluss auf die jeweilige Art und Menge der gebildeten IQ- und IQx-Verbindung hat (Kap. 3.2.5). Die Bildung von 4,8-DiMeIQx wurde von uns bei Verwendung von Glycin als Aminosäure und einer Pentose als reduzierendem Zucker schon bei niedrigeren Erhitzungstemperaturen als beim Einsatz von Glucose beobachtet (Kapitel

3.2.2 und 3.2.5). Hingegen wurde hierbei im Vergleich zu einer Hexose deutlich weniger MeIQx gebildet. Wie bereits erwähnt (Kap. 3.2.2), konnten Skog & Jägerstad [135] bei der Verwendung von Glucose und Glycin 4,8-DiMeIQx nur in Spuren nachweisen.

Grivas [136] verwendete Fructose, Alanin und Kreatinin in einem Modellsystem, bei dem er die Verbindungen unter Rückfluss in einem Diethylenglykol-Wasser Gemisch (5 : 1) bei einer Temperatur von 125 – 128 °C 2 Stunden lang erhitzte (Kap 3.1, Tabelle 8). Dabei konnte er bis zu 2,6 nmol 4,8-DiMeIQx pro mmol Kreatinin nachweisen. Muramatsu & Matsushima [137] konnten bei alaninhaltigen Modellen unter Rückfluss bei der Verwendung von Glucose bis zu 4,2 nmol 4,8-DiMeIQx pro mmol Kreatinin und bei der Verwendung von Ribose bis zu 1,5 nmol pro mmol Kreatinin nachweisen. Die größten Mengen an 4,8-DiMeIQx wurden aber bemerkenswerterweise nicht bei Verwendung von Alanin beobachtet, sondern in Modellsystemen mit Tyrosin und Glucose [138], wo bis zu 30 nmol 4,8-DiMeIQx pro mmol Kreatinin gefunden wurden, sowie in Modellsystemen mit Ribose und Lysin [137], wo bis zu 26 nmol 4,8-DiMeIQx pro mmol Kreatinin nachgewiesen wurden (Kap. 3.1 Tabelle 8). Bei den beschriebenen Modellansätzen wurden keine wasserarmen Bedingungen wie bei unseren Untersuchungen ausgewählt, sondern unter Rückfluss in Wasser oder Diethylenglykol erhitzt.

Bei einer genaueren Betrachtung der oben beschriebenen Untersuchungen und unter Berücksichtigung der von uns durchgeführten Versuche ist mit Hilfe der „Las-Vegas-Hypothese“ nicht immer eine Vorhersage bezüglich der Art der gebildeten HAAs möglich. Eine Abschätzung der HAA-Bildung bei der Zubereitung von Lebensmitteln und der Herstellung von Reaktionsaromen ist aber aus der Sicht des vorbeugenden Verbraucherschutzes notwendig. Der Gesetzgeber sieht zudem vor, dass Reaktionsaromen nach redlichem Herstellungsbrauch hergestellt werden [125]. Aufgrund der oben beschriebenen Untersuchungsergebnisse und Überlegungen war es für uns von Interesse, auf den Verlauf der HAA-Bildung unter Verwendung von Alanin anstelle von Glycin näher einzugehen.

Analog zu den Glycin enthaltenden Modellen verwendeten wir Avicel als Trägermatrix. Das molare Verhältnis von Alanin zu Kreatinin betrug einheitlich 1 : 1. Der aw-Wert wurde auf 0,75 eingestellt, die Erhitzungstemperatur betrug 125 °C bei einer Erhitzungsdauer von 6 Stunden im Trockenschrank. Exemplarisch wurden wieder Glucose und Xylose als reduzierende Zucker verwendet, um eine Vergleichbarkeit mit den glycinhaltigen Modellen zu ermöglichen.

Aus den Abbildungen 55 und 56 geht hervor, dass bei der Verwendung von Alanin auch ohne Anwesenheit eines reduzierenden Zuckers bereits MeIQx gebildet wird, obwohl

MeIQx nach der „Las-Vegas-Hypothese“ nicht aus Alanin, sondern aus Glycin gebildet wird und ein reduzierender Zucker bei der Reaktion anwesend sein sollte (Kap. 1.2.2).

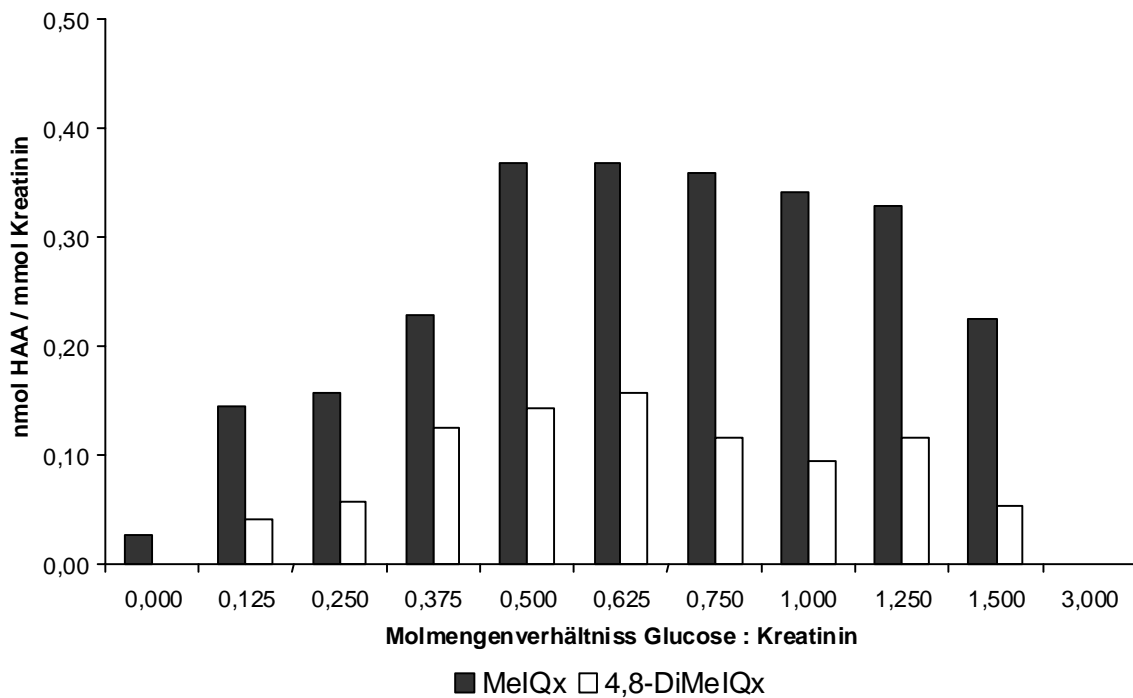


Abb. 55 Einfluss der molaren Verhältnisse Glucose : Kreatinin auf die HAA-Bildung in einem wasserarmen Modellsystem; Alanin : Kreatinin (1 : 1); 125 °C; 6 h im Trockenschrank; aw=0,75; verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml; verschlossen

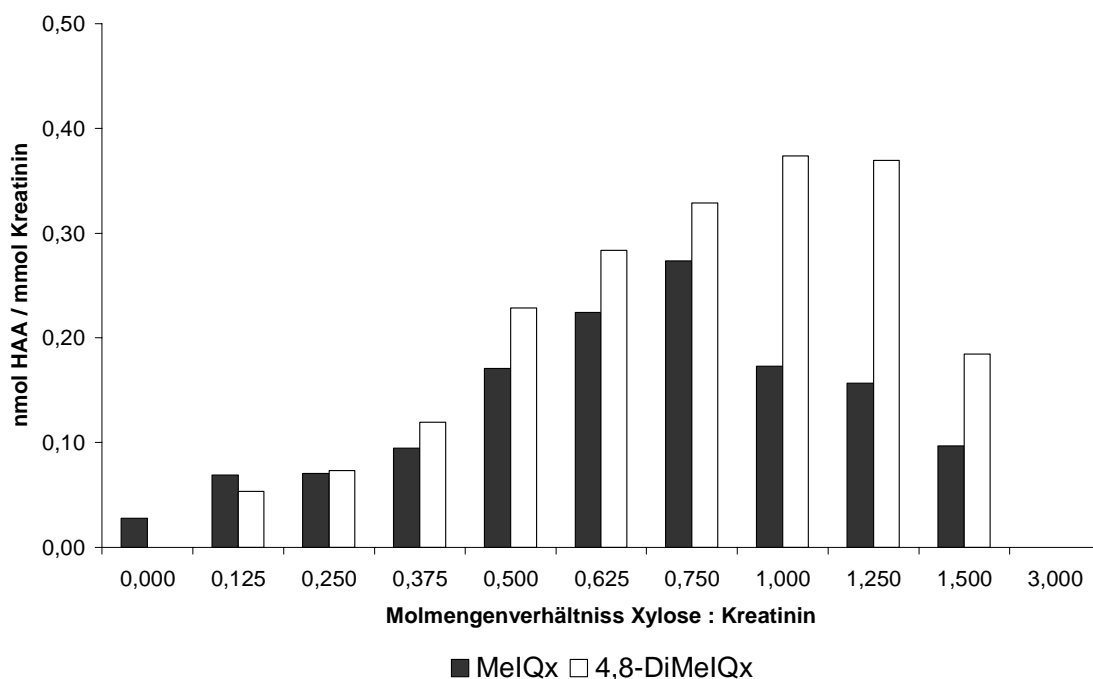


Abb. 56 Einfluss der molaren Verhältnisse Xylose : Kreatinin auf die HAA-Bildung in einem wasserarmen Modellsystem; Alanin : Kreatinin (1 : 1); 125 °C; 6 h im Trockenschrank; aw=0,75; verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml; verschlossen

Die dabei gebildete Menge liegt aber nur bei etwa 0,02 bis 0,03 nmol pro mmol Kreatinin. Bei der Verwendung von Glycin beträgt die gebildete Menge an MeIQx unter den gleichen Bedingungen und unter Ausschluss eines reduzierenden Zuckers 0,1 bis 0,3 nmol pro mmol Kreatinin (Kap. 3.2.1). Andere HAAs wurden bei der Verwendung von Alanin, ohne Anwesenheit eines Zuckers, nicht nachgewiesen.

Bei der Verwendung von Glucose (Abb. 55) steigt die HAA-Bildung bis zu einem Molmengenverhältnis von Glucose zu Kreatinin von 0,5 an und verändert sich kaum bis zu einem Molmengenverhältnis von 1,25. Die dabei nachgewiesenen HAAs waren MeIQx als Hauptkomponente und 4,8-DiMeIQx als Nebenkomponekte. Dies ist bemerkenswert, da eigentlich aufgrund der gängigen Thesen zur HAA-Bildung (Kap. 1 und Kap 3.2.1 Abb. 39c) 4,8-DiMeIQx die Hauptkomponente sein sollte. Dieses wird auch durch die in der Tabelle 8 (Kapitel 3.1) beschriebenen Ergebnisse ersichtlich. So konnten Muramatsu und Matsushima [137] in einem Modellsystem aus Alanin und Glucose unter Rückfluss bis zu 0,9 nmol MeIQx und bis zu 4,2 nmol 4,8-DiMeIQx pro mmol Kreatinin nachweisen. Das Ergebnis von Muramatsu und Matsushima, dass bei Anwesenheit von Alanin 4,8-DiMeIQx die Hauptkomponente ist, konnte in den von uns untersuchten Modellen, unter wasserarmen Bedingungen, nicht bestätigt werden. Zwar ist MeIQx bei der Verwendung von Glucose und Alanin die Hauptkomponente der gebildeten HAAs, dennoch wird in Gegenwart von Alanin deutlich weniger MeIQx gebildet als beim Einsatz von Glucose und Glycin (vgl. Kap. 3.2.1, Abb. 36). Auch wird bei der Verwendung von Glucose und Glycin, anders als bei der Verwendung von Glucose und Alanin, 7,8-DiMeIQx gebildet (vgl. Kap. 3.2.1, Abb. 36). Ein Austausch einer Aminosäure kann somit zu unterschiedlichen HAAs führen.

Aus Abbildung 56 geht hervor, dass auch beim Einsatz von Xylose und Alanin die HAAs MeIQx und 4,8-DiMeIQx gebildet werden. Das Maximum der MeIQx-Bildung wird bei einem Molmengenverhältnis Xylose zu Kreatinin von 0,75 beobachtet, während das Maximum der 4,8-DiMeIQx-Bildung sogar erst bei einem Molmengenverhältnis Xylose zu Alanin von 1,0 erreicht wird. Bei der Verwendung von Xylose und Alanin ist 4,8-DiMeIQx die Haupt- und MeIQx die Nebenkomponekte der nachgewiesenen HAAs. Maximal werden dabei bis zu 0,4 nmol 4,8-DiMeIQx und bis zu 0,3 nmol MeIQx pro mmol Kreatinin nachgewiesen. Beim Einsatz von Xylose und Glycin wurden in unseren Untersuchungen in gleicher Weise bis zu 0,4 nmol 4,8-DiMeIQx und bis zu 0,3 nmol MeIQx pro mmol Kreatinin nachgewiesen (Kap. 3.2.1). Frandrup-Kuhr untersuchte den Einfluss von Zuckerabbauprodukten auf die HAA-Bildung. Dabei konnte er bei Verwendung von Furfural, welches aus Pentosen entsteht, eine fördernde Wirkung auf die Bildung von 4,8-DiMeIQx

feststellen. Auch konnten wir bei Abwesenheit eines reduzierenden Zuckers, gleichgültig unter welchen Bedingungen, nie die Bildung von 4,8-DiMeIQx beobachten. Auch ein Austausch von Glycin durch Alanin führt bei Verwendung von Xylose zu identischen Gehalten an 4,8-DiMeIQx.

Die Bildung von 7,8-DiMeIQx ist hingegen stark abhängig von der vorliegenden Aminosäure und ist nur in den Glycin enthaltenden Modellen, selbst bei Abwesenheit eines reduzierenden Zuckers, beobachtet worden. 7,8-DiMeIQx wird unabhängig davon gebildet, ob eine Hexose oder eine Pentose vorliegt (Kap. 3.2.5). Während die Bildung von MeIQx insbesondere durch die Anwesenheit von Glucose gefördert wird (Kap. 3.2.1), hat die Temperatur den größten Einfluss auf die Bildung von 4,8-DiMeIQx (Kap. 3.3.2).

Eine Erklärung, warum 4,8-DiMeIQx unter hohen Erhitzungstemperaturen auch bei der Verwendung von Hexosen und Glycin gebildet werden kann, könnte darin bestehen, dass mit steigender Temperatur neben der Bildung von Hydroxymethylfurfural (HMF) über Fragmentierungen der reduzierenden Zucker die Anzahl der daraus hervorgehenden Verbindungen wie z.B. Furfural zunimmt und dieses die 4,8-DiMeIQx-Bildung fördert [123].

Muramatsu und Matsushima [137] verwendeten alaninhaltige Modelle, bei denen Ribose als Pentose eingesetzt wurde. Die Modellmischung wurde von ihnen unter Rückfluss in Diethylenglykol/Wasser erhitzt (Kap. 3.1, Tabelle 8). Dabei wurde im Gegensatz zu unseren Untersuchungen mit Xylose in wasserarmen Modellen (vgl. Abb. 56) als Nebenkomponekte 1,5 nmol 4,8-DiMeIQx und als Hauptkomponente 1,8 nmol MeIQx pro mmol Kreatinin gebildet. Die gebildeten Mengen von 4,8-DiMeIQx und MeIQx stehen also hier bei Verwendung dieser Pentose etwa im Verhältnis 1 : 1.

Auch bei der Verwendung von Alanin anstelle von Glycin ist in unseren Untersuchungen ein ambivalentes Verhalten der reduzierenden Zucker auf die HAA-Bildung, wenn auch nicht so ausgeprägt (vgl. Kap. 3.2.1, Abb. 37 und 38), zu beobachten. Wie aus den Abbildungen 55 und 56 hervorgeht, steigt von niedrigen Zuckerkonzentrationen ausgehend die nachgewiesene Menge an HAAs mit Erhöhung der Zuckerkonzentration zunächst an, während sie bei höheren Zuckerkonzentrationen wieder abnimmt. Bei einem dreifachen molaren Überschuss des reduzierenden Zuckers zu Kreatinin sind auch bei Verwendung von Alanin als Aminosäure keine HAAs mehr nachweisbar.

Ein Austausch von Glycin durch Alanin bewirkt insbesondere, dass kein 7,8-DiMeIQx gebildet wird, die MeIQx-Bildung geringer ausfällt und dafür 4,8-DiMeIQx in den Glucosemodellen gebildet wird. Die Gesamtmenge aller nachgewiesener HAAs ist bei der Verwendung von Alanin geringer als bei der Verwendung von Glycin.

3.3 Untersuchungen zur Bildung von HAAs aus Zwischenstufen der Maillard-Reaktion

Gemäß der „Las-Vegas-Hypothese“ sind Methylpyridin bzw. Methylpyrazin, Strecker-aldehyd und Kreatinin Vorstufen für die Bildung der HAAs (Kap. 1.2.2 Abb. 8a). Bereits Lee [35] hatte 2-Methylpyridin, Kreatinin und Methylglyoxal in Diethylenglykol unter Rückfluss miteinander reagieren lassen und dabei IQ nachgewiesen. Da wir in den Glycin als Aminokomponente enthaltenden Xylosemodellen 4,8-DiMeIQ_x nachweisen konnten und dieser Befund nicht mit dem von Jägerstad vorgeschlagenen Reaktionsweg zu vereinbaren ist, haben wir verschiedene Pyrazine und Kreatinin wahlweise mit Formaldehyd oder Acetaldehyd in äquimolaren Verhältnissen in Wasser gelöst und entsprechend erhitzt, um zu überprüfen, ob 4,8-DiMeIQ_x tatsächlich nur aus Acetaldehyd gebildet werden kann, oder aber die Bildung unter gewissen Bedingungen auch bei Anwesenheit von Formaldehyd möglich ist. Da in den von uns vorher untersuchten Modellen nur Glycin eingesetzt wurde, war der einzige Strecker-aldehyd, der gebildet werden konnte, Formaldehyd. Mit diesem unter Einsatz von Formaldehyd durchgeführten Versuch soll untersucht werden, inwieweit Formaldehyd in einer Nebenreaktion 4,8-DiMeIQ_x bilden kann. Demgegenüber würde die Beteiligung von Acetaldehyd als dem Strecker-Abbauprodukt von Alanin in Übereinstimmung mit der „Las-Vegas-Hypothese“ 4,8-DiMeIQ_x als Hauptprodukt entstehen.

Es erhebt sich grundsätzlich die Frage, in wie weit die Strecker-aldehyde für die Art der gebildeten HAAs verantwortlich sind und ob der Reaktionsweg von Jägerstad (Kap. 1.2.2 Abb. 8a) nur einen Teilausschnitt der HAA-Bildung wiedergibt, da bei der Verwendung von Glycin die Bildung von 4,8-DiMeIQ_x in unseren wasserarmen Modellen zum Teil als Hauptprodukt nachgewiesen werden kann.

Zwangsläufig müsste dann neben dem von Jägerstad vorgeschlagenen Reaktionsweg noch ein weiterer, bisher unbekannter Reaktionsweg zur HAA-Bildung existieren.

Die Reaktion erfolgte in geschlossenen Gefäßen, da die Aldehyde, Pyridine und Pyrazine leicht flüchtig sind. Während 6 h bei 120 °C haben wir die Aldehyde, Pyridine bzw. Pyrazine und Kreatinin zusammen erhitzt, um herauszufinden, ob sie als Vorstufen für die Bildung von HAAs in Betracht kommen. Unter den genannten Bedingungen konnten jedoch keine HAAs nachgewiesen werden. An deren Stelle erhielten wir andere Verbindungen, die von uns weder in Modellsystemen noch in Reaktionsaromen nachgewiesen wurden und auch keiner uns bekannten Verbindung zugeordnet werden konnten. Beim Einsatz von Acetaldehyd, 2-Methylpyridin, 2-Methylpyrazin oder 2,5-Dimethylpyrazin und Kreatinin als

Vorstufen entstanden UV-aktive Substanzen mit einem Haupt- und Nebenmaximum bei 240 nm und 290 nm. Beim Einsatz von Formaldehyd, 2-Methylpyridin, 2-Methylpyrazin oder 2,5-Dimethylpyrazin und Kreatinin als Vorstufen wurden UV-aktive Substanzen mit einem Maximum bei 310 nm beobachtet. Die IQs und IQxs haben jedoch ein Maximum bei 265 nm, während die Maxima von PhIP bei 230 nm und 330 nm liegen. Auch bei der Verwendung eines elektrochemischen Detektors (Kap. 2.5.2.2), der zum Nachweis der elektroaktiven Aminoimidazochinoline (IQs) und -chinoxaline (IQxs) herangezogen werden kann, war kein Signal zu erkennen. Eine Überlagerung der gesuchten HAAs durch andere UV-aktive Substanzen konnte somit ausgeschlossen werden.

Nyhammar [34] schlug einen Reaktionsweg vor, bei dem die Streckeraldehyde zuerst mit Kreatinin reagieren und dann mit den Methylpyrazinen bzw. Methylpyridinen zu den HAAs weiterreagieren (Kap. 1.2.2, Abb. 8b). Wir haben deshalb die Reaktionsschritte getrennt. Im ersten Ansatz wurde jeweils nur ein Teil der Reaktanden, nämlich Pyridine bzw. Pyrazine mit den Aldehyden, Pyrazine bzw. Pyridine mit Kreatinin und die Aldehyde mit Kreatinin in geschlossene Gefäße gegeben und 6 h bei 120 °C erhitzt. Im nächsten Schritt wurden diese ersten Reaktionsansätze mit der jeweils fehlenden Vorstufe versetzt und ein zweites Mal 6 h bei 120 °C erhitzt. Auch hier wurden keine HAAs nachgewiesen.

3.4 Untersuchung der Bildung von HAAs bei der Verwendung von Arginin anstelle von Kreatinin

Da inzwischen Veröffentlichungen zu Lebensmitteln vorliegen, die weder Kreatin noch Kreatinin enthalten, in denen aber dennoch HAAs nachgewiesen werden konnten, wurde in Betracht gezogen, ob HAAs auch unter Beteiligung von „Guanidino“-Komponenten wie z.B. Arginin gebildet werden können [46].

In Anlehnung an unsere vorangegangenen Untersuchungen wollten wir uns auf Modellsysteme beschränken, in denen Glycin und Arginin im molaren Verhältnis von 1 : 1 und in denen Glucose, Glycin und Arginin im molaren Verhältniss von 0,5 : 1 : 1 vorlagen. Die Komponenten wurden auf Avicel aufgetragen und der aw-Wert auf 0,75 eingestellt. Die Erhitzung erfolgte zum einen sechs Stunden bei 120 °C und zum anderen eine Stunde bei 150 °C in geschlossenen Gefäßen. In keinem der von uns untersuchten wasserarmen Modelle konnten HAAs nachgewiesen werden.

