

Bestimmung metabolischer Profile von Lebensmitteln tierischer Herkunft Determining metabolic profiles of food of animal origin

S. ANDRÉE, D. MARTIN¹, U. OSTERMEYER¹, H. REHBEIN¹ und F. SCHWÄGELE

¹Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch, Kiel

Zusammenfassung

Im Projekt „Bestimmung metabolischer Profile von Lebensmitteln tierischer Herkunft“ wurden qualitätsrelevante Stoffwechselprodukte (Metabolite) in den Lebensmitteln Fisch, Fleisch und Milch untersucht. Bei den Metaboliten handelt es sich um (i) Alarmone, (ii) freie Aminosäuren sowie (iii) Ribonucleoside. Alarmone (Dinucleosidpolyphosphate) versetzen Lebewesen in die Lage, umweltbedingtem Stress eine angemessene metabolische Regulation entgegenzusetzen. Freie (nicht protein-gebundene) Aminosäuren sind aus ernährungsphysiologischen und sensorischen Gründen von großem Interesse. Ribonucleoside sind bioaktive Metabolite des Nucleinsäurenstoffwechsels, die in Milch auch als Verarbeitungsparameter angewendet werden können. Zur Untersuchung wurden Filets von Regenbogenforellen und Karpfen, Schweinefleisch (Muskelfleisch aus der Backe) und Rohmilchproben definierter Herkunft eingesetzt. Die Bestimmung der Alarmone erfolgte mittels LC-MS, während die Gehalte an freien Aminosäuren und Ribonucleosiden durch HPLC-Verfahren gemessen wurden. Zunächst wurden bereits vorhandene Methoden zur Bestimmung der Ribonucleoside und freien Aminosäuren an die unterschiedlichen Probenmatrizes angepasst, während im Falle der Alarmone die Neuentwicklung einer Methode erforderlich war.

Im vorgestellten Projekt wurde ein metabolisches Profil – mit Bezug auf die oben genannten Analyten – als eine Grundlage für die Beurteilung der Qualität erfasst und evaluiert, auch im Zusammenhang mit den majoren Bestandteilen des jeweiligen Lebensmittels.

Summary

The aim of the project presented was to establish a profile of metabolites as a basis for the evaluation of food quality. Therefore samples of rainbow trout, carp, milk and pork were tested. The metabolites determined were (i) alarmones, (ii) free amino acids and (iii) ribonucleosides. Alarmones (more precisely diadenosine polyphosphates) are substances that allow organisms to adapt to exogenic stress. Amino acids are not only components of all proteins but also precursor relevant to food flavour, taste and colouring. The content of free amino acids (FAA) in food is also interesting with regard to nutritional aspects. Ribonucleosides are monomeric metabolites of ribonucleic acids. The characterization of unmodified and modified ribonucleosides is of interest to obtain a better understanding of these compounds as potential quality-related metabolites. For separation and detection of A_p_nA an ion-pair HPLC method with ESI-high resolution TOF was developed. For the detection of free amino acids and ribonucleosides existing HPLC-methods were adapted to the current sample matrices. Within the study presented here a metabolic profile – with respect to the above mentioned metabolites – was established and evaluated taking into consideration the major compounds of the respective food.

Schlüsselwörter	Freie Aminosäuren – Ribonucleoside – Diadenosinpolyphosphate – Fisch – Milch – Fleisch
Key Words	free amino acids – ribonucleosides – diadenosine polyphosphates – fish – milk – meat

Einleitung

Unter Metabolomics versteht man die Identifizierung und mögliche Quantifizierung kleinerer Moleküle (≤ 1500 Da) – den sogenannten Metaboliten – in einer Zelle, einem Organ oder einem Organismus. Der Begriff Metabolite umfasst Ausgangsstoffe sowie Zwischen- bzw. Endprodukte des Stoffwechsels. Diese können endogen im Organismus oder der Zelle bereits vorliegen oder aus exogenen Quellen in diese gelangen. Die im Rahmen eines metabolischen Profiling zu untersuchenden Verbindungen können sehr vielfältig sein – so z. B. Peptide, Aminosäuren, Nucleinsäuren, Nucleotide, Nucleoside, Kohlenhydrate, organische Säuren, Vitamine, Polyphenole, Alkaloide, Mineralien und viele mehr. Untersuchungen im Rahmen einer metabolischen Studie können zielgerichtet, also auf bestimmte Verbindungen ausgerichtet sein oder aber ungezielt im Rahmen eines Screenings erfolgen. Die vorliegende Studie behandelt drei zielgerichtete und einen Screening-Ansatz.