3.5 Untersuchung der Bildung von HAAs bei der Verwendung von Ammoniumionen anstelle von Aminosäuren

In unseren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass entgegen der gängigen Bildungshypothese von Jägerstad (Kap 1.2.2, Abb. 8a) neben den Aminosäuren die Art der reduzierenden Zucker einen Einfluss auf die Art der gebildeten HAAs hat (Kap. 3.2.5).

Aus den reduzierenden Zuckern und Aminosäuren entstehen Methylpyridine bzw. -pyrazine und Streckeraldehyde, aus denen gemäß der Bildungshypothese von Jägerstad HAAs gebildet werden (Kap. 1.2.2, Abb. 8a). Wir haben den Einfluss dieser Vorstufen auf die HAA-Bildung untersucht, konnten dabei aber keine HAA-Bildung feststellen (Kap. 3.3).

Frandrup-Kuhr [123] verwendete uniform ^{13}C -markierte Glucose, Glycin und Kreatinin in den Molmengenverhältnissen 0,5 : 1 : 1 in wasserarmen Modellsystemen und konnte dabei nach Erhitzung die Bildung von MeIQx sowohl mittels LC-MS (Kap. 2.7) als auch nach Derivatisierung mittels GC-MS (Kap. 2.6) beobachten. Die Masse des aus der isotopenmarkierten Glucose gebildeten MeIQx war um genau 7 Einheiten höher als bei käuflichem MeIQx. Nach der von Jägerstad postulierten Bildungshypothese dürfte die Masse aber nur um maximal 6 Einheiten erhöht sein, da zumindest ein Kohlenstoffatom dem Glycin bzw. dem durch die Strecker-Reaktion gebildeten Formaldehyd entstammen müsste.

Aus den oben genannten Gründen ist es also naheliegend, dass zumindest unter wasserarmen Bedingungen, im Maximum der HAA-Bildung (Kap. 3.2.1, Abb. 36), die durch die Strecker-Reaktion gebildeten Aldehyde keinen wesentlichen Einfluss auf die HAA-Bildung haben können, sondern in erster Linie die Glucose bzw. die aus ihr durch die Maillard-Reaktion hervorgehenden Abbauprodukte wie z.B. Methylglyoxal. Dennoch sind die Aminosäuren, wie zahlreiche Untersuchungen belegen (Kap. 3.1 Tabelle 8), maßgeblich an der Bildung von HAAs beteiligt. Des Weiteren konnte auch bei Abwesenheit von reduzierenden Zuckern die Bildung von HAAs beobachtet werden (Kap. 3.1, Tabelle 8), was auch durch unsere Untersuchungen bestätigt wurde (Kap. 3.2.1, 3.2.5 und 3.2.6). Unumstritten ist auch, dass die Aminosäuren für die Bildung von Methylpyridinen und -pyrazinen verantwortlich sind, da sie als Stickstoffquelle benötigt werden (Kap. 1.2.2, Abb. 7).

Die Bildung von Methylpyridinen und -pyrazinen kann in Gegenwart von reduzierenden Zuckern statt aus Aminosäuren auch aus Ammoniumionen erfolgen. Der wesentliche Unterschied ist aber, anders als bei der Verwendung von Aminosäuren, dass

hierbei keine Streckeraldehyde entstehen. Auch wurde von Iowaka [120] die Bildung mutagener Artefakte bei Anwesenheit von Ammoniumionen beobachtet.

Ausgehend von unseren Untersuchungen (Kap. 3.2.5, 3.2.6 und 3.3) und denen von Frandrup-Kuhr [123] war es somit naheliegend, dass HAAs unter wasserarmen Bedingungen auch bei Anwesenheit von Ammoniumionen neben reduzierenden Zuckern und Kreatinin gebildet werden können und insbesondere die Kettenlänge des reduzierenden Zuckers für die Art des gebildeten HAAs verantwortlich ist (Kap. 3.2.5).

In unseren Untersuchungen haben wir deshalb Glucose bzw. Xylose, Ammoniumchlorid bzw. Ammoniumacetat und Kreatinin in den Molmengenverhältnissen 0,5 : 1 : 1 auf Avicel aufgetragen, den aw-Wert auf 0,75 eingestellt und 6 Stunden bei 120 °C in geschlossenen Gefäßen erhitzt. In keiner der von uns untersuchten Proben konnten wir jedoch die Bildung von HAAs beobachten.

4 Einfluss der Ascorbinsäure auf die HAA-Bildung

4.1 Einleitung

Da die Bildung der HAAs über Streckeraldehyde verläuft (Kap. 1.2.2), wurde von Johansson [47] der Einfluss von Speiseölen in Modellsystemen aus Glucose, Glycin, Kreatinin in einem Molmengenverhältnis von 0,5 : 1 : 1 in Anwesenheit geringer Mengen an Eisensulfat untersucht. Dabei ging Johansson davon aus, dass die bei der Lipidoxidation entstehenden Aldehyde entsprechend dem Bildungsschema für die HAAs deren Bildung fördern würden. Falls aus der Lipidoxidation stammende Aldehyde die HAA-Bildung fördern sollten, würden reduzierend und antioxidativ wirkende Verbindungen wie Ascorbinsäure die Bildung von HAAs unterdrücken. Die auf die HAA-Bildung hemmende Wirkung von reduzierenden bzw. antioxidativen Verbindungen und Radikalfängern wurde auch durch verschiedene Untersuchungen bestätigt, wobei aber auch häufig ein ambivalentes Verhalten beobachtet wurde [47]. Demgegenüber führen radikalbildende Verbindungen zu einer Erhöhung der HAA-Bildung. In Modellsystemen aus Glycin, Glucose, Kreatinin und Speiseöl, die in geschlossenen Gefäßen bei 180 °C erhitzt wurden, förderten Eisenionen die HAA Bildung. Bei einem Zusatz von Antioxidantien wurde von Johansson wider Erwarten eine erhöhte Bildung von HAAs in Modellsystemen beobachtet. Die Ascorbinsäure zeigte ein unterschiedliches Verhalten. Bei einem Ascorbinsäurezusatz von 10 ppm war lediglich eine geringfügige Erhöhung der MeIQ_x- Bildung zu beobachten, während bei 100 ppm keine und bei 1000 ppm eine deutliche Erniedrigung um 80%, im Vergleich zum ascorbinsäurefreien Kontrollmodell erfolgte. Andere Antioxidantien zeigten dagegen kein derartiges Verhalten bezüglich der Unterdrückung der HAA-Bildung, sondern förderten zum Teil die MeIQ_x- Bildung deutlich. Dass somit nur die reduzierende Wirkung der Ascorbinsäure die Hauptursache für die Unterdrückung der HAA-Bildung sein soll, erscheint somit als fragwürdig.

Vollenbröker [46] untersuchte den Einfluss der Ascorbinsäure im Rahmen der Herstellung von Reaktionsaromen, da Ascorbinsäure bei deren Herstellung verwendet wird und bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen allgemein als Zusatzstoff eingesetzt werden darf.

Dabei wurden 3 g Fleischextrakt mit 600 mg Ascorbinsäure versetzt, der Wassergehalt auf 65% eingestellt und der so behandelte Fleischextrakt 6 h bei 120 °C erhitzt. In diesem Reaktionsaroma war im Vergleich zu den Modellen von M. Johansson kein reduzierender

Zucker vorhanden. Im Vergleich zu erhitztem Fleischextrakt erhöhte sich die MeIQx-Bildung durch den Ascorbinzusatz um 50%.

Schoch [135] untersuchte den Einfluss eines Zusatzes von Ascorbinsäure auf die HAA-Bildung in Fleisch und Fleischerzeugnissen. Dabei konnte er teils eine fördernde, teils eine hemmende Wirkung auf die HAA-Bildung beobachten.

Bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen und Reaktionsaromen ist also aufgrund der Beobachtungen von Johansson [47], Vollenbröcker [46] und Schoch [135] mit einem Einfluss der Ascorbinsäure auf die HAA-Bildung zu rechnen.

Ascorbinsäure wird bei erhöhter Temperatur abgebaut. Deren Abbauprodukte sind z.B. 2,3-Diketogulonsäure, Xyloson, 4-Desoxypentose, Ethylglyoxal, Methylglyoxal, Diacetyl sowie verschiedene Reduktone. Ascorbinsäure kann im Rahmen der Maillard-Reaktion mit Aminosäuren direkt oder über ihre Abbauprodukte reagieren (Abb. 57).

Der Abbau der Ascorbinsäure kann sowohl oxidativ als auch nichtoxidativ erfolgen (Abb. 58), wobei der oxidative Abbau rascher erfolgt und von den Schwermetallionen Kupfer und Eisen katalysiert wird. Die während des Ascorbinsäureabbaus entstehenden Abbauprodukte werden auch von reduzierenden Zuckern beim Erhitzen während der Maillard-Reaktion gebildet.

Beim oxidativen Abbau der Ascorbinsäure entstehen bevorzugt Methylglyoxal, Diacetyl und Ethylglyoxal (Abb. 58). Der Einfluss dieser drei Verbindungen auf die HAA-Bildung wurde auch von Frandrup-Kuhr [123] untersucht. Nach dessen Untersuchungen fördert Methylglyoxal unter wasserarmen Bedingungen und bei Anwesenheit von Glycin und Kreatinin die MeIQx-Bildung, Diacetyl die Bildung von 7,8-DiMe-IQx.

Die Geschwindigkeit des nichtoxidativen Ascorbinsäureabbaus ist bei einem pH-Wert von 4 maximal und bei einem pH-Wert von 2 minimal. Kurata et al. [134] konnte während des nichtoxidativen Abbaus der Ascorbinsäure die Bildung von 3-Desoxypentose und 3,4-Didesoxypentose beobachten (Abb. 58). Diese reagieren zu Furfural. Frandrup-Kuhr beobachtete, dass Furfural die Bildung von 4,8-DiMeIQx fördert [123]. Liegen Aminosäuren vor, erfolgen weitere Schritte der Maillard-Reaktion (Abb. 57).

Reduzierende Zucker verhalten sich, wie bereits in Kapitel 1.3.4 ausgeführt, bei der HAA-Bildung ambivalent. Bei einem molaren Verhältnis von reduzierendem Zucker, Aminosäure und Kreatinin von 0,5 : 1 : 1 liegt das Maximum der HAA-Bildung vor (Kap. 3.2.1). Bei höheren und niedrigeren Zuckergehalten verringert sich die HAA-Bildung.

Wir vermuten, dass die reduzierende Wirkung der Ascorbinsäure für das scheinbar widersprüchliche Verhalten, dass bei ihrer Anwesenheit in Modellen [47] eine Unterdrückung

und bei der Verwendung von Fleischextrakt [46] eine Förderung der HAA-Bildung beobachtet wurde, von untergeordneter Bedeutung ist, und der Hauptgrund hierfür die unter Hitzeeinwirkung entstehenden Abbauprodukte sind.

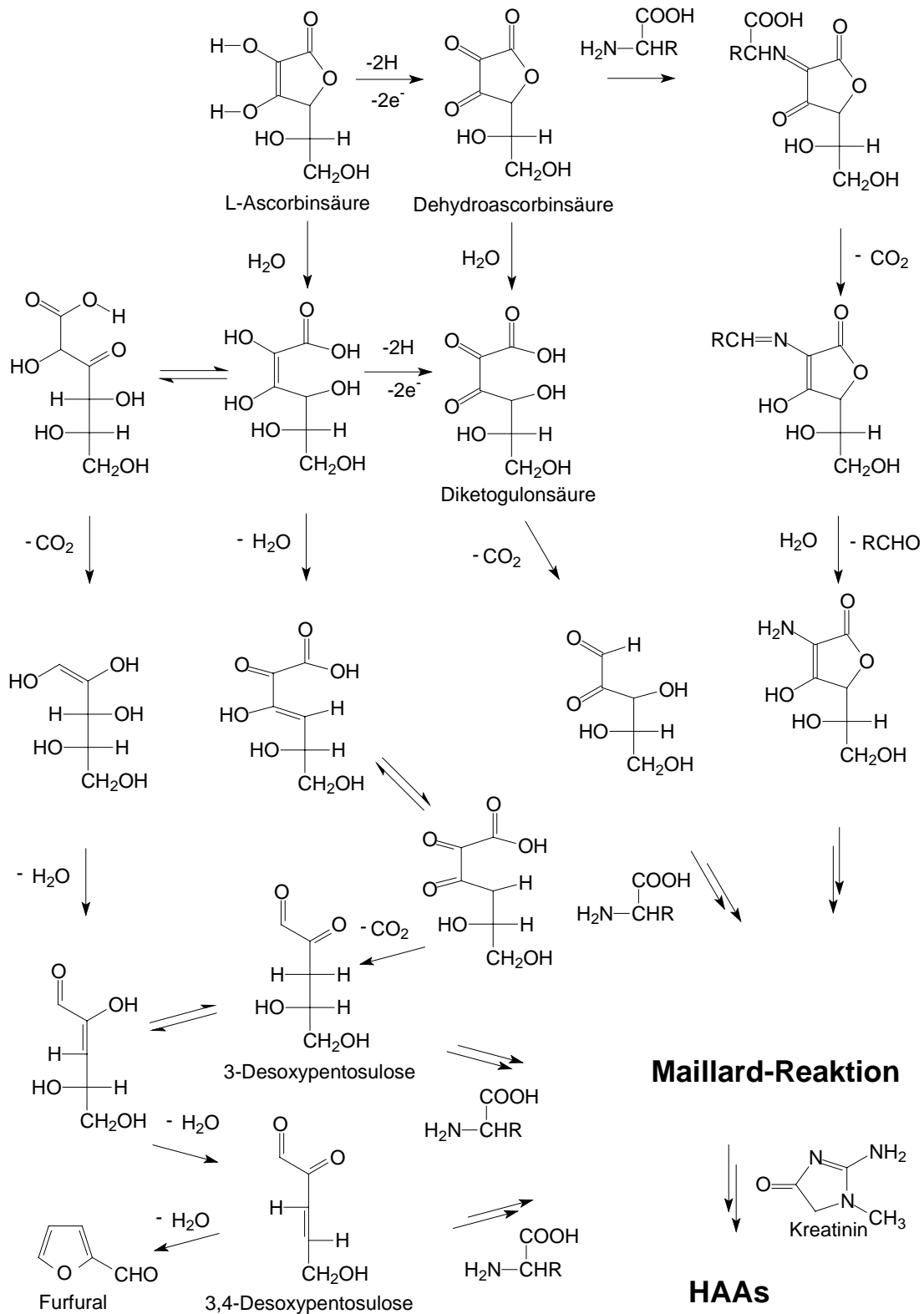


Abb. 57 Mögliche Abbauege der Ascorbinsäure im Rahmen der Maillard-Reaktion [134]

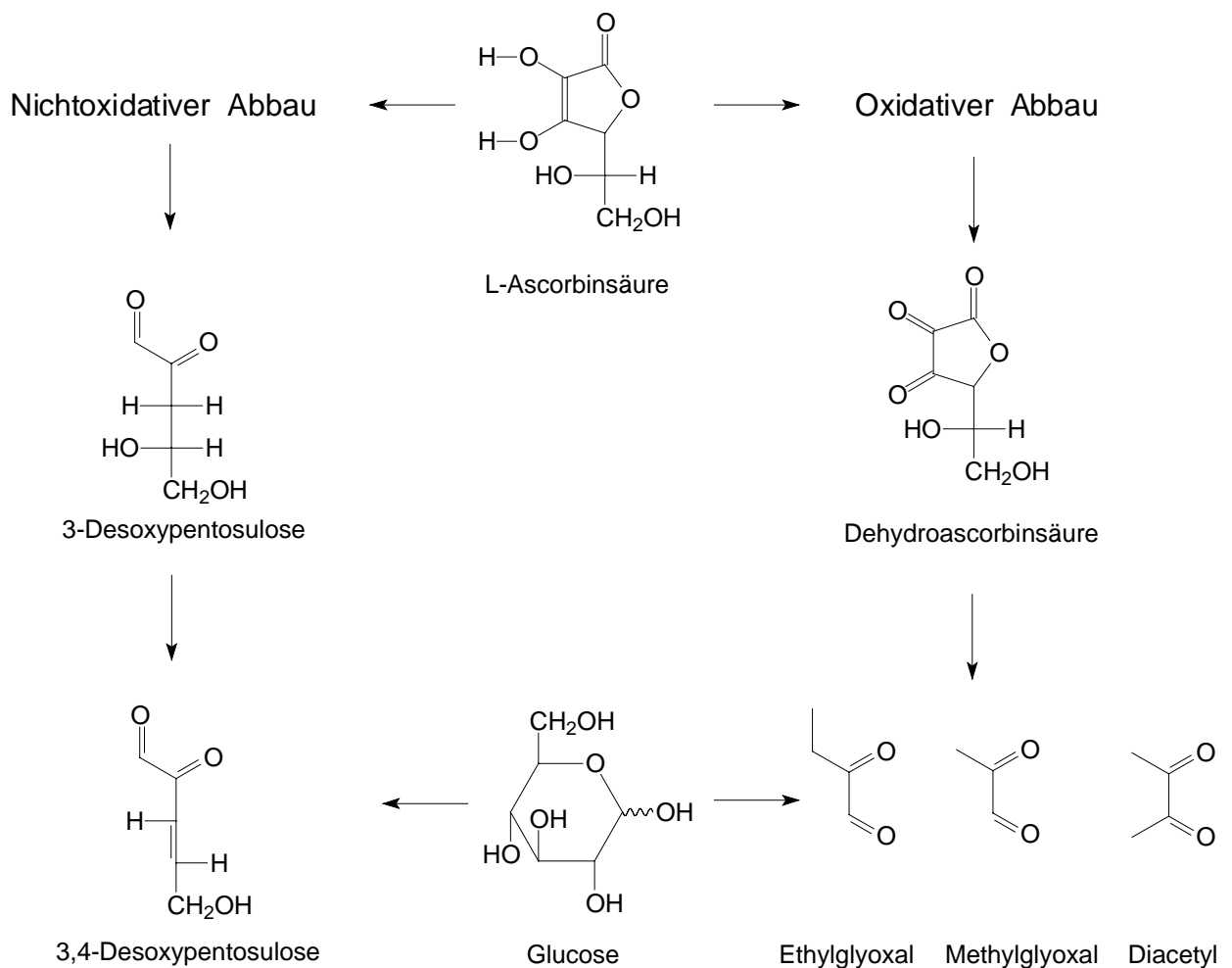


Abb. 58 Abbau der Ascorbinsäure [141]

Bei den von M. Johansson untersuchten Modellen wurden die molaren Verhältnisse von Glucose zu Glycin und Kreatinin so gewählt, dass die HAA-Bildung maximal war. Weitere Folgeprodukte, wie sie aus dem Ascorbinsäureabbau entstehen können, würden somit die HAA-Bildung unterdrücken, da dann nicht mehr die optimalen Mengenverhältnisse der Reaktanden vorliegen. Bei den Reaktionsaromen, die M. Vollenbröcker untersuchte, war kein reduzierender Zucker vorhanden. Folgeprodukte, die aus der Ascorbinsäure entstehen können, müssten dann die HAA-Bildung fördern.

Weiterhin gehen wir davon aus, dass die Ascorbinsäure nicht nur einen indirekten Einfluss auf die HAA-Bildung aufweist, sondern analog zu den reduzierenden Zuckern (Kap. 1.2.2), bei der Bildung direkt oder über ihre Abbauprodukte beteiligt ist.

Unser Ziel ist es, den ambivalenten Charakter der Ascorbinsäure zu betrachten und zu ermitteln, bei welchen molaren Verhältnissen die HAA-Bildung am größten ist und wann eine

völlige Unterdrückung der HAA-Bildung erfolgt. Weiterhin interessiert uns der Einfluss des pH-Wertes, von Schwermetallionen (Kupfer, Eisen), von oxidativen und nicht oxidativen Bedingungen, sowie der Einfluss der Temperatur und des aw-Wertes.

4.2 Einfluss der Ascorbinsäure auf die HAA-Bildung im wässrigen Milieu

4.2.1 Einfluss der Molmengenverhältnisse

Bei dieser Versuchsreihe wollten wir, anders als bei Vollenbröker (4.1), auf Fleischextrakt verzichten und wählten somit eine vereinfachte Matrix, die mit den Untersuchungen zum Einfluss reduzierender Zucker auf die HAA-Bildung verglichen werden konnte. Modellmischungen aus Ascorbinsäure, Glycin und Kreatinin auf Avicel wurden in verschließbaren Zentrifugengläsern in Phosphatpuffer (pH 7) gelöst, auf einen Wassergehalt von 65 % eingestellt und 6 h bei 125 °C im Trockenschrank erhitzt. Die Bedingungen wurden so gewählt, um den von Vollenbröker gewählten Bedingungen bei seinen Untersuchungen des Einflusses der Ascorbinsäure auf die HAA-Bildung in Reaktionsaromen möglichst nahe zu kommen.

Wir gingen davon aus, dass auch ohne Anwesenheit eines reduzierenden Zuckers HAAs gebildet werden müssten. Tatsächlich konnten wir, wie aus Abbildung 59 hervorgeht, in Anwesenheit von Ascorbinsäure unter wässrigen Bedingungen bis zu 0,12 nmol MeIQx pro mmol Kreatinin nachweisen. In wasserarmen Systemen konnte von uns bei gleicher Temperatur und Erhitzungsdauer bis zu 0,6 nmol MeIQx pro mmol Kreatinin nachgewiesen werden (Kap. 4.3.1).

Die Bildung anderer HAAs konnte unter wässrigen Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Wie bei den reduzierenden Zuckern (Kap. 3.2.1) konnten wir einen ambivalenten Einfluss der Ascorbinsäure auf die HAA-Bildung in Abhängigkeit von den Molmengenverhältnissen zu Kreatinin beobachten. Das Maximum der HAA-Bildung lag wie bei den reduzierenden Zuckern bei einem Molmengenverhältnis von Ascorbinsäure zu Kreatinin von 0,5 : 1. Wurde das Molmengenverhältnis von Ascorbinsäure zu Kreatinin auf 1,5 erhöht, konnte kein MeIQx mehr nachgewiesen werden.

Die von Johansson verwendeten Molmengenverhältnisse von Glucose zu Glycin und Kreatinin betragen 0,5 : 1 : 1, wobei eine maximale HAA-Bildung erfolgte (Kap. 3.2.1). Durch einen Zusatz weiterer Carbonylverbindungen entfernt man sich von diesem Maximum und es erfolgt zwangsläufig eine Unterdrückung der HAA-Bildung. In analoger Weise kann

somit erklärt werden, warum in dem von Johansson beschriebenen, das optimale Verhältnis der Reaktanden aufweisenden Modellsystem bei Ascorbinsäurezusatz eine deutliche Unterdrückung der MeIQx-Bildung beobachtet wurde (Kap. 4.1), während andere Antioxidantien zu keiner Unterdrückung führten.

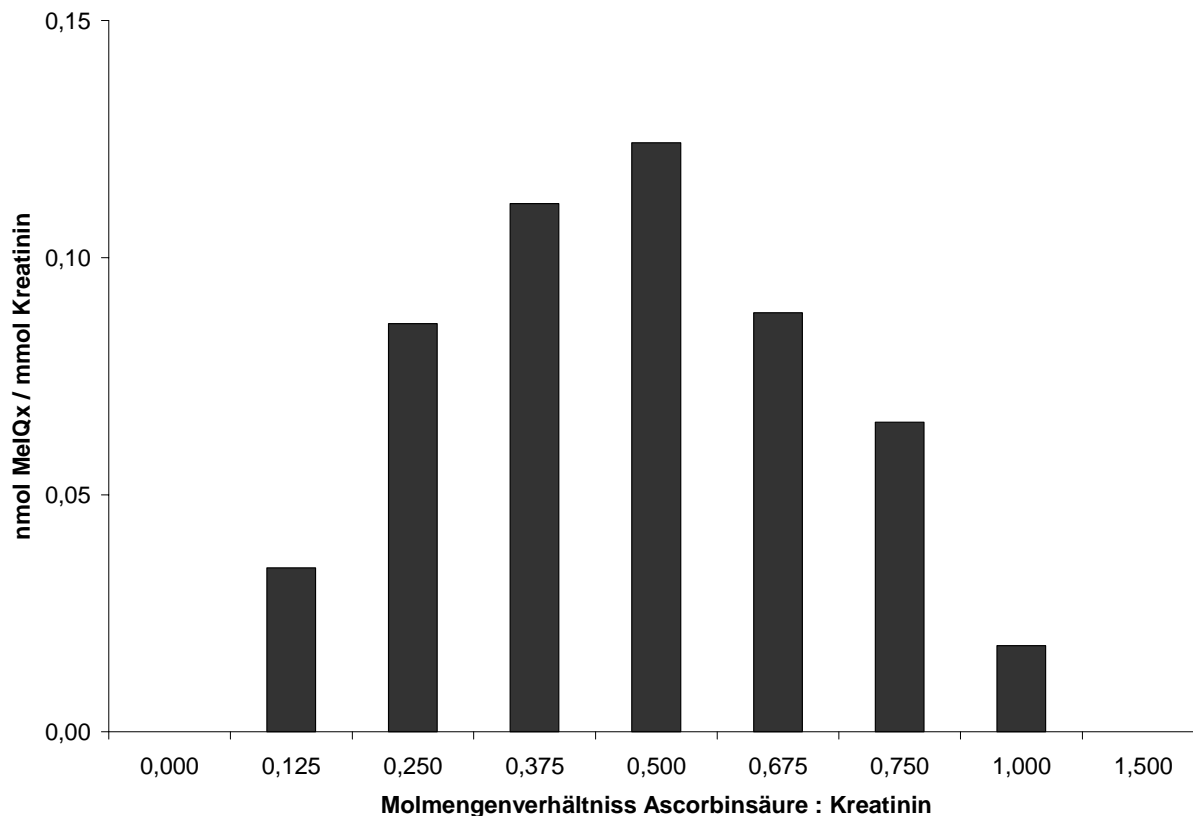


Abb. 59 Einfluss der molaren Verhältnisse Ascorbinsäure : Kreatinin auf die HAA-Bildung in einem wässrigen Modellsystem; 65% Wassergehalt; Phosphatpuffer pH 7,001 molar; Glycin : Kreatinin (1 : 1); 125 °C; 6 h im Trockenschrank; verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml; verschlossen

Der von Vollenbröcker verwendete Fleischextrakt enthielt 7,3 g Kreatinin pro 100g Fleischextrakt. Da von Vollenbröcker zu 3 g Fleischextrakt 600 mg Ascorbinsäure zugesetzt wurden, betrug das Molmengenverhältnis von Ascorbinsäure zu Kreatinin 1,76. Bei einem solchen Molmengenverhältnis konnten wir in unseren wässrigen Modellen keine HAA-Bildung mehr nachweisen. Da von Vollenbröcker keine weiteren Untersuchungen bei anderen Molmengenverhältnissen von Ascorbinsäure zu Kreatinin in Fleischextrakt durchgeführt wurden, konnte von ihm auch kein ambivalentes Verhalten der Ascorbinsäure bei der HAA-Bildung festgestellt werden.

Das beschriebene Reaktionsverhalten der Ascorbinsäure bei der HAA-Bildung liefert aber dennoch eine Erklärung, warum bei einem Zusatz zu Fleischextrakt, der frei von reduzierenden Zuckern ist, vermehrt MeIQ_x gebildet werden kann.

4.2.2 Einfluss des pH-Wertes

Die Geschwindigkeit des nichtoxidativen Ascorbinsäureabbaus ist bei einem pH-Wert von 4 maximal und bei einem pH-Wert von 2 minimal (Kap. 4.1). Deshalb haben wir wässrige Modelle aus Ascorbinsäure, Glycin und Kreatinin bei verschiedenen pH-Werten untersucht (Abb. 60). Die Molmengenverhältnisse von Ascorbinsäure, Glycin und Kreatinin betragen dabei 0,5 : 1 : 1, da hier eine maximale Bildung von MeIQ_x beobachtet wurde (Kap. 4.2.1). Als Puffer haben wir eine Lösung aus Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat und Pentanatriumtriphosphat (0,03 molar) gewählt und den pH-Wert mit Phosphorsäure eingestellt. Die Temperatur betrug 125 °C bei einer Erhitzungsdauer von 6 Stunden in geschlossenen Gefäßen.

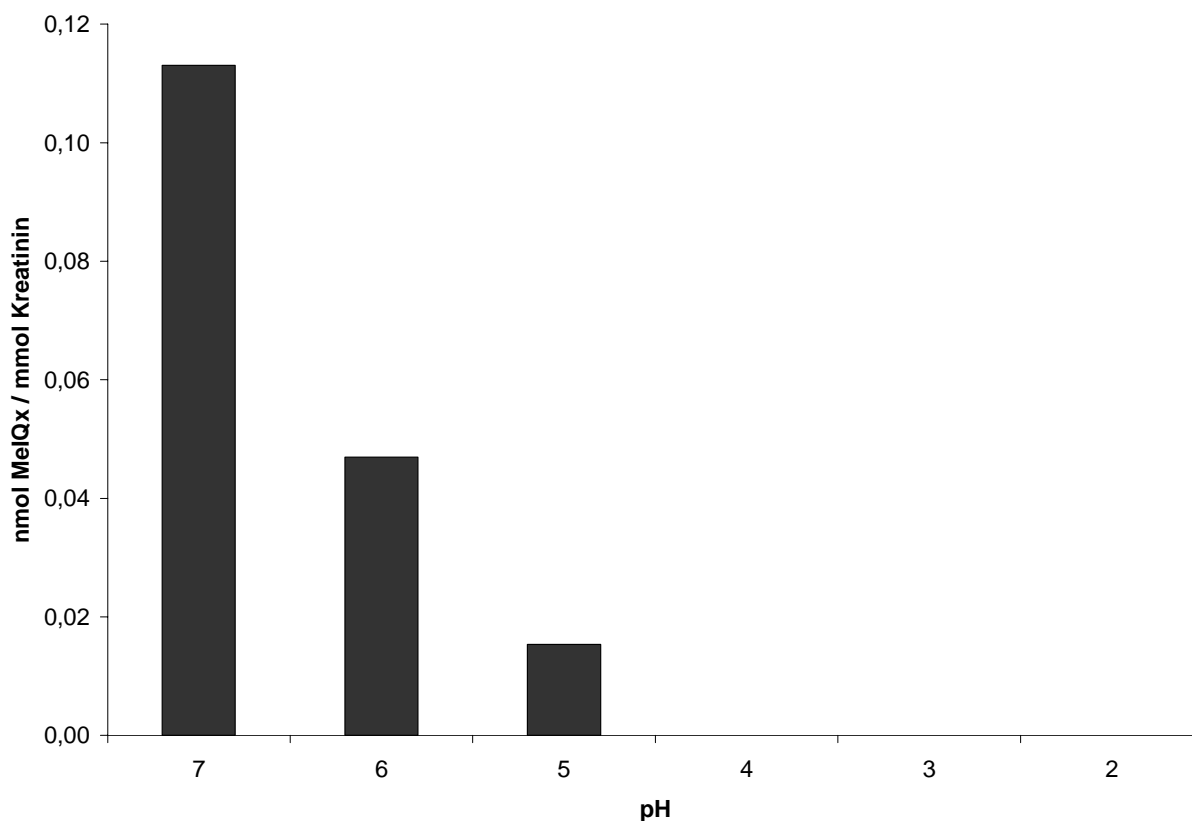


Abb. 60 Einfluss des pH-Wertes auf die HAA-Bildung in einem wässrigen Modellsystem; Polyphosphatpuffer 0,03 molar; Ascorbinsäure : Glycin : Kreatinin 0,5 : 1 : 1; 125 °C; 6 h im Trockenschrank; verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml; verschlossen

Aus Abbildung 60 geht hervor, dass mit einer Erniedrigung des pH-Wertes eine Verminderung der MeIQ_x-Bildung einhergeht. Bei einem pH-Wert von 7 beträgt unter den

hier gewählten Versuchsbedingungen die maximal nachgewiesene Menge an MeIQx 0,11 nmol pro mmol Kreatinin. Ab einem pH-Wert von 4, bei dem der nichtoxidative Abbau der Ascorbinsäure mit maximaler Geschwindigkeit erfolgt, sind keine HAAs mehr nachweisbar. Bei einer weiteren Erniedrigung des pH-Wertes auf 2, bei dem der nichtoxidative Abbau der Ascorbinsäure mit minimaler Geschwindigkeit erfolgt, sind ebenfalls keine HAAs mehr nachweisbar.

Aufgrund der oben genannten pH-Abhängigkeit des nichtoxidativen Ascorbinsäureabbaus ist die über diesen Abbauweg erfolgende HAA-Bildung eher unwahrscheinlich, zumal aus der hierüber entstehenden 3,4-Desoxypentusolose Furfural gebildet wird, das die Bildung von 4,8-DiMeIQx fördern würde [123]. Vielmehr scheint die HAA-Bildung über die in Abbildung 57 dargestellte Maillard-Reaktion zu laufen.

4.3 Einfluss der Ascorbinsäure auf die HAA-Bildung unter wasserarmen Bedingungen

4.3.1 Einfluss des Molmengenverhältnisses

Bei unseren Untersuchungen zum Einfluss der Ascorbinsäure auf die HAA-Bildung im wässrigen Milieu konnten nur bis zu 0,12 nmol MeIQx pro mmol Kreatinin nachgewiesen werden (Kap 4.2.1). Andere HAAs konnten nicht gefunden werden.

Bei unseren Untersuchungen des Einflusses reduzierender Zucker auf die HAA-Bildung konnten wir feststellen, dass unter wasserarmen Bedingungen etwa die zehnfache Menge an HAAs im Vergleich zum wässrigen Milieu (Kap. 3.2.3) gebildet wird. Des Weiteren konnten beim Einsatz von reduzierenden Zuckern, Glycin und Kreatinin neben MeIQx auch 7,8-DiMeIQx und 4,8-DiMeIQx nachgewiesen werden (Kap. 3.2.5).

Da wir davon ausgehen, dass sich die Ascorbinsäure bei der HAA-Bildung analog zu den reduzierenden Zuckern verhält, haben wir in den folgenden Untersuchungen wasserarme Bedingungen gewählt und den aw-Wert auf 0,75 eingestellt. Als Trägermatrix diente uns Avicel. Weiterhin wurden Glycin und Kreatinin im Molmengenverhältnis von 1 : 1 eingesetzt. Die Erhitzungstemperatur betrug dabei einheitlich 125 °C, die Erhitzungsdauer 6 Stunden. Bei unseren Untersuchungen zum Einfluss des pH-Wertes auf die HAA-Bildung unter Verwendung von Ascorbinsäure haben wir einen Anstieg der HAA-Bildung mit steigendem pH-Wert beobachtet (Kap. 4.2.2). Somit entschieden wir uns, neben der Ascorbinsäure auch Natriumascorbat einzusetzen.

Aus Abbildung 61 geht hervor, dass bei Verwendung von Ascorbinsäure maximal 0,56 nmol MeIQx pro mmol Kreatinin und 0,49 nmol 7,8-DiMeIQx pro mmol Kreatinin gebildet werden. Andere HAAs werden nicht nachgewiesen. Das Maximum der HAA-Bildung wird, in Analogie zu reduzierenden Zuckern, bei den Molmengenverhältnissen Ascorbinsäure zu Glycin zu Kreatinin von 0,5 : 1 : 1 erreicht. Wird das entsprechende Molmengenverhältnis auf 3 : 1 : 1 erhöht, können maximal nur noch 0,03 nmol MeIQx pro mmol Kreatinin nachgewiesen werden. Das HAA-Spektrum ähnelt dem der Glucose bzw. einer Hexose, da die Bildung von MeIQx und 7,8-DiMeIQx erfolgt; 4,8-DiMeIQx wird hingegen wie bei den Pentosen nicht gebildet (Kap. 3.2.5). Unter identischen Bedingungen wurde beim Einsatz von Glucose anstelle der Ascorbinsäure 1,5 nmol MeIQx und 0,3 nmol 7,8-DiMeIQx pro Mol Kreatinin gebildet (vgl. Kap. 3.2.1), was auf eine verminderte Bildung von Methylglyoxal, dafür aber auf eine vermehrte Bildung von Diacetyl [123] hindeutet.

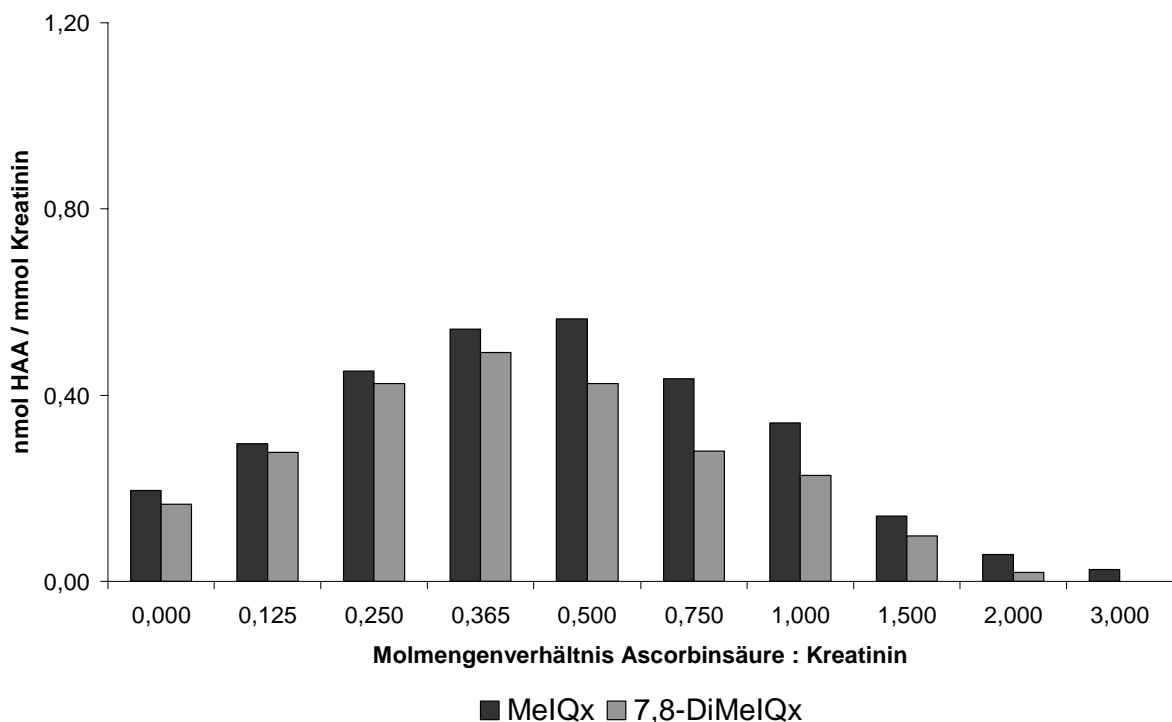


Abb. 61 Einfluss der molaren Verhältnisse Ascorbinsäure : Kreatinin auf die HAA-Bildung in einem wasserarmen Modellsystem; Glycin : Kreatinin (1 : 1); 125 °C; 6 h im Trockenschrank; aw=0,75; verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml; verschlossen

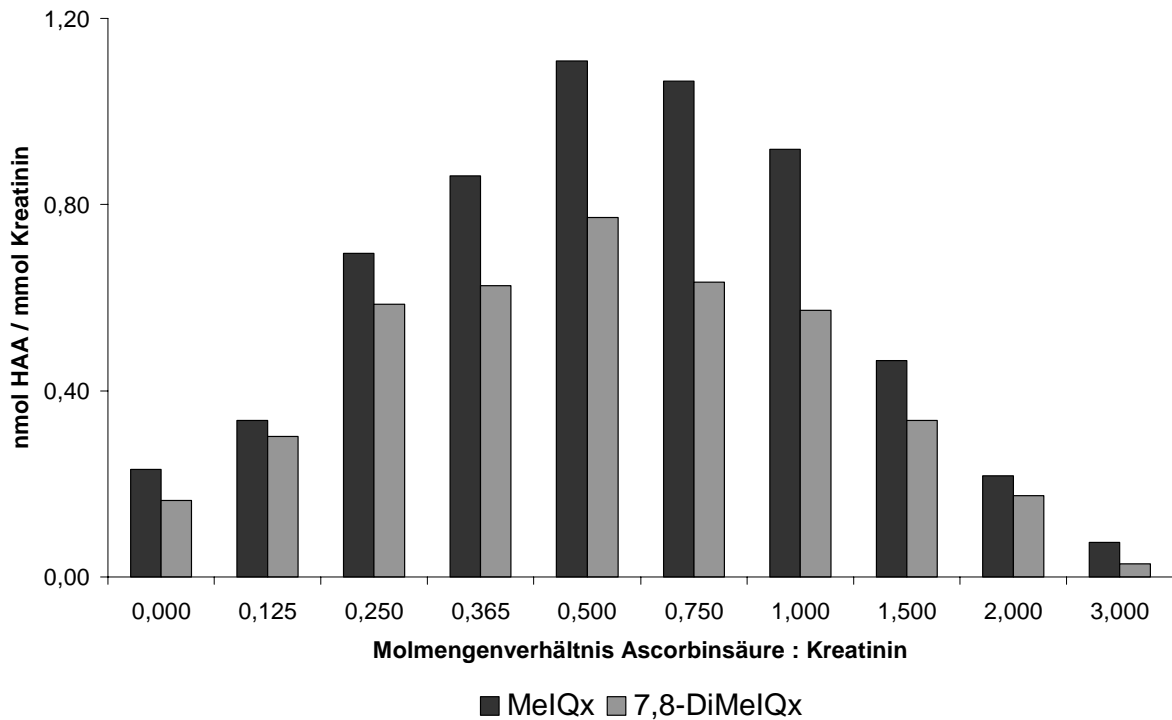


Abb. 62 Einfluss der molaren Verhältnisse Natriumascorbat : Kreatinin auf die HAA-Bildung in einem wasserarmen Modellsystem; Glycin : Kreatinin (1 : 1); 125 °C; 6 h im Trockenschrank; aw=0,75; verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml; verschlossen

Aus Abbildung 62 geht hervor, dass bei der Verwendung von Natriumascorbat im Vergleich zur Ascorbinsäure (s. Abb. 61) fast die doppelte Menge an HAAs gebildet wird. Dabei werden maximal 1,1 nmol MeIQx und 0,77 nmol 7,8-DiMeIQx pro mmol Kreatinin gebildet. Das Maximum der HAA-Bildung wird ebenfalls bei den Molmengenverhältnissen Natriumascorbat zu Glycin zu Kreatinin von 0,5 : 1 : 1 erreicht. Wird das Molmengenverhältnis von Natriumascorbat zu Glycin zu Kreatinin auf 3 : 1 : 1 erhöht, können maximal nur noch 0,07 nmol MeIQx und 0,03 nmol 7,8-DiMeIQx pro Mol Kreatinin nachgewiesen werden.

Auch bei Verwendung von Natriumascorbat ähnelt das HAA-Spektrum dem unter Verwendung von Glucose oder Fructose erhaltenen Spektrum. Es ist somit unwahrscheinlich, dass unter wasserarmen Bedingungen der Reaktionsweg der HAA-Bildung bevorzugt über die Pentosulosen (Kap. 4.1, Abb. 57 und 58) verläuft, da hierbei anders als bei den Pentosen (Kap. 3.2.5) kein 4,8-DiMeIQx gebildet wird.

Der oxidative Abbauweg (Kap. 4.1 Abb. 58) der Ascorbinsäure über die Dehydroascorbinsäure unter Bildung von Methylglyoxal und Diacetyl als Vorstufen zur Bildung von MeIQx und 7,8-DiMeIQx scheint somit gegenüber dem nichtoxidativen Abbauweg bevorzugt zu sein, da Methylglyoxal die Bildung von MeIQx und Diacetyl die

Bildung von 7,8-DiMeIQx fördert. Während des nichtoxidativen Abbaus der Ascorbinsäure entsteht nach Suramatsu [134] 3-Desoxypentosulose und 3,4-Desoxypentosulose (Kap. 4.1, Abb. 58), die zu Furfural weiterreagieren (Kap. 4.1, Abb. 57). Furfural fördert jedoch nach Frandrup-Kuhr die Bildung von 4,8-DiMeIQx [123].

Diese Ergebnisse deckten sich auch mit den Beobachtungen, die bei den Versuchen zum Einfluss des pH-Wertes auf die HAA-Bildung unter Verwendung von Ascorbinsäure im wässrigen Milieu gemacht wurden (Kap. 4.2.2). Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass die ersten Schritte der HAA-Bildung über die Reaktion der Ascorbinsäure bzw. deren Abbauprodukte mit den Aminosäuren erfolgen (Kap. 4.1, Abb. 57). Bei Verwendung von Ascorbinsäure unter wasserarmen Bedingungen (aw-Wert = 0,75) werden deutlich mehr HAAs gebildet als unter wässrigen Bedingungen (Kap. 4.2.1). Unter diesen Bedingungen ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Maillard-Reaktion am größten.