Warum aber ist die Untersuchung metabolischer Profile von Lebensmitteln tierischer Herkunft relevant für die Qualität und Sicherheit dieser Produkte? Zum einen können Metabolite wie z. B. Nucleotide, Nucleoside, Zucker und freie Aminosäuren die sensorischen Eigenschaften von Lebensmitteln beeinflussen. Zahlreiche Metabolite sind ernährungsphysiologisch wertvolle Inhaltsstoffe. Einige Metabolite, wie biogene Amine, Formaldehyd, Wachse oder auch Laktose können ein Risiko für die menschliche Gesundheit darstellen. Außerdem stellen endogene oder exogene Metabolite häufig Vorstufen zu Substanzen dar, die als Verderbsparameter der Lebensmittel dienen können – so z. B. Amine, Sulfide und organische Säuren. Weiterhin kann das Spektrum der Metabolite als Herkunftsnachweis eingesetzt werden.

Ausgehend von diesen Überlegungen und von den Kernkompetenzen der beteiligten Institute – dem Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch in Kiel und der Arbeitsgruppe Analytik in Kulmbach – wurde im Zeitraum von September 2010 bis Mai 2011 das Projekt: „Bestimmung metabolischer Profile von Lebensmitteln

tierischer Herkunft“ durchgeführt. Ziel des Projektes war die Bestimmung qualitätsrelevanter Stoffwechselprodukte in Süßwasserfischen, Milch und Schweinefleisch. Zielanalyten waren: freie (nicht proteingebundene) Aminosäuren, Ribonucleoside und seltene Nucleotide (Dinucleosidpolyphosphate).

Proben

Fischproben

Die untersuchten gefarmten Süßwasserfische wurden im November 2010 lebend auf dem Hamburger Fischmarkt gekauft und unmittelbar nach dem Töten als ausgenommene Fische im Eisbett kühl gelagert, wobei das Schmelzwasser abfließen konnte. Eis wurde regelmäßig aufgefüllt.

Die untersuchten Karpfen (*Cyprinus carpio*) stammten aus deutscher konventioneller Aquakultur. Jeweils 3 Fische wurden *pre rigor* (vor der Totenstarre) am Lagertag 0 und *post rigor* (nach Lösen der Totenstarre) nach 1, 6 und 12 Lagertagen filetiert und homogenisiert. Aus jedem Homogenat wurden zwei Perchlorsäureextrakte hergestellt, indem jeweils 20 g Probe mit 180 ml 6%iger Perchlorsäure versetzt, homogenisiert und anschließend filtriert wurden. Die Filtrate wurden für die Bestimmungen der verschiedenen Metabolite eingesetzt.

Die 12 Karpfen wiesen im Mittel bei einem Schlachtgewicht von 1364 g einen Proteingehalt von 17,5 %, einen Fettgehalt von 3,8 % und einen Wassergehalt von 78,8 % auf.

Die untersuchten Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) stammten aus dänischer konventioneller Aquakultur. Jeweils 3 Fische wurden *pre rigor* und *im rigor* am Lagertag 0, sowie *post rigor* nach 5, 7 und 12 (2 Fische) Lagertagen filetiert und homogenisiert. Wie bei den Karpfen wurden aus den Homogenaten Perchlorsäureextrakte hergestellt, die bis zur Analyse tiefgekühlt gelagert wurden.

Die 14 Forellen hatten durchschnittlich bei einem Schlachtgewicht von 316 g einen Proteingehalt von 18,9 %, einen Fettgehalt von 4,1 % und einen Wassergehalt von 77,1 %.

Milchproben

Untersucht wurden vier Morgengemelk- und vier Abendgemelkproben von drei Kühen (Rasse: Deutsche Schwarzbunte; Kuh 1904, Kuh 3142 und Kuh 3158) der Versuchsstation Schaedtбек des MRI am Standort Kiel. Die Kühe befanden sich in unterschiedlichen Lactationen und Lactationstagen:

- Kuh-Nr. 1904: 9. Lactation, 48. Lactationstag;
- Kuh-Nr. 3142: 2. Lactation, 112. Lactationstag;
- Kuh-Nr. 3158: 1. Lactation; 257. Lactationstag

Die Futterrationen der drei untersuchten Kühe bestanden aus Kleegrassilage, 1. Schnitt 2010, Maissilage 2010, Kraftfutter HaGe Primo 22 Extra plus Mais und Kraftfutter Eigenmischung Weizen-Lupinen 1:4 in unterschiedlichen Frischmasseanteilen. Von den Milchproben wurden sauer-konservierte Seren (Proteinfällung mit konz. Ameisensäure auf pH 3,50) hergestellt.