4.3.2 Einfluss von Schwermetallionen auf die HAA-Bildung

Johansson [47] untersuchte den Einfluss von Schwermetallionen und Antioxidantien auf die HAA-Bildung in Modellsystemen, die aus Glucose, Glycin und Kreatinin in den Molmengenverhältnissen 0,5 : 1 : 1 zusammengesetzt waren. Des Weiteren wurden den Modellen Speiseöl zugesetzt, da man davon ausging, dass Schwermetallionen den oxidativen Abbau der Fettsäuren zu Aldehyden fördern würden. Die bei der Fettoxidation gebildeten Aldehyde würden gemäß dem Bildungsweg von Jägerstad die Bildung der HAAs fördern (Kap. 1.2.2). Tatsächlich wurde bei einem Zusatz von Eisen- und Kupferionen die HAA-Bildung gefördert. In unseren Untersuchungen sollte die Wirkung von Schwermetallionen auf die Bildung von HAAs in Ascorbinsäure bzw. Natriumascorbat, Glycin und Kreatinin in den Molmengenverhältnissen von 0,5 : 1 : 1 enthaltenen Modellsystemen studiert werden. Unsere Überlegungen gingen davon aus, dass Ascorbinsäure in Gegenwart von Schwermetallionen wie Eisen- und Kupferionen rasch in Dehydroascorbinsäure, die als Dicarbonylverbindung zu einer beschleunigten Bildung von HAAs führen sollte, übergeführt wird. In unseren Versuchen wählten wir die Mengen der den Modellmischungen vor der Gefriertrocknung zuzufügenden Eisen- und Kupferionen in Anlehnung an die in Fleischextrakt nachgewiesenen Mengen, die sich im Bereich der molaren Verhältnisse von Schwermetallionen zu Kreatinin zwischen 2×10^{-4} und 4×10^{-3} bewegen [132]. Für unsere Modelle wählten wir einen weiteren Bereich, und zwar bei den Werten 10^{-4} , 10^{-3} und 10^{-2} liegende molare Verhältnisse zwischen Schwermetallion und Kreatinin. Der aw-Wert der gefriergetrockneten Modellsysteme wurde auf 0,75 eingestellt. Anschließend wurden die Modelle für 6 Stunden bei 125 °C erhitzt.

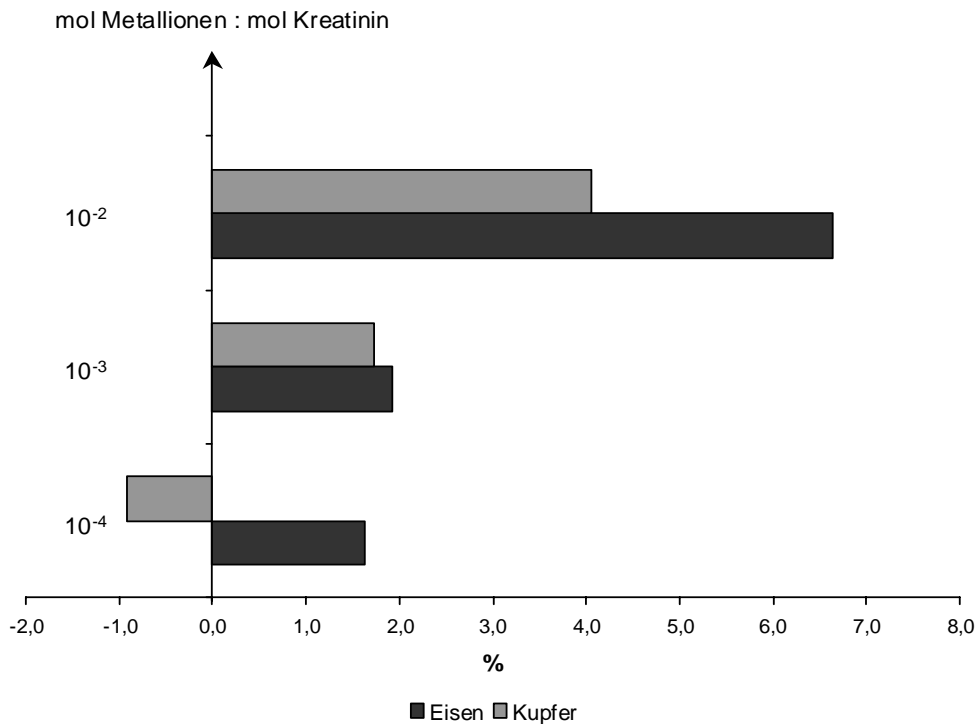


Abb. 63 Einfluss von Schwermetallionen auf die prozentuale Zunahme der MeIQ_x-Bildung in einem wasserarmen Avicel-Modellsystem ($a_w = 0,75$); Ascorbinsäure : Glycin : Kreatinin 0,5 : 1 : 1; 125 °C; 6 h im Trockenschrank; Metallionenkonzentrationen: 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} mmol pro mmol Kreatinin, verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml; verschlossen

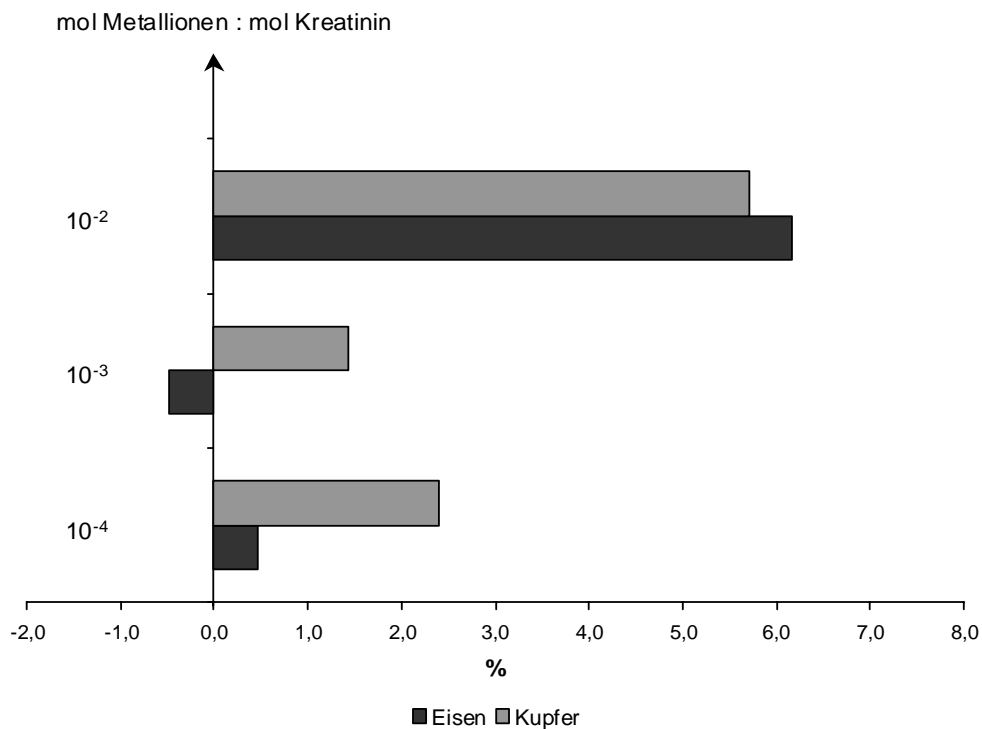


Abb. 64 Einfluss von Schwermetallionen auf die prozentuale Zunahme der MeIQ_x-Bildung in einem wasserarmen Avicel-Modellsystem ($a_w = 0,75$); Natriumascorbat : Glycin : Kreatinin (0,5 : 1 : 1); 125 °C; 6 h im Trockenschrank; Metallionenkonzentrationen: 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} mmol pro mmol Kreatinin, verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml; verschlossen

Wie aus den Abbildungen 63 und 64 hervorgeht, war bei den in Fleischextrakt üblichen Konzentrationen an Metallionen weder bei der Verwendung von Eisen- noch von Kupferionen eine nennenswerte Erhöhung der MeIQ_x-Bildung zu beobachten. Erst bei einem Molmengenverhältnis von Schwermetallionen zu Kreatinin von 10^{-2} wird 6 - 7 % mehr MeIQ_x nachgewiesen als bei Modellmischungen ohne Schwermetallionen.

4.3.3 Einfluss des aw-Wertes auf die HAA-Bildung

Bei der Verwendung von Ascorbinsäure wurden unter wasserarmen Bedingungen in den von uns verwendeten Modellen deutlich mehr HAAs nachgewiesen als im wässrigen Milieu (Kap. 4.2). Bei Verwendung von Glucose bzw. Xylose hatte der aw-Wert einen deutlichen Einfluss auf die Mengen der gebildeten HAAs (Kap.3.2.3). Aufgrund dieser Ergebnisse gingen wir davon aus, dass der aw-Wert auch beim Einsatz von Ascorbinsäure analog zu den reduzierenden Zuckern einen entsprechenden Einfluss auf die HAA-Bildung haben müsste.

Die vorausgegangenen Untersuchungen zum Einfluss der Ascorbinsäure auf die HAA-Bildung haben ergeben, dass sich die Ascorbinsäure unter den von uns verwendeten Bedingungen (Kap. 4.2.1 und 4.3.1) hierbei wie ein reduzierender Zucker verhält. Die Zusammensetzung der beim Einsatz von Ascorbinsäure erhaltenen HAAs ähnelt hierbei einem beim Einsatz einer Hexose erhaltenen Spektrum (vgl. Kap. 3.2.5), da zwar MeIQ_x und 7,8-DiMeIQ_x nachgewiesen können, nicht aber 4,8-DiMeIQ_x. Wie bereits in Kapitel 4.3.2 beschrieben wurde, ist aufgrund dieses Ergebnisses der nichtoxidative Abbauweg der Ascorbinsäure (Kap. 4.1, Abb. 57 und 58) über die Pentosulosen wohl eher als unwahrscheinlich anzusehen, da bei diesem Abbauweg Furfural entsteht, welches nach Frandrup-Kuhr [123] die Bildung von 4,8-DiMeIQ_x fördert.

Bei den von uns durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss des aw-Wertes auf die HAA-Bildung betragen die molaren Verhältnisse von Ascorbinsäure zu Glycin zu Kreatinin 0,5 : 1 : 1. Die Erhitzung erfolgte bei 125 °C für 6 Stunden.

Wie aus Abbildung 65 hervorgeht, ist die nachgewiesene Menge an HAAs mit bis zu 1,0 nmol pro mmol Kreatinin bei einem aw-Wert von 0,75 am größten. Zum Vergleich: Im wässrigen Milieu wurde unter den genannten Bedingungen ausschließlich MeIQ_x in einer Menge von 0,12 nmol pro mmol Kreatinin nachgewiesen. Ähnliche Ergebnisse wurden bei den Untersuchungen des Einflusses des aw-Wertes auf die HAA-Bildung bei der Verwendung von reduzierenden Zuckern (Kap. 3.2.3) erhalten.

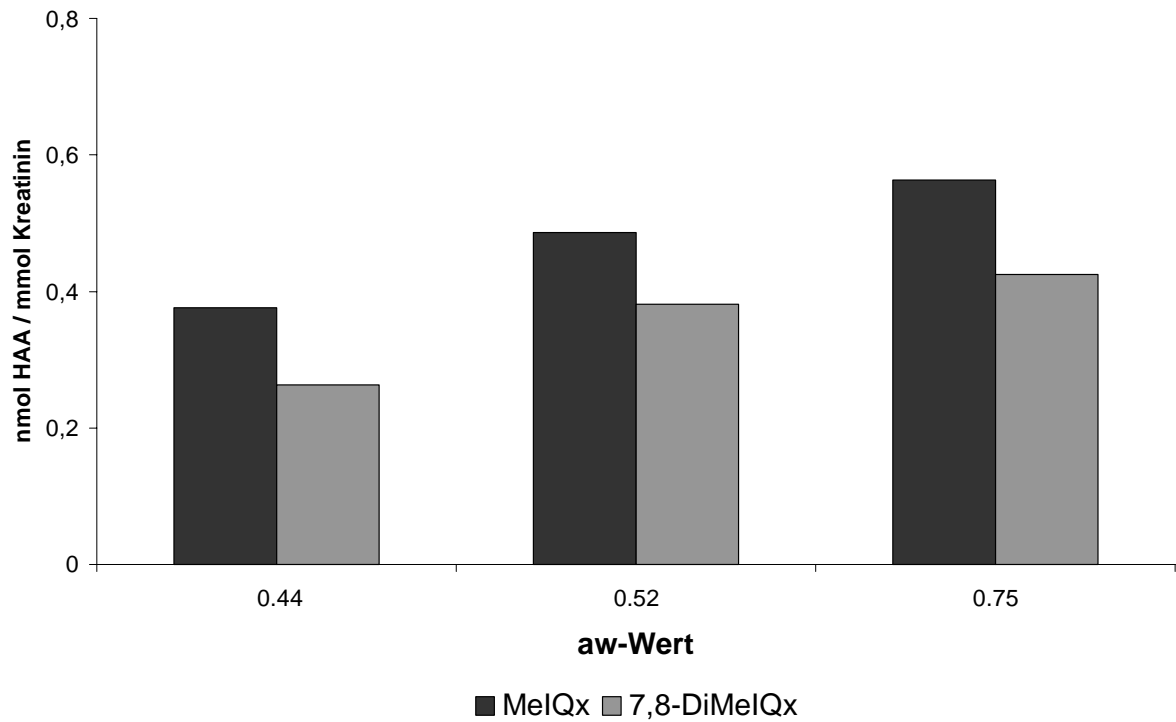


Abb. 65 Einfluss des aw-Wertes auf die Bildung von HAAs in einem Avicel-Modellsystem aus Ascorbinsäure, Glycin und Kreatinin mit den molaren Verhältnissen 0,5 : 1 : 1; T=125 °C; Trockenschrank; Erhitzungsdauer 6 h

5 Untersuchungen zur Bildung von HAAs in Reaktionsaromen

5.1 Einleitung

Laut Aromenverordnung [125] sind Reaktionsaromen „Erzeugnisse, hergestellt unter Beachtung der nach redlichem Herstellerbrauch üblichen Verfahren durch Erhitzung einer Mischung von Ausgangserzeugnissen, von denen mindestens eines Stickstoff (Aminogruppe) enthält und ein anderes ein reduzierender Zucker ist, während einer Zeit von höchstens 15 min auf nicht mehr als 180 °C.“

Bei der industriellen Herstellung von Reaktionsaromen werden in der Regel niedrigere Temperaturen, aber dafür deutlich längere Zeiträume angewendet. Es handelt sich damit streng genommen nicht um Reaktionsaromen im Sinne der Aromenverordnung, was häufig zu Kritik geführt hat, da eine Bewertung über den F-Wert sinnvoller erscheint. Diese Produkte werden aber dennoch unter der Bezeichnung „Reaktionsaroma“ vertrieben, da sie unter Verwendung der Richtlinien der IOFI (International Organization of the Flavor Industry) [128] hergestellt wurden und diese Richtlinien als die „nach redlichem Herstellerbrauch üblichen Verfahren“ angesehen werden können.

Je nach Geschmacks- und Geruchsrichtung unterscheidet man z.B. in Fleisch-, Brot- und Kaffeearoma [129]. Als Ausgangssubstanzen werden Fleischextrakt, Soja- und Hefehydrolysate, Aminosäuren, reduzierende Zucker aber auch kohlenhydratreiche Lebensmittel verwendet. Bei Fleischaromen werden auch häufig schwefelhaltige Verbindungen wie Cystein, Methionin, Glutathion und Thiamin verwendet, da ihnen eine besondere Bedeutung bei der Fleischreifung zukommt [130, 131].

Bei Temperaturen unter 140 °C handelt es sich um Niedertemperatur- und bei Temperatureinwirkungen über 140 °C um Hochtemperaturaromen. Bei einer Temperatureinwirkung von nur wenigen Minuten bis zu einer halben Stunde handelt es sich um Kurzzeit- und bei mehreren Stunden um Langzeitreaktionsaromen.

In der BRD sind die wichtigsten HAA-Vertreter, die täglich aufgenommen werden, PhIP und MeIQx [51] (Kap. 1.4). PhIP wird in größeren Mengen sowohl über Zigarettenrauch als auch über Verbrennungsabgase, also als Umweltkontaminant, und über die Nahrung aufgenommen. Bei MeIQx hingegen kann man davon ausgehen, dass die Aufnahme im Prinzip nur über die Nahrung erfolgen kann, in der es durch Erhitzung bereits unter üblichen Kochbedingungen ab 100 °C gebildet wird (Kap. 1.2.2). Die wichtigste Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein von Kreatin bzw. Kreatinin z.B. in Fleisch, worin es einen nennenswerten Bestandteil darstellt. So ist Kreatin bzw. Kreatinin in

Fleischextrakt in Konzentrationen von 5,4 bis 8,2 g pro 100 g enthalten. Der Schwerpunkt unserer Untersuchungen wurde somit auf Reaktionsaromen auf der Basis von Fleischextrakt gesetzt, da bei der Verwendung dieser Komponente mit nennenswerten Gehalten an MeIQx, aber auch anderer HAAs, wie 7,8-DiMeIQx und 4,8-DiMeIQx zu rechnen ist.

In der Literatur wird zudem die Bildung der Comutagene Harman und Norharman in erhitztem Fleischextrakt beschrieben [22]. In unseren vorangegangenen Untersuchungen mit Hilfe von Modellsystemen (Kap. 3) konnten wir die Bildung dieser Verbindungen hingegen nicht beobachten. Für Harman und Norharman sind die Bildungswege weiterhin unklar. Auffällig ist aber, dass sie im Gegensatz zu anderen Aminocarbolinen (Kap. 1.2.1) schon unter Kochbedingungen und nicht erst ab 300 °C in nennenswerten Mengen gebildet werden. Insbesondere ein Überschuss von Tryptophan in Fleischextrakt führt zu einem erheblichen Anstieg der Bildung von Harman und Norharman, wobei wasserarme Bedingungen die Bildung fördern [22].

Mit Hilfe unserer Untersuchungen zur HAA-Bildung in Modellsystemen lassen sich nur Rückschlüsse auf die Bildung von MeIQx, 7,8-DiMeIQx und 4,8-DiMeIQx in Reaktionsaromen ziehen, nicht aber auf die Bildung anderer HAAs wie z.B. Harman und Norharman.

Da wir uns in den folgenden Untersuchungen mit Reaktionsaromen auf der Grundlage von Fleischextrakt beschäftigen, soll an dieser Stelle näher darauf eingegangen werden.

Fleischextrakt wird aus den wasserlöslichen Bestandteilen des Fleisches gewonnen. Je nach Herkunft des Fleisches handelt es sich um Rind-, Wal- oder Hühnerfleischextrakt. In unseren Untersuchungen haben wir Rindfleischextrakt verwendet. Man gewinnt Fleischextrakt, indem möglichst Knochen und sehnenfreies Fleisch im Gegenstromverfahren bei 90 °C mit Wasser extrahiert werden. Das Fett wird durch Separatoren abgetrennt und der Extrakt stufenweise von 92 °C bis 46 °C in Vakuumverdampfern auf eine Trockenmasse von 45-65% vorkonzentriert und anschließend auf einen Wassergehalt von 20 % bei 65 °C konzentriert.

In der Tabelle 9 werden die wichtigsten Bestandteile von Rindfleischextrakt nach Sulser [132] wiedergegeben. Der von uns verwendete Fleischextrakt enthält $5,54 \pm 0,11$ g Kreatinin pro 100 g ($n = 6$) und hat eine Trockenmasse von $84,7 \pm 0,5$ g /100g ($n = 6$). Der Fleischextrakt ist frei von Zucker und die Aminosäurezusammensetzung entspricht dem eines handelsüblichen Fleischextraktes (Abb. 66). Da es sich um einen Fleischextrakt handelt, der für die Herstellung von Lebensmitteln verwendet wird, waren nur Spuren an MeIQx

nachzuweisen. Erst durch Erhitzung des Fleischextraktes wurden größere Mengen an MeIQx gebildet.

Tabelle 9 Allgemeine Zusammensetzung der Handelsüblichen Rindfleischextrakte [132]

	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Gesamte organische Substanz	60	56 – 64
Aminosäuren und Peptide		15 – 20
Andere Stickstoffverbindungen		10 – 15
Gesamtkreatinin		5,4 – 8,2
Ammoniak		0,2 – 0,4
Harnstoff		0,1 – 0,3
Stickstofffreie Verbindungen		10 – 15
Gesamtlipide		Spuren bis 1,5
Pigmentstoffe		10 – 20
Mineralstoffe (als Gesamtasche berechnet)	20	18 – 24
Natriumchlorid	20	2,5 – 5,0
Wasser		15 - 23

pH-Wert einer 10 %igen Lösung: ca. 5.5

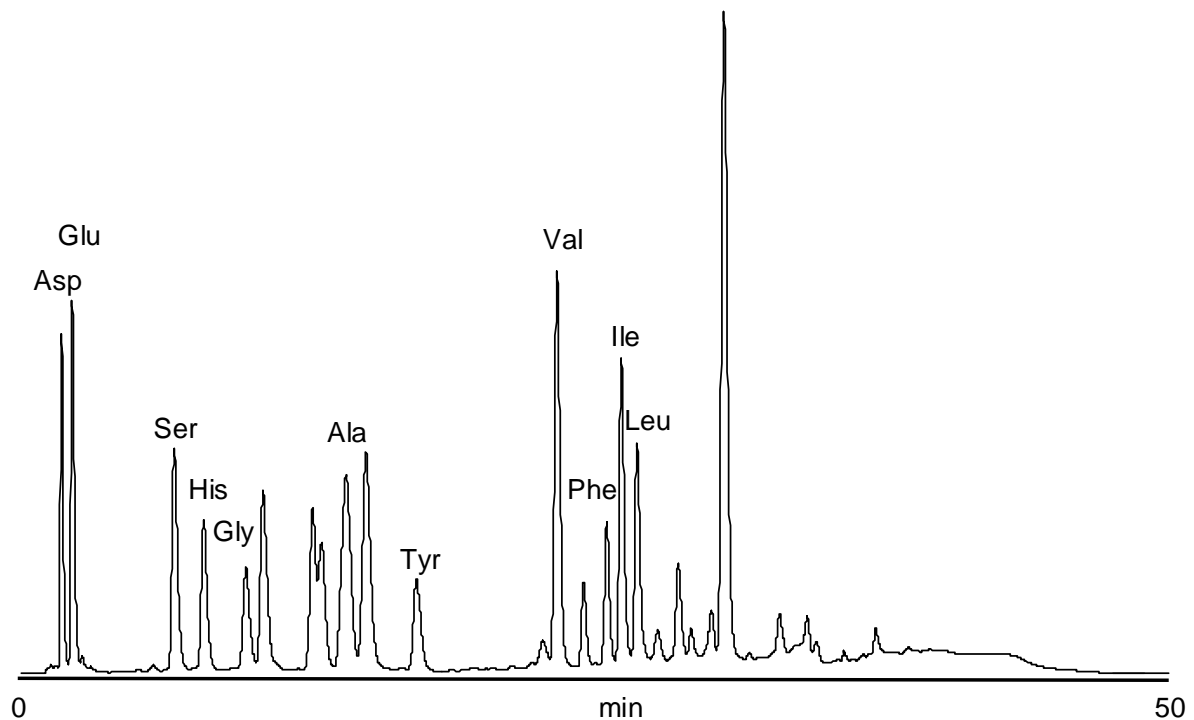


Abb. 66 HPLC-Chromatogramm der mit o-Phthalaldehyd umgesetzten Aminosäuren eines Fleischextraktes (Probenvorbereitung und Trennbedingungen entsprechend Kap. 7.4)
 Asp = Asparaginsäure, Glu = Glutaminsäure, Ser = Serin, His = Histidin, Gly = Glycin, Ala = Alanin, Tyr = Tyrosin, Val = Valin, Phe = Phenylalanin, Ile = Isoleucin, Leu = Leucin

5.2 Einfluss von reduzierenden Zuckern auf die HAA-Bildung in wässrigen Reaktionsaromen

In einem nichtindustriellen Reaktionsaroma, welches Vollenbröker unter Laborbedingungen herstellte, wurde Fleischextrakt mit verschiedenen Xylosemengen versetzt, auf einen Wassergehalt von 65 % eingestellt und 6 Stunden bei 120 °C erhitzt [46]. Bei einem Molmengenverhältnis der Xylose zu Kreatinin von 3 : 1 wurde von ihm eine vollständige Unterdrückung der MeIQ_x-Bildung beobachtet. Auch Skog konnte eine vollständige Unterdrückung der MeIQ_x-Bildung bei der Verwendung von Glucose in Fleischextrakt beobachten [50]. Dabei mussten aber mindestens 1g Glucose pro g Fleischextrakt eingesetzt werden, was einem Molmengenverhältnis der Glucose zu Kreatinin von etwa 12 : 1 entspricht.

Ein Vergleich von Glucose mit Xylose unter identischen Bedingungen wurde aber von Vollenbröker nicht durchgeführt. Da es sich bei Fleischextrakt um ein komplexes Lebensmittel handelt, ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse von Vollenbröker und Skog schwierig. Aus diesem Grund war es für uns wichtig, die beiden reduzierenden Zucker Glucose und Xylose unter identischen Bedingungen miteinander zu vergleichen und die gebildeten Mengen an HAAs unter Bezug auf die in reinem Fleischextrakt gebildeten Mengen an HAAs zu normieren.

Ein ambivalentes Verhalten der reduzierenden Zucker auf die HAA-Bildung wurde schon von Skog beschrieben [50]. Dabei liegt das Maximum der MeIQ_x-Bildung bei einem Molmengenverhältnis von Glucose zu Kreatinin bei 0,5 : 1. Das konnte auch von Vollenbröker bei der Verwendung von Xylose beobachtet werden.

Aus den oben genannten Gründen stellten wir unter den gleichen Bedingungen ein Reaktionsaroma her. Der von uns verwendete zuckerfreie Fleischextrakt (Kap. 5.1) enthielt 5,54 g Kreatinin pro 100g und hatte eine Trockenmasse von 84,7 g pro 100 g. Wir entschieden uns, als reduzierenden Zucker jeweils Xylose oder Glucose zu verwenden, um diese miteinander unter identischen Bedingungen vergleichen zu können. Wir wählten die Konzentrationen so, dass wir im Konzentrationsbereich von 0 bis 3 mol reduzierender Zucker pro mol Kreatinin lagen. Dabei wurden 5 g Fleischextrakt in ein desaktiviertes Zentrifugenglas eingewogen, mit Zucker versetzt und der Wassergehalt auf 65 % eingestellt. Anschließend wurden die Zentrifugengläser verschlossen und 1 min kräftig geschüttelt. Die Erhitzung erfolgte in einem Umlufttrockenschrank bei 120 °C; die Erhitzungsdauer betrug 6 Stunden.

Wir konnten beobachten, dass auch ohne Zusatz eines reduzierenden Zuckers etwa 12 ± 2 ng MeIQx pro g Fleischextrakt gebildet werden. Wie in unseren Untersuchungen zum Einfluss der Molmengenverhältnisse auf die HAA-Bildung in Modellsystemen (vgl. Kap. 3.2.1), konnte auch bei den von uns hergestellten Reaktionsaromen ein ambivalentes Verhalten der reduzierenden Zucker auf die MeIQx-Bildung festgestellt werden. Bei den von uns untersuchten wässrigen Reaktionsaromen, bestehend aus Glucose bzw. Xylose und Fleischextrakt (Abb. 67 und 68), war ein Maximum der MeIQx-Bildung bei einem Molmengenverhältnis des reduzierenden Zuckers zu Kreatinin von 0,5 : 1 zu beobachten. Die gebildeten Menge an MeIQx lag im Maximum um ca. 100 % über derjenigen ohne Zuckerzusatz. Bemerkenswert ist, dass sich im wässrigen Milieu die beim Einsatz von Xylose bzw. Glucose gebildeten Mengen an MeIQx in den von uns hergestellten Reaktionsaromen kaum unterschieden.

Wie die Abbildung 67 zeigt wurde ab einem Molmengenverhältnis von Xylose zu Kreatinin von 0,5 : 1 die MeIQx-Bildung mit steigender Xylose-Konzentration zwar kleiner, aber eine völlige Unterdrückung der MeIQx-Bildung wie bei den Untersuchungen von Vollenbröcker (bei einem Molmengenverhältnis des reduzierenden Zuckers zu Kreatinin von 3 : 1) konnten wir nicht beobachten.

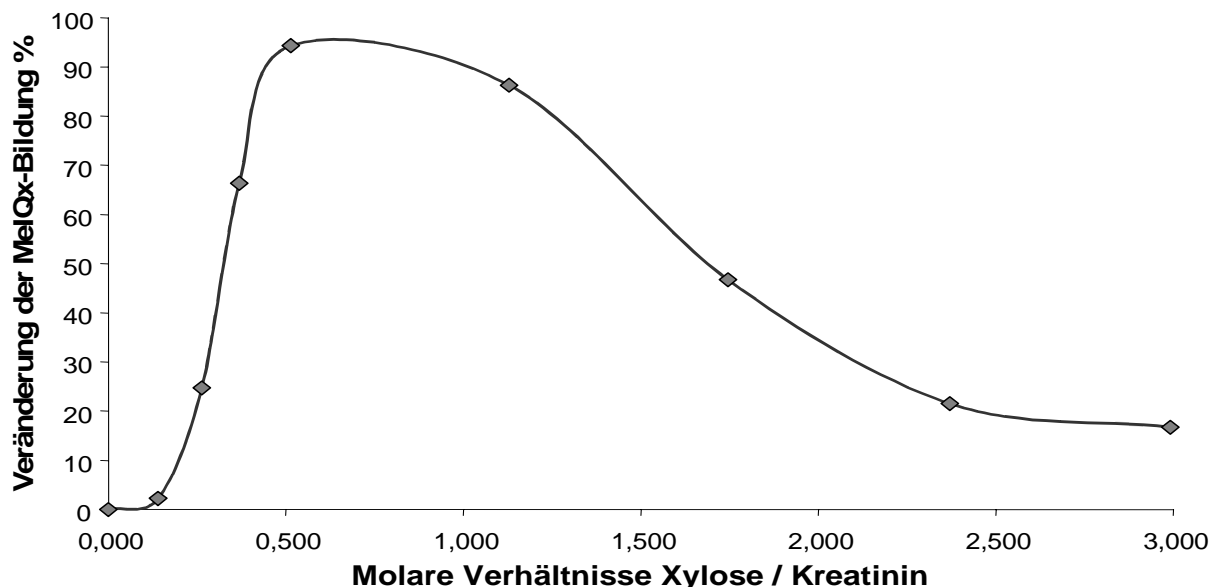


Abb. 67 Einfluss der molaren Verhältnisse Xylose / Kreatinin auf die MeIQx-Bildung (normiert) in einem Reaktionsaroma bestehend aus Xylose und Fleischextrakt (Kap. 7.7.2); 65 % Wassergehalt; 120 ° C; 6 h, Trockenschrank; verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml, verschlossen

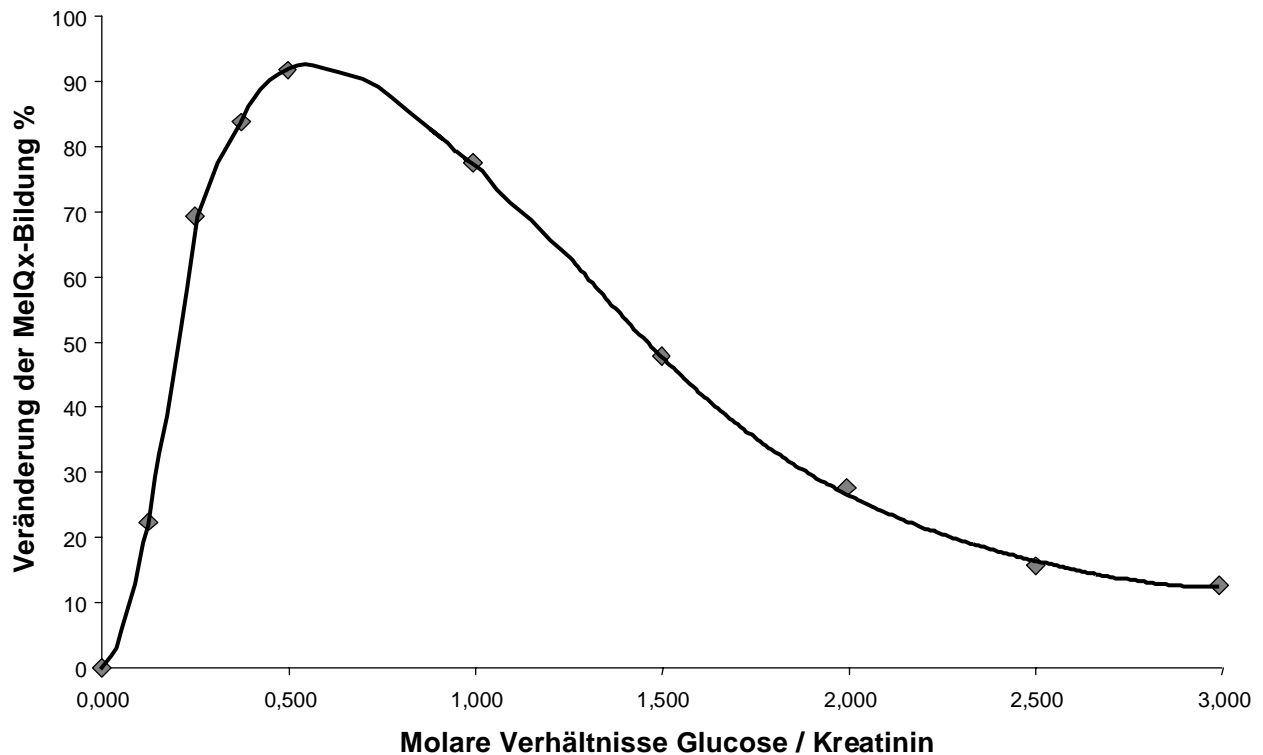


Abb. 68 Einfluss der molaren Verhältnisse Glucose / Kreatinin auf die MeIQx-Bildung (normiert) in einem Reaktionsaroma aus Glucose und Fleischextrakt (Kap. 7.7.2); 65 % Wassergehalt; 120 ° C; 6 h, Trockenschrank; verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml, verschlossen

Die ganz ähnliche Abhängigkeit der MeIQx-Bildung vom molaren Verhältnis von Glucose zu Kreatinin ist in Abbildung 68 dargestellt.

5.3 Einfluss reduzierender Zucker auf die HAA-Bildung in wasserarmen Reaktionsaromen

In den von uns durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss reduzierender Zucker auf die HAA-Bildung in wasserarmen Modellsystemen konnten wir beobachten, dass bei der Verwendung einer Pentose anstelle einer Hexose die gebildeten Mengen der HAAs geringer sind (Kap. 3.2.5). Auch unterscheidet sich das HAA-Spektrum der Pentosen und Hexosen in den Modellsystemen voneinander (Kap. 3.2.5). In unseren Untersuchungen zur HAA-Bildung in wasserreichen Reaktionsaromen konnte von uns hingegen kein Unterschied zwischen Xylose bzw. Glucose festgestellt werden (Kap. 5.2). Es war somit für uns von Interesse, wie sich unter wasserarmen Bedingungen jeweils ein Zusatz von Xylose und Glucose zu Reaktionsaromen auf Fleischextraktbasis auswirken würde.

Wir verwendeten 5g Fleischextrakt (Kap. 7.7.2), welcher in einer wässrigen Lösung des jeweiligen reduzierenden Zuckers suspendiert wurde. Um den gewünschten aw-Wert

einstellen zu können, wurde analog zu den Versuchen mit Modellsystemen (Kap. 3.1) Avicel als Trägermatrix eingesetzt. Das Verhältnis von Fleischextrakt zu Avicel betrug 1 : 1. Die gefriergetrockneten und fein gemahlene Proben wurden nach Einstellung des gewünschten aw-Wertes in Zentrifugengläser eingewogen, verschlossen und 6 Stunden bei 125 °C im Trockenschrank erhitzt.

Der von uns verwendete Fleischextrakt enthielt keine Zucker (Kap. 5.1). In zahlreichen Untersuchungen konnte bereits festgestellt werden, dass Fleischextrakt, der frei von reduzierenden Zuckern ist, bei Hitzeeinwirkung HAAs bilden kann. Dieses Ergebnis konnte auch durch unsere Untersuchungen bestätigt werden. So wurden nach dem Erhitzen unter wasserarmen Bedingungen 18 ± 2 ng MeIQx pro g Fleischextrakt nachgewiesen.

In den von uns hergestellten wasserarmen Reaktionsaromen konnte sowohl bei der Verwendung von Xylose als auch von Glucose als reduzierende Zucker MeIQx nachgewiesen werden. Eine vollständige Unterdrückung der HAA-Bildung bei einem Molmengenverhältnis des reduzierenden Zuckers zu Kreatinin von 3 : 1 konnte auch im wasserarmen Medium nicht festgestellt werden (Abb. 69 und 70).

Dennoch fällt auf, dass im wasserarmen Medium die gebildete Menge an MeIQx bei Verwendung von Xylose (Abb. 69) deutlich geringer ausfällt als bei Verwendung von Glucose (Abb. 70).

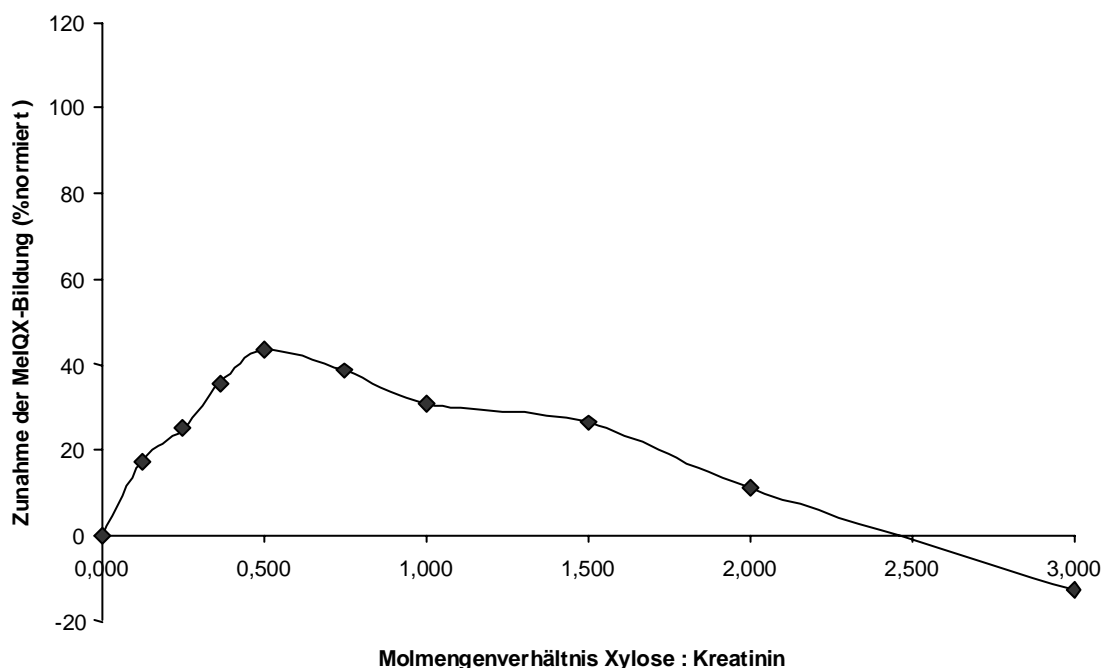


Abb. 69 Einfluss der molaren Verhältnisse Xylose / Kreatinin auf die MeIQx-Bildung in einem Reaktionsaroma bestehend aus Rindfleischextrakt unter Zusatz von Xylose; aw = 0,75 ; 125 °C; 6 h, Trockenschrank; verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml

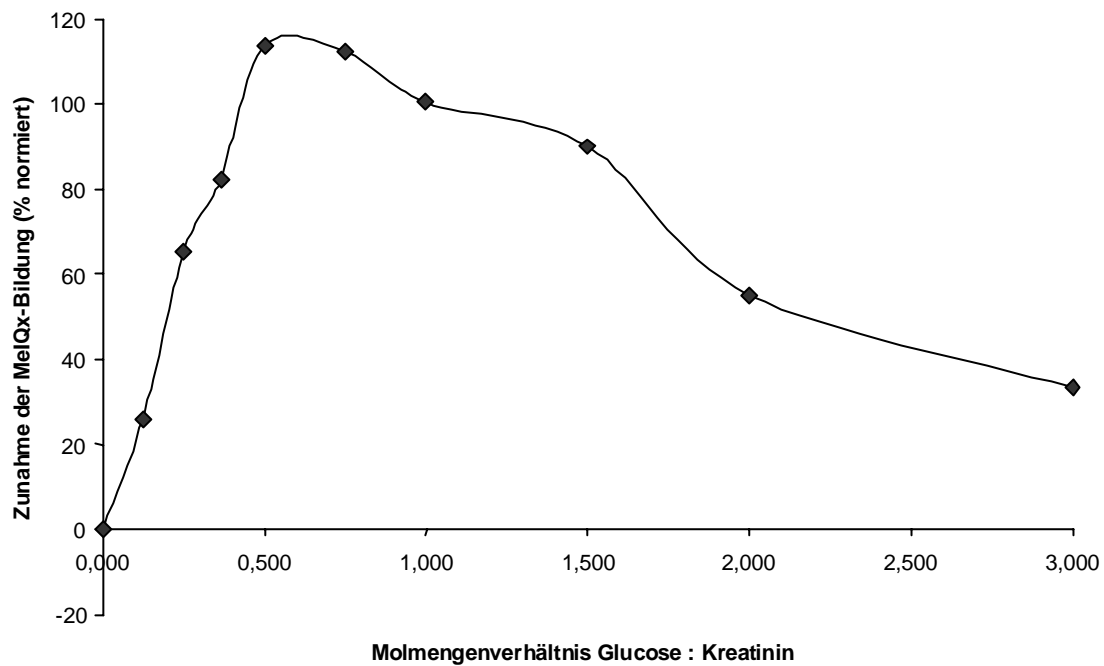


Abb. 70 Einfluss der molaren Verhältnisse Glucose / Kreatinin auf die MeIQx-Bildung in einem Reaktionsaroma bestehend aus Rindfleischextrakt unter Zusatz von Glucose; aw = 0,75 ; 125 ° C; 6 h, Trockenschrank; verschraubbare Zentrifugengläser 80 ml

Auch unter Verwendung einer komplexen Matrix wie Rindfleischextrakt ist wie bei den Modellen (Kap. 3.2.1) ein ambivalentes Verhalten der reduzierenden Zucker bei der HAA-Bildung zu beobachten.

Unter wasserarmen Bedingungen wird beim Zusatz von Xylose maximal 43 % mehr MeIQx, bei einem Molmengenverhältnis von Xylose zu Kreatinin von 3 : 1 aber 13 % weniger MeIQx nachgewiesen als bei reinem Fleischextrakt (Abb. 69). Wird hingegen Glucose zugesetzt, kann sogar maximal 117 % mehr MeIQx nachgewiesen werden als bei reinem Fleischextrakt. Beträgt das Molmengenverhältnis von Glucose zu Kreatinin 3 : 1, wird nur noch 33 % mehr MeIQx gebildet als bei reinem Fleischextrakt.

Beim Zusatz von Xylose zu Fleischextrakt konnte also auch unter wasserarmen Bedingungen, anders als bei den Untersuchungen von Vollenbröcker [46], keine vollständige Unterdrückung der HAA-Bildung beobachtet werden. Allerdings wird unter wasserarmen Bedingungen beim Zusatz von Xylose zu Rindfleischextrakt nur etwa ein Drittel der Menge an MeIQx gebildet als beim Zusatz von Glucose.

6 Zusammenfassung

Heterocyclische aromatische Amine (HAAs) gehören zu den Verbindungen, die bei Menschen Krebs auslösen können und im Ames-Test eine hohe Mutagenität aufweisen. Unsere Arbeit beschäftigte sich mit den Einflüssen der chemischen Zusammensetzung und der Reaktionsbedingungen auf die Bildung von heterocyclischen aromatischen Aminen (HAAs) in Modellsystemen und Reaktionsaromen. Im Sinne des vorbeugenden Verbraucherschutzes war unser vorrangiges Ziel, die Bildung der HAAs, die während der Erhitzung von Lebensmitteln entstehen, zu vermindern.

Aminoimidazoazaarene (AIAs) werden bereits unter haushaltsüblichen Bedingungen während des Kochens und Bratens gebildet. Im Vergleich mit anderen HAAs geht von ihnen das größte mutagene Potential aus. Den Großteil aller aufgenommenen HAAs stellen AIAs dar. Aufgrund der oben genannten Gründe war der Schwerpunkt unserer Arbeit auf die Bildung dieser Verbindungsgruppe ausgerichtet.

Insbesondere bei sehr hohen Temperaturen erreicht die HAA-Bildung innerhalb kurzer Zeit ein Maximum. Mit steigender Temperatur nehmen nicht nur die gebildeten Mengen der HAAs, sondern auch die Anzahl der Störsubstanzen, die eine Analytik erschweren, in erheblichen Umfang zu. Von einigen Autoren wird beschrieben, dass beim Vorliegen dieser hoherhitzten Matrixbestandteile die Nachweisgrenze der HAAs derart hoch ist, dass sie in Anbetracht der geringen Mengen nicht mehr nachzuweisen sind.

Ausgehend von den in der Literatur beschriebenen Methoden haben wir Aufarbeitungsmethoden weiterentwickelt und optimiert, die es uns ermöglichen, HAAs auch in hoherhitzten Modellen und Reaktionsaromen, die ein komplexeres Produktspektrum aufweisen, nachzuweisen und zu bestimmen.

Von einem Autor [89] wird berichtet, dass bei der Verwendung von Methanol als Extraktionsmittel die Wiederfindung der untersuchten HAAs in wasserarmen, hoherhitzten Reaktionsaromen lediglich bei 10 % lag. Da der Schwerpunkt unserer Untersuchungen auf wasserarme Systeme ausgerichtet war, haben wir Standardmelanoidine [119], die zuvor nach ihrer Molekülgröße fraktioniert wurden, mit HAAs dotiert, gefriergetrocknet und mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert. In unseren Untersuchungen waren Rehydratisierungsprobleme zu beobachten. Insbesondere bei hochmolekularen Melanoidinfraktionen > 100.000 Dalton konnten die HAAs Harman, Norharman, PhIP und MeAαC durch die Verwendung organischer Lösungsmittel nicht wieder gefunden werden. Erst bei einer Extraktion mit verdünnter Salzsäure ließen sich alle HAAs wieder finden.

Die Aufarbeitung der HAAs erfolgte nach saurer Extraktion über Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan und anschließender Extraktion an einer SCX-Festphase. Anschließend wurden die HAAs nach Hochdruckflüssigkeitschromatographie mittels Diodenarray-, Fluoreszenz- und elektrochemischem Detektor sowie Massenspektrometer identifiziert und quantifiziert. Die von uns untersuchten HAAs wurden an einer Supersphere RP-select b (4 µm) Festphase, die in 250 mm langen Narrowborsäulen gefüllt war, chromatographisch über einen Gradienten aus Triethylammoniumphosphatpuffer (pH 3 oder 7) oder Ammoniumformiatpuffer (pH 3) und Acetonitril getrennt. Die Ergebnisse konnten mit einer von Frandrup-Kuhr [123] entwickelten GC-MS Methode abgesichert werden.

Vollenbröker [46] konnte beobachten, dass ein Zusatz von 200 mg Xylose zu 1 g Fleischextrakt zu einer völligen Unterdrückung der HAA-Bildung während der Erhitzung führte. Die Verwendung von Xylose bei der Herstellung von Reaktionsaromen wird vom Gesetzgeber nicht beschränkt. Des Weiteren liegen kaum Untersuchungen zum Einfluss der Xylose auf die HAA-Bildung vor. Da sich die Untersuchungen von Vollenbröker nur auf wasserreiche, unter Bedingungen der Langzeit-Niedertemperatur-Erhitzung hergestellte Reaktionsaromen beschränkten, haben wir den Einfluss der Xylose auf die HAA-Bildung auch in wasserarmen Modellsystemen untersucht und mit dem Einfluss der Glucose auf die HAA-Bildung unter identischen Bedingungen verglichen. Wir konnten feststellen, dass bei der Verwendung von Xylose deutlich weniger HAAs gebildet werden als bei der Verwendung von Glucose. Bemerkenswert ist, dass in Modellsystemen, die aus Xylose, Glycin und Kreatinin zusammengesetzt waren, neben MeIQx und 7,8-DiMeIQx als Hauptkomponente – im Widerspruch zur „Las-Vegas“-Bildungshypothese – auch 4,8-DiMeIQx gebildet wurde, während in Modellsystemen aus Glucose, Glycin und Kreatinin nur MeIQx und 7,8-DiMeIQx nachgewiesen werden konnten. In diesem Zusammenhang soll darauf hingewiesen werden, dass anderen Untersuchungen [123] zufolge das Xylose-Abbauprodukt Furfural die Bildung von 4,8-DiMeIQx fördert.

Wichtige Einflussgrößen auf die HAA-Bildung sind die Molmengenverhältnisse von reduzierenden Zuckern zu Kreatinin, die Temperatur, der Wassergehalt und die Erhitzungsdauer. In unseren Untersuchungen haben wir diese Einflussgrößen in entsprechenden Modellsystemen untersucht.

Bei den Untersuchungen der Molmengenverhältnisse der Reaktanden ist ein ambivalentes Verhalten der eingesetzten reduzierenden Zucker Xylose und Glucose in Bezug auf die HAA-Bildung zu beobachten, wobei das Maximum der HAA-Bildung bei einem Molmengenverhältnis der reduzierenden Zucker zu Glycin und Kreatinin von 0,5 : 1 : 1 liegt.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen des Einflusses der Molmengenverhältnisse von reduzierenden Zuckern zu Aminosäuren und Kreatinin unter wasserreichen Bedingungen [50]. In den folgenden Versuchen wurde das oben genannte Molmengenverhältnis der Reaktanden eingehalten.

In unseren Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf die HAA-Bildung in Xylose bzw. Glucose enthaltenden Modellen setzt die HAA-Bildung bei einer Temperatur von 100 °C ein, steigt mit zunehmender Erhitzungstemperatur an und erreicht ein temperaturabhängiges Maximum. Während die Bildung von 4,8-DiMeIQx in den Xylose enthaltenden Modellen bereits ab 100 °C einsetzt, kann diese Verbindung in den Glucose enthaltenden Modellen erst ab 140 °C in Spuren nachgewiesen werden. Im gesamten Temperaturbereich ist die gebildete Menge aller von uns nachgewiesenen HAAs bei der Verwendung von Xylose deutlich geringer als bei der Verwendung von Glucose.

In unseren Untersuchungen zum Einfluss der Wasseraktivität (a_w) auf die HAA-Bildung wurden Xylose bzw. Glucose enthaltende Modellsysteme in einem Bereich von $a_w = 0,33$ bis $0,88$ untersucht. Die HAA-Bildung steigt mit dem a_w -Wert kontinuierlich an. Sowohl unter den Bedingungen der Niedertemperatur-Langzeit-Erhitzung als auch der Hochtemperatur-Kurzzeit-Erhitzung werden in den Xylose enthaltenden Modellen weniger HAAs gebildet als in den Glucose enthaltenden Modellen.

Bei Untersuchungen zum Einfluss der Reaktionszeit wurden selbst nach einer zehnstündigen Erhitzung bei 100 °C nur geringe Mengen an HAAs gebildet. Bei 160 °C erfolgte hingegen ein rascher Anstieg der Bildung von HAAs innerhalb von Minuten. Der Temperatureinfluss und die Wirkung anderer reaktionsbeschleunigender Einflussgrößen ist bei der Verwendung der Xylose deutlich geringer als bei der Verwendung von Glucose.

Durch weitere Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass die Bildung der HAAs beim Einsatz von Pentosen gegenüber der Verwendung von Hexosen generell vermindert ist. Bei der Verwendung von 2-Desoxyzuckern, aus denen α -Dicarbonylverbindungen zumindest nicht direkt hervorgehen können, ist praktisch keine HAA-Bildung zu beobachten.

Bei der Verwendung von Alanin anstelle von Glycin als Aminosäure wird sowohl in Xylose als auch Glucose enthaltenden wasserarmen Modellsystemen in Übereinstimmung mit der „Las-Vegas-Hypothese“ kein 7,8-DiMeIQx, dafür aber 4,8-DiMeIQx gebildet. Entgegen der „Las-Vegas-Hypothese“ kann aber MeIQx nachgewiesen werden. Bei den Glucose enthaltenden Modellen ist MeIQx sogar Hauptbestandteil der gebildeten HAAs.

In den untersuchten wasserarmen Modellen werden – entgegen der „Las-Vegas-Hypothese“ – auch in Abwesenheit von reduzierenden Zuckern HAAs gebildet. Beim Einsatz

von Glycin werden MeIQx und 7,8-DiMeIQx gebildet; beim Einsatz von Alanin kann lediglich MeIQx (in Spuren) nachgewiesen werden.

Wir konnten beobachten, dass sich die Ascorbinsäure sowohl in wässrigen als auch in wasserarmen Modellsystemen bei der HAA-Bildung ambivalent verhält. Das Maximum der Bildung von HAAs (MeIQx als Hauptprodukt) beim Einsatz von Ascorbinsäure, Glycin und Kreatinin liegt wie bei den reduzierenden Zuckern bei einem Molmengenverhältnis von 0,5 : 1 : 1. Somit kann der in der Literatur gefundene Widerspruch, dass die Ascorbinsäure die HAA-Bildung sowohl fördert, als auch hemmt, dadurch erklärt werden, dass – analog zu Glucose – sowohl über als auch unter dem Bildungsmaximum liegende Mengen an Ascorbinsäure die HAA-Bildung verringern. In wässrigen Modellen erfolgt die maximale MeIQx-Bildung bei einem pH-Wert von 7 und nimmt kontinuierlich mit fallendem pH-Wert ab; ab einem pH-Wert von 4 kann kein MeIQx mehr nachgewiesen werden. Während in wässrigen Systemen nur MeIQx nachgewiesen wird, kann unter wasserarmen Bedingungen neben MeIQx in Analogie zu Hexosen auch 7,8-DiMeIQx nachgewiesen werden. Beim Einsatz von Natriumascorbat in wasserarmen Modellen wurde eine deutlich größere Menge an MeIQx und 7,8-DiMeIQx gebildet. Schwermetallionen katalysieren zwar den oxidativen Abbau der Ascorbinsäure, deren Abbauprodukte die HAA-Bildung fördern, dennoch kann weder beim Einsatz von Eisen- noch von Kupferionen ein nennenswerter Einfluss auf die HAA-Bildung beobachtet werden.

Als Zwischenstufen der Maillardreaktion, die gemäß der „Las-Vegas-Hypothese“ für die HAA-Bildung verantwortlich gemacht werden, haben wir Methylpyridine bzw. Methylpyrazine und Formaldehyd bzw. Acetaldehyd mit Kreatinin erhitzt, konnten aber keine HAAs nachweisen. Da man HAAs auch in kreatin- bzw. kreatininfreien Lebensmitteln nachweisen konnte, wurde diskutiert, ob neben Kreatin/Kreatinin Arginin als Reaktionspartner in Frage kommt. Aus diesem Grund haben wir in wasserarmen Modellsystemen Kreatinin durch Arginin ausgetauscht, konnten aber keine HAAs nachweisen.

Anschließend haben wir Reaktionsaromen auf der Grundlage von Fleischextrakt, dem Xylose bzw. Glucose zugesetzt wurde, untersucht. Beide Zucker verhalten sich in wässrigen Systemen identisch; eine völlige Unterdrückung der Bildung von HAAs konnte hier selbst bei einem dreifachen molaren Zuckerüberschuss im Verhältnis zu Kreatinin nicht erreicht werden. In wasserarmen Reaktionsaromen wird hingegen bei der Verwendung von Xylose deutlich weniger MeIQx gebildet als bei der Verwendung von Glucose.

7. Arbeitsvorschriften

7.1 Allgemein verwendete Geräte, Hilfsmittel, Chemikalien und Reagenzien

Vakuum-Rotationsverdampfer, Modell Rotavapor (Büchi, Esslingen/Fils)

Kühlschrank, 4 °C

Gefriertruhe, -18 °C

Gefriertrocknungsanlage Modell GT 2 (Leybold-Heraeus, Köln)

Trockenschrank (Binder, Tuttlingen, Typ: 1805330000202)

Reagenzglasschüttler, Typ Vibro-Fix VF2 (Janke & Kunkel, IKA-Werk, Staufen)

Automatische Mikroliterpipetten (Eppendorf)

Laborwaage Modell 1204 (Sartorius, Göttingen)

Analysenwaage Modell analytic (Sartorius, Göttingen)

Zentrifugengläser, 80 ml mit Gewinde, Schraubkappe und PTFE-Dichtung (Willers, Münster)

Schlitzsiebnutsche (Willers, Münster)

Blaubandfilter

Scheidetrichter, 250 ml (Willers, Münster)

Scheidetrichter, 100 ml (Willers, Münster)

Spitzkolben, 250 ml (Willers, Münster)

Spitzkolben, 25 ml (Willers, Münster)

Spitzkolben, 10 ml, NS 11,5 (Willers, Münster)

Magnetrührer IKA-Combimag RCH (Janke & Kunkel, IKA-Werk, Staufen)

Rührstäbchen 5 – 25 ml

pH-Meter CG 810 (Schott, Mainz)

pH-Elektrode (WTH, Weilheim)

Ultraschallbad Modell Sonorex TK 52 (Bandelin, Berlin)

Reagenzgläser („Sovirelgläser“ SVL 15), 10 ml, mit Gewinde, Schraubkappe und PTFE-Dichtung (Sovirel, Levallois-Perret, Frankreich)

Pasteurpipetten mit Gummisaugern

Voll- und Messpipetten, 5-25 ml (Brand, Wertheim)

Messkolben, 10 – 1000 ml (Brand, Wertheim)

Standzylinder, 25 – 300 ml (Brand, Wertheim)

Methanol, destilliert über KOH

Methanol für die HPLC LiChrosolv® (Merck 1.06007.5000)

Dichlormethan destilliert über $\text{NH}_4\text{OH} \times \text{HCl}$, Na_2CO_3

Acetonitril, HPLC-rein

HAA-Stammlösung, gelöst in Methanol (HPLC-rein):

HAA	mg/10 ml
IQ	11,82
MeIQ	10,57
IQx	8,51
MeIQx	13,87
4.8 DiMeIQx	8,12
7.8 DiMeIQx	8,39
Tri MeIQx	8,01
Norharman	23,63
Harman	11,02
PhIP	21,16
MeAaC	8,40

HAA-Standardlösungen, gelöst in Methanol (HPLC-rein):

Die Stammlösungen werden auf Konzentrationen von ca. 10 ng/μl (1 : 100), 1 ng/μl (1 : 1.000) und 0,1 ng/μl (1 : 10.000) verdünnt.

Lagerung der HAAs bei 4 °C

Anschrift der Lieferanten der HAAs:

Toronto Research Chemicals inc.

2 Brisbane Rd., North York, On. Canada M3J 2J8

Tel: (416) 665-9696

Fax: (416) 665-4439

info@trc-canada.com

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Postfach, D-82039 Deisenhofen

7.2 Probenaufbereitung

7.2.1 Extraktion

Geräte und Hilfsmittel:

Zentrifugenglas 80 ml, desaktiviert

Rührfisch

Schlitzsiebnutsche

Blaubandfilter

Scheidetrichter, 250 ml

Chemikalien:

Salzsäure 1N p.a.

IST-Lösung: 4,7,8-TriMeIQx in Methanol (wahlweise ca. 1 oder 10 ng/μl)

Arbeitsweise:

5 – 10 g Probe in ein Zentrifugenglas genau einwiegen, 100 μl IST-Lösung hinzufügen, mit 30 ml 1N Salzsäure versetzen und die saure Lösung (pH < 1) 12 Stunden (über Nacht) auf einem Magnetrührer rühren. Den Extrakt anschließend zentrifugieren (3000 U/min; 10 min) und den Überstand durch eine Schlitzsiebnutsche mit Blaubandfilter in einen deaktivierten Scheidetrichter (100 ml) überführen. Der Rückstand wird dreimal im Zentrifugenglas in je 10 ml 1 N Salzsäure suspendiert und anschließend zentrifugiert. Während des letzten Schrittes wird bei 4000 U/min zentrifugiert, um ein Verklumpen zu vermeiden, was eine weitere Suspension erschweren würde, sonst erfolgt die Zentrifugation bei 3000 U/min. Der Überstand wird durch die Schlitzsiebnutsche mit Blaubandfilter in den Scheidetrichter überführt.

7.2.2.1 Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan

Geräte und Hilfsmittel:

Zentrifugenglas 80 ml, deaktiviert

Rührfisch

Scheidetrichter 100 ml, deaktiviert

Scheidetrichter 250 ml

Spitzkolben 250 ml

Chemikalien und Reagenzien:

Salzsäure, rauchend p.a. 37 %

Salzsäure 1 N

Natronlauge 30 %

Ammoniaklösung: Wasser (Bidest) + Ammoniak 25 %; 9 + 1 (v + v)

Arbeitsweise:

Der pH-Wert des Extraktes aus 7.2.1 wird mit einem pH-Meter überprüft und gegebenenfalls mit konz. Salzsäure auf einen pH-Wert < 1 eingestellt. Das Extrakt wird 3 x mit 50 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und die organische Phase verworfen. Die wässrige Phase wird mit Natronlauge auf einen pH-Wert > 12 eingestellt und 3 x mit 50 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden direkt in einen Scheidetrichter (250 ml) überführt und mit 100 ml Ammoniaklösung pH-Wert > 10 ausgeschüttelt. Die vereinigten

organischen Phasen werden in einen Spitzkolben (250 ml) überführt und bei ca. 40 °C am Vakuum-Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft.

7.2.2.2 Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan an Extrelut

Geräte und Hilfsmittel:

Glassäule, 100 ml

Glassäule, 6 ml

Glastrichter

Faltenfilter

Glaswatte

Glasfaserfilter

Spitzkolben 25 ml

Chemikalien:

Extrelut-Kartusche:

In Glassäule (100 ml) Glaswatte und Glasfaserfilter einsetzen. Mit 15 g Extrelut NT (Merck, 1.150692.1000) auffüllen und mit einem Glasfaserfilter verschließen.

Kieselgel-Kartusche (5 % Wassergehalt):

Kieselgel 60 (Merck) 24 h bei 120 °C im Trockenschrank trocknen. Nach dem Abkühlen 95 g Kieselgel mit 5 g Wasser versetzen und die Mischung homogenisieren. Glaswatte und Glasfaserfilter in eine Glassäule (6 ml) einsetzen. Mit 500 mg Kieselgel auffüllen und mit einem Glasfaserfilter verschließen.

Salzsäure 1N

Kalilauge 14 N

Methanolische Salzsäure, 0,1 N: 100 ml 1 N Salzsäure mit Methanol auf 1 l auffüllen

Arbeitsweise:

2 – 3 g Probe werden in ein Zentrifugenglas eingewogen, mit 100 µl IST und 10 ml 1 N Salzsäure (pH-Wert < 1) versetzt. Anschließend 12 h (über Nacht) rühren. Mit 2 ml Kalilauge (pH-Wert > 12) versetzen, zentrifugieren (3000 U/min) und den Überstand durch ein Faltenfilter auf eine Extrelut-Kartusche überführen. Die Kartusche auf eine Kieselgel-Kartusche stecken und den Rückstand aus dem Zentrifugenglas 3 x in 25 ml Dichlormethan suspendieren, zentrifugieren und den Überstand durch den Faltenfilter auf die Extrelutkartusche überführen. Die Tropfgeschwindigkeit sollte 1 bis 3 Tropfen pro Sekunde betragen. Die Extrelutkartusche wird verworfen und die Kieselgel-Kartusche mit 3 x 3 ml Dichlormethan (puriss.) gewaschen. Mit einer Wasserstrahlpumpe die Kieselgel-Kartusche 1 min lang trocken saugen. Die Elution erfolgt mit 3 x 3 ml methanolischer Salzsäure in einen Spitzkolben (25 ml). Das Eluat wird am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft.

7.2.3 Festphasenextraktion

Geräte und Hilfsmittel:

Absaugereinheit (Spezialanfertigung der Glasbläserei der Universität Münster)
Spitzkolben 10 ml

Chemikalien und Reagenzien:

Salzsäure 0,1 N
Extraktionssäule Lichrolut SCX (500 mg, 3 ml) (Merck, Art. 1.02022.0001)
Methanolischer Ammoniak:
Methanol + konz. Ammoniak, 50 + 2 (v + v)

Arbeitsweise:

Die SCX-SPE-Kartusche wird mit 3 ml Methanol für ca. 30 min konditioniert und anschließend mit 3 x 3 ml Wasser gewaschen.

Der trockene Rückstand aus 7.2.2.1 bzw. 7.2.2.2 wird in 12 ml heißer Salzsäure gelöst und nach dem Abkühlen mit einer Pasteurpipette auf die SCX-SPE-Kartusche überführt. Es wird 3 x mit 3 ml Salzsäure nachgespült. Die SCX-SPE-Kartusche wird erst mit 21 ml Salzsäure und anschließend mit 3 x 3 ml Wasser gewaschen. Die Elution erfolgt mit 2 x 3 ml methanolischem Ammoniak in einen Spitzkolben (10 ml). Das Eluat wird zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 100 µl Methanol aufgenommen und mit einer Kolbenhubpipette in ein Autosamplergefäß überführt.

7.3 Bestimmung der HAAs durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Geräte und Hilfsmittel:

HPLC-Pumpe (Merck)
Probenaufarbeitungssystem (50 µl), Rheodyne Schleifeninjektor 7125 (Fa. Techlab, Erkerode)
Diodenarray-Detektor L-7450 Merck mit Hochdruck-Durchflußzelle
Ampèrometrischer Detektor Star 9080 (Fa. Varian, Darmstadt)
Fluorescence Spectrometer RF 530 (Fa. Shimadzu, Duisburg)

Einstellungen der Software D-7000 HPLC System Manager für DAD:

Spectral Bandwidth	7 nm
Spectral Interval	400 msec
Absorbance Mode	0,2 AU
Wavelength Range	200 – 400 nm

Monitoring Wavelength	265 nm (pH 3) bzw. 273 nm (pH 7)
Noise	10
Smoothing	OFF
Sensitivity	N-Method
Purity Threshold	0,950

Einstellungen am Fluoreszenz-Detektor:

Time Constant	1 sec
Sensitivity	10
EX Wavelength	333 nm
EM Wavelength	388 nm

Einstellungen am amperometrischen Detektor:

Wall-Jet Meßzelle	Kohlenstoffelektrode, Ag/AgCl-Referenz, 50 µm Spacer (1 ml/min), 10 µm Spacer (0,3 ml/min)
Modus	DC
Potential	+ 1,05 V (TEAP pH 3) oder + 0,75 (TEAP pH 7)
Range	50 µA

7.3.1 Herstellung des Triethylammoniumphosphat-Puffers (pH 3,2)

Chemikalien und Reagenzien:

Triethylammoniumphosphat-Puffer (TEAP), 1 M, pH 3,2:

10,119 g Triethylamin (Fluka, 90340) einwiegen und mit 30 ml Wasser versetzen. Auf einem Eisbad vorsichtig mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 3 einstellen und auf 100 ml auffüllen. Im Kühlschrank bei 4 °C lagern.

Phosphorsäure, 0,1 M (aus konz. Phosphorsäure)

7.3.3.1 LiChrospher 60 RP-select b (5 µm), 250 x 4 mm, 1 ml/min

Arbeitsweise:

Mobile Phase A:

10 ml TEAP (pH 3,2) mit Wasser auf 1 l auffüllen. Den pH-Wert mit 0,1 M Phosphorsäure auf 3,1 einstellen.

Mobile Phase B:

5 ml TEAP (pH 3,2) mit Wasser auf 500 ml auffüllen. Den pH-Wert mit 0,1 M Phosphorsäure auf 3,1 einstellen und anschließend mit 500 ml Acetonitril versetzen. Nach dem Durchmischen im Ultraschallbad entgasen.

HPLC-Parameter:

Stationäre Phase: Lichrospher 60 RP-select b (5 µm), 250 mm x 4 mm
Gradient: Mobile Phase A + Mobile Phase B: Von 90 + 10 auf 10 + 90 nach 20 min, 5 min isokratisch bei 10 + 90; in 2 min auf 90 + 10; 13 min isokratisch bei 90 + 10
Flussrate: 1 ml/min
Injektionsvolumen: 20 µl

7.3.1.2 Supersphere RP-select b (4 µm), 250 mm x 2 mm, 0,2 ml/min**Arbeitsweise:**

Mobile Phase A:

10 ml TEAP (pH 3,2) mit Wasser auf 1 l auffüllen. Den pH-Wert mit 0,1 M Phosphorsäure auf 3,1 einstellen.

Mobile Phase B:

5 ml TEAP (pH 3,2) mit Wasser auf 500 ml auffüllen. Den pH-Wert mit 0,1 M Phosphorsäure auf 3,1 einstellen und anschließend mit 500 ml Acetonitril versetzen. Nach dem Durchmischen im Ultraschallbad entgasen.

HPLC-Parameter:

Stationäre Phase: Supersphere RP-select b (4µm), 250 mm x 2 mm
Gradient: Mobile Phase A + Mobile Phase B: Von 90 + 10 auf 10 + 90 nach 20 min, 15 min isokratisch bei 10 + 90; in 2 min auf 90 + 10; 13 min isokratisch bei 90 + 10
Flussrate: 0,2 ml/min
Injektionsvolumen: 5 µl

7.3.1.3 Supersphere RP-select b (4 µm), 250 mm x 3 mm, 0,3 ml/min**Arbeitsweise:**

Mobile Phase A:

10 ml TEAP (pH 3,2) mit Wasser auf 1 l auffüllen. Den pH-Wert mit 0,1 M Phosphorsäure auf 2,8 einstellen.

Mobile Phase B:

5 ml TEAP (pH 3,2) mit Wasser auf 500 ml auffüllen. Den pH-Wert mit 0,1 M Phosphorsäure auf 3,2 einstellen und anschließend mit 500 ml Acetonitril versetzen. Nach dem Durchmischen im Ultraschallbad entgasen.

HPLC-Parameter:

Stationäre Phase: Supersphere RP-select b (4µm), 250 mm x 3 mm
Gradient: Mobile Phase A + Mobile Phase B: Von 96 + 4 auf 50 + 50 nach 30 min, nach 10 min auf 10 + 90; 10 min isokratisch bei 10 + 90, in 5 min auf 96 + 4; 15 min isokratisch bei 96 + 4
Flussrate: 0,3 ml/min
Injektionsvolumen: 5 µl

**7.3.2 Herstellung des Ammoniumformiat-Puffer (pH 3,2),
Supersphere RP-select b (4 µm), 250 x 3 mm, 0,3 ml/min****Chemikalien und Reagenzien:**

Ammoniumformiat-Puffer (AF), 1 M, pH 3,2:

6,306 g Ammoniumformiat einwiegen und mit 30 ml Wasser versetzen. Vorsichtig mit konz. Ameisensäure auf einen pH-Wert von 3,2 einstellen und auf 100 ml auffüllen. Im Kühlschrank bei 4 °C lagern.

Ameisensäure, 0,1 M (aus konz. Ameisensäure)

Arbeitsweise:

Mobile Phase A:

10 ml AF (pH 3,2) mit Wasser auf 1 l auffüllen. Den pH-Wert überprüfen und gegebenenfalls mit 0,1 M Ameisensäure einstellen.

Mobile Phase B:

5 ml AF (pH 3,2) mit Wasser auf 500 ml auffüllen. Den pH-Wert überprüfen und gegebenenfalls mit 0,1 M Ameisensäure einstellen und anschließend mit 500 ml Acetonitril versetzen. Nach dem Durchmischen im Ultraschallbad entgasen.

HPLC-Parameter:

Stationäre Phase: Supersphere RP-select b (4µm), 250 mm x 3 mm
Gradient: Mobile Phase A + Mobile Phase B: Von 90 + 10 auf 45 + 55 nach 30 min, nach 10 min auf 0 + 100; 15 min isokratisch bei 0 + 100, in 5 min auf 90 + 10; 20 min isokratisch bei 90 + 10
Flussrate: 0,3 ml/min
Injektionsvolumen: 5 µl

7.3.3 Triethylammoniumphosphat-Puffer (pH 7)

Chemikalien und Reagenzien:

Triethylammoniumphosphat-Puffer (TEAP), 1 M, pH 7:

10,119 g Triethylamin einwiegen und mit 30 ml Wasser versetzen. Auf einem Eisbad vorsichtig mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 7 einstellen und auf 100 ml auffüllen. Im Kühlschrank bei 4 °C lagern.

Phosphorsäure, 0,1 M (aus konz. Phosphorsäure)

7.3.3.1 Lichrospher 60 RP-select b 250 mm x 4 mm, 1 ml/min

Arbeitsweise:

Mobile Phase A:

10 ml TEAP (pH 7) mit Wasser auf 1 l auffüllen. Den pH-Wert überprüfen und gegebenenfalls mit 0,1 M Phosphorsäure einstellen.

Mobile Phase B:

5 ml TEAP (pH 7) mit Wasser auf 500 ml auffüllen. Den pH-Wert überprüfen und gegebenenfalls mit 0,1 M Phosphorsäure einstellen und anschließend mit 500 ml Acetonitril versetzen. Nach dem Durchmischen im Ultraschallbad entgasen.

HPLC-Parameter:

Stationäre Phase: Lichrospher 60 RP-select b (5µm), 250 mm x 4 mm

Gradient: Mobile Phase A + Mobile Phase B: Von 90 + 10 auf 10 + 90 nach 25 min, 5 min isokratisch bei 10 + 90; in 5 min auf 90 + 10; 13 min isokratisch bei 90 + 10

Flussrate: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl

7.3.3.2 Supersphere RP-select b (4µm) 250 mm x 4 mm, 0,3 ml/min

Arbeitsweise:

Mobile Phase A:

10 ml TEAP (pH 7) mit Wasser auf 1 l auffüllen. Den pH-Wert überprüfen und gegebenenfalls mit 0,1 M Phosphorsäure einstellen.

Mobile Phase B:

5 ml TEAP (pH 7) mit Wasser auf 500 ml auffüllen. Den pH-Wert überprüfen und gegebenenfalls mit 0,1 M Phosphorsäure einstellen und anschließend mit 500 ml Acetonitril versetzen. Nach dem Durchmischen im Ultraschallbad entgasen.

HPLC-Parameter:

Stationäre Phase: Supersphere RP-select b (4µm), 250 mm x 3 mm
Gradient: Mobile Phase A + Mobile Phase B: Von 80 + 20 auf 0 + 100 nach 20 min, 30 min isokratisch bei 0 + 100; in 5 min auf 80 + 20; 20 min isokratisch bei 80 + 20
Flussrate: 0,3 ml/min
Injektionsvolumen: 5 µl

7.4 Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Modellsystemen, Fleischextrakt und Reaktionsaromen durch HPLC**7.4.1 Probenaufbereitung****Geräte und Hilfsmittel:**

Autosamplergefäße (Hewlett-Packard, Waldbronn)

Chemikalien und Reagenzien:

Ethanol, 96 % (v/v)

Ethanol, 70 % (v/v)

Boratpuffer, 0,4 N (pH 10,4)

Arbeitsweise:

1g der Probe in einen 50 ml Messkolben genau einwiegen, mit 12,5 ml Wasser versetzen und im Ultraschallbad 10 min extrahieren. Danach mit 30,5 ml 96prozentigem Ethanol versetzen, umschwenken und mit 70prozentigem Ethanol auf 50 ml auffüllen. Einen Teil der Lösung bei 4000 U/min zentrifugieren und 100 µl des klaren Überstandes im Autosamplergefäß mit 900 µl Boratpuffer versetzen.

7.4.2 Derivatisierung von Aminosäuren; Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)**Geräte und Hilfsmittel:**

HPLC HP Serie 1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn)

- Hochdruckgradientenpumpe
- Vakuumdegaser
- Thermostatischer Autosampler
- Säulenofen
- Diodenarray-Detektor (DAD)
- Fluoreszenz-Detektor

- Auswertesoftware HP-ChemStation Vers. 4.06

Autosamplergefäße (Hewlett-Packard, Waldbronn)

Chemikalien und Reagenzien:

Aminosäure-Standardlösung, 1 mg / 100 ml

OPA-Reagenz (50 mg ortho-Phthalaldehyd und 1 ml Mercaptopropionsäure in 10 ml Boratpuffer)

Boratpuffer, 0,4 N (pH 10,4)

Natriumacetat-Trihydrat

Triethylamin (TEA)

Essigsäure, 96 %

Tetrahydrofuran (THF)

Arbeitsweise:

Automatische Vorsäulenderivatisierung (Autosampler der HP Serie 1100):

Die Vorsäulenderivatisierung erfolgte automatisiert im Autosampler, indem durch ein Injektionsprogramm 5 µl Boratpuffer, 1 µl OPA-Reagenz und 1 µl Probe/Standard aus getrennten Autosamplergefäßen in die Injektionsschleife gezogen werden. Durch mehrmaliges Auf- und Niederziehen innerhalb der Injektionsschleife werden die Lösungen gemischt und anschließend injiziert.

Injektionsprogramm: Draw 5 µl from vial 10 (Boratpuffer), draw 1 µl from vial 11 (OPA), draw 0 µl from vial 12 (Wasser), draw 1 µl from vial 13 (Probe/Standard), draw 1 µl from vial 12 (Wasser), mix 8 µl in seat (max speed, six times), inject.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie:

Säule: Speziälsäule für Aminosäureanalytik 200 x 2,1 mm (79916AA-572, Hewlett-Packard, Waldbronn)

Flussrate: 0,45 ml/min

Säulenofen: 40 °C

Mobile Phase A: 0,020 M Natriumacetat + 0,018 % (v/v) TEA (pH 7,2 mit 1-2 % Essigsäure eingestellt) + 0,3 % (v/v) THF

Mobile Phase B: 20 % (v/v) 0,1 M Natriumacetat (pH 7,2 mit 1-2 % Essigsäure eingestellt), 40 % (v/v) Acetonitril, 40 % (v/v) Methanol

Gradient: Von 15 % B auf 30 % B in 15 min; von 30 % B auf 70 % B in 15 min; von 70 % B auf 100 % B in 5 min; 5 min isokratisch bei 100 % B; von 100 % B auf 15 % B in 5 min; 10 min isokratisch bei 15 % B

DAD-Detektor: Extinktion 338, Spalt 10 nm (Referenz: 390/20 nm)

Fluoreszenz-Detektor: Extinktion 340 nm, Emission 450 nm, Cut off Filter 280 nm, PTM gain 10

Auswertung: Software ChemStation Version 4.06

Auswertung:

Die Auswertung zur Identifizierung und Quantifizierung der primären Aminosäuren erfolgt nach der Methode des externen Standards. Neben dem Vergleich der Retentionszeiten und der Extinktionsspektren (DAD) ist aufgrund des eingesetzten, schnell-scanenden Fluoreszenz-Detektors ein Vergleich der Emissionsspektren zur Identifizierung der Aminosäuren möglich.

7.5 Bestimmung der HAAs durch LC-MS

HPLC-System:

Lösungsmittelentgaser:	HP Series 1100, Modell G 1322A (Fa. Agilent, Waldbronn)
Thermostatelement:	HP Series 1100, Modell G 1330, mit Säulenhaltung G 1316A
HPLC-Pumpe:	HP Series 1100, Modell G 1311 A, Austausch der Hochdruckmischkammer von 500 µl auf 12 µl
Autosampler:	HP Series 1100, Modell G 1329 A

MS-MS System:

Massenspektrometer:	Micromass Quattro LC, Manchester UK
Interface:	ESI-Interface: Nebulizer-Gas 84 l N ₂ /h, Desolvation-Gas 855 l N ₂ /h Tuning Parameter ES+: Kapillarspannung 3,5 kV; Extraktor 5 V; RF-Lens 0,2 V; Source Block Temperature 110 °C; Desolvation Temperature 300 °C
MS1:	Entrance 80,0 V; Exit 80,0 V; Ion Energy 0,9 V, Ion Energy Ramp 0,0 V; LM Resolution 14,0; HM Resolution 14,0;
MS 2:	Ion Energy 3V; Ion Energy Ramp 0,0 V; LM Resolution 12,5; HM Resolution 12,5
Detektor:	Dwell-Time 100 ms, Interchannel delay 0 s; 650 V

Chemikalien und Reagenzien:

Ammoniumformiat-Puffer (AF), 1 M, pH 3,2:

6,306 g Ammoniumformiat einwiegen und mit 30 ml Wasser versetzen. Vorsichtig mit konz. Ameisensäure auf einen pH-Wert von 3,2 einstellen und auf 100 ml auffüllen.

Im Kühlschrank bei 4 °C lagern.

Ameisensäure, 0,1 M (aus konz. Ameisensäure)

Arbeitsweise:

Mobile Phase A:

10 ml AF (pH 3,2) mit Wasser auf 1 l auffüllen. Den pH-Wert überprüfen und gegebenenfalls mit 0,1 M Ameisensäure einstellen.

Mobile Phase B:

5 ml AF (pH 3,2) mit Wasser auf 500 ml auffüllen. Den pH-Wert überprüfen und gegebenenfalls mit 0,1 M Ameisensäure einstellen und anschließend mit 500 ml Acetonitril versetzen. Nach dem Durchmischen im Ultraschallbad entgasen.

HPLC-Parameter:

Stationäre Phase: Supersphere RP-select b (4µm), 250 mm x 3 mm

Gradient: Mobile Phase A + Mobile Phase B: Von 80 + 20 auf 0 + 100 nach 30 min, 25 min isokratisch bei 0 + 100, in 5 min auf 80 + 20; 20 min isokratisch bei 80 + 20

Flussrate: 0,15 ml/min

Injektionsvolumen: 5 µl

Detektion der HAAs durch ESI-MRM (multiple reaction monitoring):

HAA	Übergang m/z	Collision-Energie (eV)	Cone Voltage
IQ	199,2 > 157,1	37	45
	199,2 > 184,1	27	45
IQx	200,3 > 159,2	20	45
	200,3 > 185,2	29	45
MeIQ	213,4 > 145,1	27	45
	213,4 > 198,2	27	45
MeIQx	214,4 > 173,0	24	45
	214,4 > 199,3	28	45
4,8-DiMeIQx und 7,8-DiMeIQx	228,4 > 160,2	30	40
	228,4 > 213,3	26	40
4,7,8-TriMeIQx	242,2 > 145,0	40	50
	242,2 > 227,2	30	50
Norharman	169,0 > 115,0	50	35
	169,0 > 140,0	35	35
Harman	183,3 > 115,0	34	50
	183,3 > 168,2	28	50
PhIP	225,4 > 140,2	56	48
	225,4 > 210,0	29	48
MeAαC	198,4 > 181,2	23	40
	198,4 > 183,2	23	40

7.6 Gaschromatographie-Massenspektrometrie der HAAs

Chemikalien und Reagenzien:

N-(tert-Butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluor-acetamid (MTBSTFA, ABCR SIB 1966)

tert.-Butyldimethylchlorsilan (TBDMCS, Fluka 19905)

Acetonitril, destilliert und über Molekularsieb gelagert

Arbeitsweise:

Die gereinigten Extrakte werden zur Trockene eingedampft und in 100 µl Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von 100 µl MTBSTFA mit 1 % TBDMCS wird diese Mischung 30 min im Trockenschrank bei 70°C erhitzt. Das Reaktionsgemisch kann ohne weitere Abtrennung des Reagenzes zur Gaschromatographie eingesetzt werden.

Trennparameter:

Kapillar-Säule J&W DB-1, 60,0 m x 0,25 mm, 0,25 µm;

Positive Chemische Ionisation: CI-Gas: Ammoniak 3,8 W, 0,9 ml/min Direkteinlass, SIM-Modus (jeweils $[M + H]^+$);

Inlet: Pulsed Splitless, 300 °C; Initial Temp: 180 °C; 5 min: 235 °C; 6 min: 270 °C; 16 min: 300 °C; 41 min: 320 °C; 66 min: 340 °C

7.7 Herstellung verschiedener Modellsysteme

Geräte und Hilfsmittel:

Löffel

Spatel

Metallschale

Mörser und Pistill

Kryo-Mühle

Parafilm

Temperatur geregelter Umluft-Trockenschrank

Chemikalien und Reagenzien:

Kreatinin

D-Glucose, D-Xylose, D-Fructose, D-Ribose, D-Arabinose, D-2-Desoxyglucose

D-2-Desoxyribose

Glycin, Alanin

L-Ascorbinsäure, L-Natriumascorbat

Fleischextrakt

Microcristalline Cellulose (Avicel), ca. 0,02 mm (Serva, Heidelberg)

Eisen-III-Chlorid-hexahydrat, Kupfer-II-Sulfat-petahydrat

2-Methylpyridin, 2-Methylpyrazin, 2,5-Dimethylpyrazin
Acetaldehyd, Formaldehydlösung 28%ig

7.7.1 Wasserarme Modellsysteme

Arbeitsweise:

Die modellspezifischen Komponenten werden genau eingewogen und in Wasser gelöst. Anschließend wird die Lösung unter Nachspülen mit Wasser auf mikrokristalline Cellulose (Avicel) gegeben und in einer Metallschüssel zu einem zähen Brei verrührt.

Nach dem Abdichten der Metallschüssel mit Parafilm wird die Probe über Nacht eingefroren und am nächsten Tag gefriergetrocknet. Nach Beendigung der Trocknung wird die Mischung gemörsert, noch einmal vermahlen und ein weiteres Mal getrocknet.

Zum Einstellen der Gleichgewichtsfeuchtigkeit wird das Pulver im Vakuumexsikkator eine Woche über einer gesättigten Salzlösung (vgl. Kap. 3.1.3 Tabelle 9) in verschraubbaren Zentrifugengläsern gelagert und täglich auf einem Reagenzglasschüttler für eine Minute geschüttelt. Der Wassergehalt wird durch Differenzwägung ermittelt.

Modelle auf Kreatininbasis werden mit 70 ml Wasser und 34 g Avicel auf 5 g Kreatinin angesetzt. Bei der Verwendung von Fleischextrakt werden Fleischextrakt und Avicel in den Verhältnissen 1 : 1 gemischt.

5 bis 10 g des Modellsystems, dessen aw-Wert eingestellt worden ist, werden in einem verschlossenen Zentrifugenglas im Umlufttrockenschrank erhitzt.

7.7.2 Wasserreiche Modellsysteme:

Chemikalien und Reagenzien:

Polyphosphatpuffer:

4,2588 g Dinatriumhydrogenphosphat + 11,0359 g Pentanatriumtriphosphat in 500 ml Wasser lösen und mit Phosphorsäure auf den gewünschten pH-Wert einstellen und auf 1 l auffüllen.

Arbeitsweise:

Die modellspezifischen Komponenten werden in ein desaktiviertes Zentrifugenglas genau eingewogen und wahlweise in Wasser oder Puffer gelöst und der pH-Wert gegebenenfalls mit Polyphosphatpuffer eingestellt. Nach dem Verschließen des Zentrifugenglases wird das Modellsystem wie unter 7.8.1 beschrieben im Umlufttrockenschrank erhitzt.

7.8 Bestimmung des Wassergehaltes

Geräte und Hilfsmittel:

Vakuumtrockenschrank mit Orangegel

Trockenschrank

Wägegläschen, Durchmesser 5 cm, 30 ml

Nickelschale, Durchmesser 7 cm

Pistill aus Glas

Seesand, gegläht bei 600 °C

Arbeitsweise:

2 bis 3 g des Modellsystems bzw. des Reaktionsaromas werden in ein Wägegläschen eingewogen und 2 h bei 70 °C im Vakuumtrockenschrank unter Vakuum getrocknet. Nach einer Abkühlzeit von 30 min im Exsikkator wird das Gewicht bestimmt. Es wird sechs weitere Male jeweils eine Stunde lang im Vakuumschrank getrocknet und nach dem Abkühlen im Exsikkator gewogen. Durch das Extrapolieren einer Geraden lässt sich der Wassergehalt graphisch ermitteln. Dabei werden nur die letzten 5 Messpunkte, die auch auf einer Geraden liegen und als Trockenmasse berechnet wurden, verwendet. 8 bis 10 g Fleischextrakt werden mit 20 bis 30 g Seesand in einer Nickelschale verrührt. Anschließend wird wie bei den Modellsystemen verfahren.

7.9 Desaktivierung von Glasgeräten

Geräte und Hilfsmittel:

Keine

Chemikalien und Reagenzien:

Dichlormethylsilan

Toluol

Desaktivierungsreagenz: 5 – 10 %ige Lösung von Dichlordimethylsilan in Toluol (in einer Braunglasflasche aufbewahren)

Arbeitsweise:

Das Glasgefäß vollständig mit Desaktivierungsreagenz füllen und das Reagenz 30 min lang einwirken lassen. Anschließend das Glasgefäß leeren und mit etwas Toluol und dann sofort mit Methanol nachspülen. Das Glasgefäß kann dann mit Wasser gespült werden und ist gebrauchsfertig.

Die Desaktivierung muss wiederholt werden, wenn sich beim Befüllen mit Wasser ein Meniskus bildet. Das Desaktivierungsreagenz kann mehrfach verwendet werden.

8 Literatur

- [1] **Doll R, Peto R**
J Natl Cancer Inst 66(6): 1192 – 1380 (1981)
- [2] **Bailey GS, Williams DE**
Food Technology 47(2): 105 –118 (1993)
- [3] **Williams G**
Food: It's role in etiology of cancer
In: The Book of Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects
K. W. Waldron, I. T. Johnson and G. R. Fenwick (Hrsg.)
The Royal Society of Chemistry
AFRC Institute of Food Research
Norwich 1995
- [4] **Becker N, Warendorf J**
Der Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990
Springer Verlag, 3. Auflage
Berlin 1997
- [5] **Pias P, Knize MG**
Journal of Chromatography B 747: 139-169 (2000)
- [6] **Skog K, Solyakov A**
Food and Chemical Toxicology 40: 1213-1221 (2002)
- [7] **Cairns J**
Das Krebsproblem.
In: Krebs - Tumoren, Zellen, Gene
Hrsg.: V. Schirrmacher
Spektrum Akademischer Verlag
Heidelberg (1990)
- [8] **Ames B N, McCann J, Yamasaki E**
Mutation Research 31: 347-364 (1975)
- [9] **Sugimura T, Nagao M, Kawachi T, Honda M, Yahagi T, Seino Y, Sato S, Matsokura N, Matsushima T, Shirai A, Sawamura M, Matsumoto H**
Origins of Human Cancer
Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA, Hrsg.
Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York (1977)
- [10] **Sugimura T, Kawachi T, Nagao M, Yahagi T, Seino Y, Okamoto T, Shudo K, Kosuke T, Tsuji K, Wakabayashi K, Itaka Y, Itai A**
Proceedings of the Japan Academy 53: 58 (1977)
- [11] **Kasai H, Nishimura S, Wakabayashi K, Nagao M, Sugimura T**
Proceedings of the Japan Academy 56: 382 (1980)

- [12] **Kasai H, Shiomi T, Sugimura T, Nishimura S**
Chem Lett 1981: 675
- [13] **Hatch FT**
Environ Health Persp 67: 93-97 (1986)
- [14] **Yoshida D, Matsumoto T, Yoshimura R, Matsuzaki T**
Biochem Biophys Res Comm 83: 915 (1978)
- [15] **Yamamoto T, Tsuji K, Kosuke T, Okamoto T, Shudo K, Takeda K, Iitaka Y, Yamaguchi K, Seino Y, Yahagi T, Nagao M, Sugimura T**
Proceedings of the Japan Academy 54: 248 (1978)
- [16] **Wakabayashi K, Tsuji K, Kosuke T, Takeda K, Yamagushi K, Shudo K, Okamoto Y, Yahagi T, Nagao M, Sugimura T**
Proceedings of the Japan Academy 54: 569 (1978)
- [17] **Yokota M, Narita K, Kosuke T, Wakabayashi K, Nagao M, Sugimura T, Yamagushi K, Shudo K, Iitaka Y, Okamoto T**
Chem Pharm Bull 29: 1473 (1981)
- [18] **Nukaya H, Watanabe H, Ishida H, Tsuji K, Suwa Y, Wakabayashi K, Nagao M, Sugimura T, Kosuke T**
Chem Pharm Bull 39: 533 (1991)
- [19] **Jägerstad M, Skog K, Arvidsson P, Solyakov A**
Food Res Technol 207: 419 (1998)
- [20] **Jackson LS, Hargraves WA**
J Agric Food Chem 43: 1678 (1995)
- [21] **Layton DW, Bogen KT, Knize MG, Hatch FT, Johnson VM, Felton JS**
Carcinogenesis 16: 39 (1995)
- [22] **Skog K, Solyakov A, Jägerstad M**
Food Chemistry 68: 299-308 (2000)
- [23] **Becher G, Knize MG, Nes IF, Felton JS**
Carcinogenesis 9: 247-253 (1988)
- [24] **Negishi C, Wakabayashi K, Yamaizumi Z, Saito H, Sato S, Maeda M, Jägerstad M**
Mutation Research 147: 267 (1985)
- [25] **Skog K, Knize MG, Felton JS, Jägerstad M**
Mutation Research 268: 191 (1992)
- [26] **Val M, Gry J, Nielsen PA**
In: XVII. Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS), Zürich, Schweiz, 19.-23. Juli 1987

- [27] **Felton JS, Knize MG, Shen NH, Andresen BJ, Bjeldanes LF, Hatch FT**
 Environ Health Persp 67: 17 (1986)
- [28] **Becher G, Knize MG, Felton JS**
 Vår Föda 42 (Suppl. 2): 85-90 (1989)
- [29] **Kurosaka R, Wakabayashi K, Ushiyama H, Nukaya H, Arakawa N, Sugimura T, Nagao M**
 Jpn J of Cancer Res 83: 919-922 (1992)
- [30] **Jägerstad M, Laser-Reuterswärd A, Öste R, Dahlquist A, Grias S, Olsson K, Nyhammar T**
 In: The Maillard Reaction in Foods and Nutrition
 ASC Symposium Series 215, S. 507-519
 Hrsg. Waller and Feather, American Chemical Society (1983a)
- [31] **Jägerstad M, Laser-Reuterswärd A, Olsson R, Grivas S, Nyhammar T, Olsson K, Dahlquist A**
 Food Chemistry 12: 255-264 (1983b)
- [32] **Jägerstad M, Olsson K, Grivas S, Negishi C, Wakabayashi K, Tsuda M, Sato S, Sugimura T**
 Mutat Res 126: 239-244 (1984)
- [33] **Skog K, Jägerstad M**
 Carcinogenesis 14: 2027-2031 (1993a)
- [34] **Nyhammar T**
 Studies on the Maillard reaction and its role in the formation of food mutagens
 Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of
 Chemistry and Molecular Biology, Uppsala, Sweden (1986)
- [35] **Lee M, Lin MY, Lins ST**
 Mutagenesis 9: 157 (1994)
- [36] **Yoshida D, Saito Y, Mitsuzaki S**
 Agric Biol Chem 48: 241-243 (1984)
- [37] **Överik E, Kleman M, Berg I, Gustafson JÅ**
 Carcinogenesis 10: 2293-2301 (1989)
- [38] **Taylor RT, Fulz E, Knize MG, Felton JS**
 Environmental Mutagenesis 9 (Suppl. 8): 106 (1987)
- [39] **Wang PS, Odell GV**
 J Agric Food Chem 21: 868 (1973)
- [40] **Murkovic M, Weber HJ, Geiszler S, Fröhlich K, Pfannhauser W**
 Food Chemistry 65: 233-237 (1999)
- [41] **Manabe S, Hiramitsu S, Wada O, Ueki A**
 Carcinogenesis 14: 899 (1993)

- [42] **Manabe S, Nobutaka K, Wada O, Izumikawa S, Asakuno K, Morita M**
Environmental Pollution 80: 281-286 (1993)
- [43] **Schuirmann E**
Bildung und Nachweis von mutagenen heterocyclischen Amininen beim Erhitzen von wasserarmen Modellsystemen und Fleischerzeugnissen
Dissertation, Universität Münster, BRD (1992)
- [44] **Manabe S, Kurihara N, Wada O, Tohyama K, Aramaki T**
Carcinogenesis 14: 903 (1993)
- [45] **Manabe S, Kurihara N, Shibutani T, Wada O, Ueki A, Suzuki H**
Carcinogenesis, 14: 903 - 906
- [46] **Vollenbröker M**
Untersuchungen der Bildung von Heterocyclischen Aromatischen Amininen in Modellsystemen, Lebensmitteln und Reaktionsaromen
Dissertation, Universität Münster, BRD (2000)
- [47] **Johansson M**
Influence of lipids, and pro- and antioxidants on the yield of carcinogenic heterocyclic amines in cooked foods and model systems
Doctoral Thesis, Department of Applied Nutrition and Food Chemistry, Lund Institute of Technology, Lund University, Sweden (1995)
- [48] **Monti SM, Ritieni A, Sacchi R, Skog K, Borgen E, Fogliano V**
J Agric Food Chem 49 (8): 3969-3975 (2001)
- [49] **Murcovic M, Steinberger D, Pfannhauser W**
Technology 207 (6): 477-480 (1998)
- [50] **Skog K**
Food Chem Toxic 31: 655 (1993)
- [51] **Rohrmann S, Becker N**
Ernährungs-Umschau 48 (11): 447 (2001)
- [52] **Skog K**
Food and Chemical Toxicology 40: 1197-1200 (2002)
- [53] **Ono Y, Somiya I, Oda Y**
Water Research 34 (3): 890-894 (2000)
- [54] **Wu J, Wong MK, Lee HK, Ong CN**
J Chrom Sci 33: 712-716 (1995b)
- [55] **Ohe T**
Mutat Res 393: 73-79 (1997)

- [56] **Martin FL, Cole KJ, Weaver G, Hong GS, Lam BC, Balaram P, Grover PL, Phillips DH**
Mutagenesis 16 (5): 401-406 (2001)
- [57] **DeBruin LS, Martos PA, Josephy PD**
Chemical Research in Toxicology 14 (11): 1523-1528 (2001)
- [58] **Strickland PT, Qian Z, Friesen MD, Rothman N, Sinha R**
Biomarkers 6 (5): 313-325 (2001)
- [59] **Hegstad S, Lundanes E, Reistad R, Haug LS, Becher G, Alexander J**
Chromatographia 52 (7-8): 499-504 (200)
- [60] **Turesky RJ, Aeschbacher HU, Würzner HP, Skipper PL, Tannenbaum SR**
Carcinogenesis 10: 1043 (1988)
- [61] **Alexander J, Wallin H, Holme JA, Becher G**
Carcinogenesis 10: 1543 (1989)
- [62] **Frandsen H, Grivas S, Anderson R, Drafsted L, Larson JC**
Carcinogenesis 13: 629 (1992)
- [63] **Turesky RJ, Rossi SC, Welti DH, Lay Jr JO, Kadlubar FF**
Chem Res Toxic 5: 479 (1992)
- [64] **Synderwine EG, Schut AJ, Adamson RH, Thorgeirsson UP, Thorgeirsson SS**
Cancer Research 52: 2099 (1992)
- [65] **Hatch FT**
Environ. Health Persp 67: 93 (1986)
- [66] **Sugimura T**
Environ Health Persp 67: 5-10 (1986)
- [67] **Grivas S, Nyhammar T, Olsson K, Jägerstad M**
Mutation Research 147: 267 (1985)
- [68] **De Meester C**
Mutation Research 221: 235 (1989)
- [69] **Shioya M, Wakabayashi K, Sato S, Nagao M, Sugimura T**
Mutation Research 191: 133 (1987)
- [70] **Aeschbacher HU, Turesky RJ**
Mutation Research 259: 235 (1991)
- [71] **Eisenbrand G, Schreier P**
Römpp Lexikon, Band Lebensmittelchemie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1995)

- [72] **Adamson RH**
Cancer Prevention: 1-7 (1990)
- [73] **Synderwine EG, Turesky RJ, Buonatati MH, Turteltaub KW, Adamson RH**
Proceedings of the 23rd Int. Symp. of the Princess Takamatsu Cancer Res. Fund: 69-77 (1995)
- [74] **Lee H, Wang HW, Su HY, Hao NJ**
Mutagenesis 9: 101 (1994)
- [75] **Edenharder R, Leopold C, Kries M**
Mutation Research 341: 303 (1995)
- [76] **Edenharder R, Kurz P, John K, Burgard S, Seeger K**
Food Chem Toxic 32: 443 (1994)
- [77] **Apostolides Z, Weisburger JH**
Mutation Research 326: 219 (1995)
- [78] **Barnes WS, Maiello J, Weisburger JH**
J Natl Cancer Inst 70: 757 (1983)
- [79] **Sjoedin PB, Nyman ME, Nilsson L, Jägerstad M**
J Food Sci 50: 1680 (1985)
- [80] **Nishiyama C, Nagai T, Yano T**
Agric Biol Chem 55: 797 (1990)
- [81] **Viske R, Balsrud-Mjelva B, Klungsoyr L**
Food Chem Toxic 30: 239 (1992)
- [82] **Negishi T, Nakano H, Kitamura A, Itome C, Shiotani T, Hayatsu H**
Cancer Lett 83: 157 (1994)
- [83] **Dashwood RH**
Carcinogenesis 13: 113 (1992)
- [84] **Morotomi M, Mutai M**
J Natl Cancer Inst 77: 195 (1986)
- [85] **Hosono A, Wardojo R, Otani H**
Lebensm Wiss Technol 23: 149 (1990)
- [86] **Zhang XB, Ohta Y**
J Dairy Sci 74: 752 (1991)
- [87] **Zhang XB, Ohta Y**
J Dairy Sci 74: 1477 (1991)
- [88] **Reddy BS, Rivenson A**
Cancer Research 53: 3914 (1993)

- [89] **Nutt S**
Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von mutagenen heterocyclischen Aminen in Reaktionsaromen
Dissertation, Universität Münster, BRD, (1995)
- [90] **Gross GA, Grüter A**
J Chromatogr 592: 271 (1992)
- [91] **Gross GA, Turesky RJ, Fay LB, Stillwell WG, Skipper PL, Tannenbaum SR**
Carcinogenesis 14: 2313 (1993)
- [92] **Thiebaud HP, Knize MG, Kuzmicky PA, Felton JS, Hsieh DP**
J Agric Food Chem 42: 1502-1510 (1994)
- [93] **Murcovic M, Löw H, Sonntag G, Pfannhauser W**
Proceedings of Euro Food Chem VIII 1: 38 (1995)
- [94] **Krach C, Rauter S, Sonntag G, Löw H, Murcovic M, Pfannhauser W**
Proceedings of Euro Food Chem VIII 2: 419 (1995)
- [95] **Milon H, Bur H, Turesky RJ**
J Chromatogr 394: 201 (1987)
- [96] **Edmonds CG, Sethi SK, Yamaizumi Z, Kasai H, Nishimura S, McCloskey JA**
Environ Health Perspect 67: 35 (1986)
- [97] **Turesky RJ, Bur H, Huyng-Ba T, Aeschbacher HU, Milon H**
Food Chem Toxicol 26: 501 (1988)
- [98] **Yamaizumi Z, Kasai H, Nishimura S, Edmonds CG, McCloskey JA**
Mutat Res 173 : 1 (1986)
- [99] **Pais P, Puignou L, Moyano E, Galceran MT**
J Chromatogr A 778: 179 (1997)
- [100] **Adachi J, Mizoui Y, Naito T, Yamamoto K, Fujiwara S, Ninomiya I**
J Chromatogr 538: 331 (1991)
- [101] **Galceran MT, Pais P, Pouignou L**
J Chromatogr A 730: 185 (1996)
- [102] **Pais P, Puignou L, Moyano E, Galceran MT**
J Chromatogr A 775: 125 (1997)
- [103] **Richling E, Herderich M, Schreier P**
Chromatographia 42: 7 (1996)
- [104] **Richling E, Decker C, Häring D, Herderich M, Schreier P**
J Chromatogr A 791: 71 (1997)
- [105] **Richling E, Häring D, Herderich M, Schreier P**
Chromatographia 48: 258 (1998)

- [106] **Fay LB, Ali S, Gross GA**
Mutat Res 376: 29 (1997)
- [107] **Takahashi M, Wakabayashi K, Nagao M, Yamamoto M, Masui T, Goto T, Kinai N, Tomita I, Sugimura T**
Carcinogenesis 6: 1195 (1985)
- [108] **Schuirmann E, Eichner K**
In : Strategies for Food Quality Control and Analytical Methods in Europe, Band 2
Hrsg.: Baltes, Eklund, Fenwick, Pfannhauser, Rüter und Their
B. Behr's Verlag, Hamburg (1991)
- [109] **Vainiotalo S, Matveinen K, Reunanen A**
Fresenius J Anal Chem 345: 462 (1993)
- [110] **Murray S, Gooderham NJ, Boobis AR, Davies DS**
Carcinogenesis 9: 321 (1988)
- [111] **Tikkanen LM, Sauri TM, Latva-Kala KJ**
Food Chem Toxic 31: 717 (1993)
- [112] **Murray S, Lynch AM**
J Chromatogr 616: 211 (1993)
- [113] **Nishimura S**
Environ Health Persp 67: 11 (1986)
- [114] **Skog K, Solyakov A, Arvidsson P, Jägerstad M**
J Chromatogr A 803: 227 (1998)
- [115] **Hargraves WA, Pariza MW**
Cancer Research 43: 1467 (1993)
- [116] **Turesky R, Wishnok JS, Tannenbaum SR, Pfund RA, Buchi G**
Carcinogenesis 4: 863 (1983)
- [117] **Nyhammar T, Grivas S, Olsson K, Jägerstad M**
In: Amino-Carbonyl Reactions in Food and Biological Systems, p. 323
Hrsg: Fujimaki, Namiki und Kato, Elsevier (1986)
- [118] **Felton JS, Knize MG, Shen NH, Andresen BJ, Happe J, Hatch FT**
Carcinogenesis 7 1081 (1986)
- [119] **Brand B**
Dissertation, Universität Münster, BRD (2002)
- [120] **Iwoaka WT, Krone CA, Sullivan JJ, Hohnson CA**
Cancer Lett 12: 335-341 (1981)

- [121] **Johansson M, Knize MG, Jägerstad M, Felton JS**
 Environ Mol Mut 25: 154-161 (1995)
- [122] **Thiébaud HP, Knize MG, Kuzmicky PA, Hsieh DP, Felton JS**
 Food Chem Toxicol 33: 821-828 (1995)
- [123] **Frandrup-Kuhr OH**
 Dissertation, Universität Münster, BRD (2004)
- [124] **Philippe Guy A, Gremaud E, Richoz J, Turesky RJ**
 Journal of Chromatography A, 883: 89 - 102 (2000)
- [125] **Aromenverordnung**
 In der Fassung vom 22.12.1981, zuletzt geändert durch Zweite Verordnung zur Änderung der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung und anderer lebensmittelrechtlicher Verordnungen vom 13.1.2004.
- [126] **Rockland LB**
 Anal Chem 32: 1375 – 1376 (1960)
- [127] **Heinzler MR**
 Dissertation, Universität Münster, BRD (1990)
- [128] **International Organisation of the Flavor Industry**
 Richtlinien für die Herstellung und Kennzeichnung von Zubereitungsaromen (1989)
- [129] **Eisenbrand G, Schreier, P (Hrsg.)**
 Römp Lexikon der, Band Lebensmittelchemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1995)
- [130] **Dwivedi BK**
 CRK Crit Rev Food Techn 5: 487 (1975)
- [131] **MacLeod G**
 In: Developments in Food Flavors, p. 191 (Hrsg.)
 Birch GG, Lindley MG, Elvesier Applied Science Publishers, London (1986)
- [132] **Sulser H**
 Die Extraktstoffe des Fleisches (Hrsg.)
 Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH, Stuttgart (1978)
- [133] **Löw H**
 Dissertation, Universität Graz, Österreich (1997)
- [134] **Kurata T, Sakurai Y**
 Agibiol Xhem 31: 170-173 (1967)
- [135] **Skog K, Jägerstad M**
 Mutat Res 230: 263 – 272 (1990)

- [136] **Grivas S, Nyhammar T, Olsson K, Jägerstad M**
Mutat Res 151: 177-183 (1985)
- [137] **Muramatsu M, Matsushima T**
Mutat Res 145: 266-267 (1985)
- [138] **Skog K, Jägerstad M**
Carcinogenesis 14: 2027-2031 (1993)
- [139] **Schoch, A**
Dissertation, Universität Hohenheim (1999)
- [140] **Skog K, Jägerstad M**
Mutat Res 230: 263-272 (1990)
- [141] **Schulz A**
Ascorbinsäure als Konkurrent der Maillard-Reaktion mit Aminosäuren
Poster Lebensmittelchemikertag, München (2003)

9 Abkürzungsverzeichnis

1,5,6-TMIP	2-Amino-1,5,6-trimethylimidazo[4,5-b]pyridin
1,6-DMIP	2-Amino-1,6-dimethylimidazo[4,5-b]pyridin
2-Desoxy-Glc	2-Desoxy-Gucose
2-Desoxy-Rib	2-Desoxy-Ribose
4,7,8-TriMeIQx	2-Amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
4,8-DiMeIQx	2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
4-CH ₂ OH-8-MeIQx	2-Amino-4-hydroxymethyl-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
4-MeIQx	2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
4-OH-PhIP	2-Amino-1-methyl-6-(4-hydroxyphenyl)imidazo[4,5-b]pyridin
7,8-DiMeIQx	2-Amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
7,9-MeIgQx	2-Amino-1,7,9-trimethylimidazo[4,5-g]chinoxalin
8-MeIQx	2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
AαC	2-Amino-9H-pyrido[2,3-b]indol
Abb	Abbildung
AIA	Aminoimidazoazaarene
Ala	Alanin
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
Ara	Arabinose
Arg	Arginin
AS	Autosampler
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
aw	Wasseraktivität
CE	Kapillarzonenelektrophorese
Cre-P-1	4-Amino-1,6-dimethyl-2-methylamino-1H,6H-pyrollo [3,4-f]benzimidazol-5,7-dion
Cys	Cystein
DAD	Diodenarray Detektor
DEG	Diethylenglycol
DNA	Desoxiribonucleinsäure
ELCD	Elektrochemischer Detektor
Ery	Erythrose

ESI	elektrospray ionization
Fru	Fructose
Gal	Galactose
GC	Gaschromatographie
Glc	Glucose
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Glu-P-1	2-Amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'd]imidazol
Glu-P-2	2-Aminodipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
Gly	Glycin
Glyc	Glycerinaldehyd
HAAs	heterocyclische aromatische Amine
Harman	1-Methyl-9H-pyrido[4,3-b]indol
His	Histidin
HMF	Hydroxymethylfurfural
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
IFP	2-Amino-1,6-dimethylfuro[3,2-e]imidazo[4,5-b]pyridin
Ile	Isoleucin
IQ	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin
IQs	Chinoline
IQx	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinoxalin
IQxs	Chinoxaline
IR	Infrarotes Licht (> 700 nm)
IST	Interner Standard
Kap	Kapitel
LC	Flüssigkeitschromatographie
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Lys-P-1	3,4-Cyclopentenopyrido[3,2-a]carbazol
MeA α C	2-Amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indol
MeIQ	2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]chinolin
Met	Methionin
MS	Massenspektrometrie
MTBSTFA	N-Methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl)-trifluoracetamid

NMR	Kernresonanzspektroskopie
Norharman	9H-Pyrido[4,3-b]indol
Orn-P-1	4-Amino-6-methyl-1H-2,5,10,10b-tetraazafluoranthen
PAK	polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
Phe	Phenylalanin
Phe-P-1	2-Amino-5-phenylpyridin
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin
Pro	Prolin
Rib	Ribose
RNA	Ribonucleinsäure
RP	Umkehrphase
SCX	Starker Kationentauscher
Ser	Serin
SIM	selected ion monotoring
TBDMSCI	tert-Butyldimethylsilylchlorid
TD50	Dosis bei der bei 50% einer Population toxische Wirkung auftreten
TEA	Triethylamin
TEAP	Triethylammoniumphosphat
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Trp-P-1	3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indol
Trp-P-2	3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolettes Licht (200 - 400 nm)
Val	Valin
Vis	Sichtbares Licht (400 - 700 nm)
Xyl	Xylose

Christophe Michael Pierre Goldbeck
Geboren am 29.11.1972 in Recklinghausen

Familienstand: verheiratet mit Dr. med. Nicole Goldbeck, geb. Wojtyczka

Vater: Jürgen Goldbeck
Mutter: Daniele Goldbeck, geb. Dumortier

Schulbildung: Pestalozzigrundschule von 1978-1980
Grundschule am Wilhelmsplatz von 1980-1982
Städtisches Gymnasium Herten von 1982-1984
Städtische Realschule von 1984-1989
Gymnasium Essen-Werden von 1989-1990
Städtisches Gymnasium Herten 1990-1993

Hochschulreife: am 02.06.1993 in Herten

Ersatzdienst: Technisches Hilfswerk Herten

Studium: Lebensmittelchemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität
Münster von 01.10.1993 bis 02.11.1999

Praktikum: Dezember 1999 bis Februar 2000 Fa. Herta in Herten
März 2000 bis Mai 2000 Veterinär- und
Lebensmittelüberwachungsamt Coesfeld
Juni 2000 bis November 1997 Gemeinsames Chemisches- und
Lebensmitteluntersuchungsamt des Kreises Recklinghausen und der
Stadt Gelsenkirchen in der Emscher-Lippe Region

Prüfungen: 12.05.1997 Zwischenprüfung für Lebensmittelchemiker
02.11.1999 Erste staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker
17.01.2001 Zweite staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker

Tätigkeiten: 01/2001-12/2003: Assistententätigkeit im Rahmen der
Studentenausbildung: „Lebensmittelchemisches Praktikum I“ und
begleitend das Seminar „Lebensmittelanalytik I“,
„Lebensmittelchemisches Praktikum IV“

06/2002-01/2004: Dozent am St. Franziskus-Hospital in Münster
für die Fächer „Biochemie der Ernährung“ und „Konservierung und
Lagerhaltung“

Beginn der Dissertation: 01/2001, Institut für Lebensmittelchemie,
Betreuer: Prof. Dr. K. Eichner

Herten, 14.03.04

Christophe Goldbeck