Schweinefleischproben

Es wurden 25 Einzelproben aus der Kaumuskulatur von Schweinen direkt am Schlachtband entnommen und noch schlachtwarm weiterverarbeitet. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der Vollanalysen aus diesen Proben im Überblick.

Tab. 1: Ergebnisse der Vollanalysen der Schweinefleischproben

	Fett [%]	Wasser [%]	Protein [%]	Asche [%]
Minimum	1,33	73,8	18,7	1,07
Maximum	4,03	77,0	22,5	1,22
Arithmetisches Mittel	2,31	75,6	21,1	1,16

Insgesamt stammten die Proben von 11 männlichen und 14 weiblichen Tieren verschiedener Rassen (Bayern Hybrid, BW Hybrid, Deutsches Edelschwein, Deutsche Landrasse, Duroc, Pietrain und entsprechende Kreuzungen).

Die Schweinefleischproben wurden wie folgt aufbereitet: 60%ige Perchlorsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkir-

chen) wurde mit deionisiertem Wasser auf 6 % verdünnt. Die Proben wurden mittels Moulinette (Krupps GmbH, Offenbach/Main) homogenisiert. 10 g des Homogenats wurden anschließend mit 90 ml der 6%igen Perchlorsäure versetzt. Anschließend wurde das Gemisch für 60 s mittels Ultra-Turrax (IKA® T10 basic; IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) durchmischt. Dieses Gemisch wurde durch einen Faltenfilter (Whatman 595 ½; Whatman GmbH, Dassel) filtriert, aliquotiert und die Aliquote bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Bestimmung von freien Aminosäuren in Fisch-, Milch- und Schweinefleischproben

Hintergrund

In Lebensmitteln liegen Aminosäuren überwiegend gebunden in Proteinen und Peptiden vor. Aminosäuren sind aber nicht nur als Proteinbausteine, sondern auch als Vorläufer von Aroma- und Farbstoffen von Bedeutung. Ferner tragen freie Aminosäuren zum arteigenen Geschmack eines Lebensmittels bei. Einige freie Aminosäuren, wie Histidin oder Lysin, führen zur raschen Bildung biogener Amine während des mikrobiellen Verderbs (BELITZ 1992).

Der Gehalt an freien, d.h. ungebundenen Aminosäuren in Lebensmitteln ist im Verhältnis zu den proteingebundenen Aminosäuren zwar gering, aber dennoch ist die Untersuchung der freien Aminosäuren aus ernährungsphysiologischen und qualitativen Gründen von Interesse. Die ermittelten Werte werden die Schwankungsbreite innerhalb eines Lebensmittels aufzeigen und sollten bei der Erstellung von Nährwerttabellen, Verzehrstudien etc. berücksichtigt werden. Die Ergebnisse könnten u.U. aber auch dazu dienen, Verfälschungen, z.B. Injektion eines Proteinhydrolysates, nachzuweisen.

Zur Fraktion der bedingt unentbehrlichen Aminosäuren wird auch Taurin gerechnet. Taurin ist eine Aminosulfonsäure, die nicht in Proteine eingebaut wird, sondern in freier Form fast ausschließlich in tierischen Geweben vorkommt. Taurin spielt eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen. So ist es von großer Bedeu-

tung für die Entwicklung des Gehirns und der Netzhaut während Schwangerschaft und früher Kindheit. Darüber hinaus spielt Taurin eine wesentliche Rolle bei der Stabilisierung von Zellmembranen, der Entgiftung von Schadstoffen, der Osmoregulation, der Aufrechterhaltung der Calcium-Homeostase und als Diabetes Modulator. Es wirkt als Antioxidans und Immunstimulanz. Taurin reduziert die Blutcholesterolverwerte und schützt somit vor Arteriosklerose. Sowohl Taurin als auch Arginin senken den Blutdruck bei Hochdruckpatienten und schützen vor kardiovaskulären Erkrankungen (UNDELAND 2009; LUTEN 2008; YAMORI *et al.* 2010).

Analysenverfahren

Die Bestimmung der freien Aminosäuren (einschließlich Taurin) erfolgte nach Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd (ANTOINE *et al.* 1999) mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Fluoreszenzdetektion. Die Trennung der untersuchten 18 Aminosäuren erfolgte auf einer Fused-Core C18-Säule durch Gradientenelution.

Als Probenvorbereitung reichte die Herstellung eines Perchlorsäureextraktes von dem homogenisierten Fisch und Schweinefleisch aus. Die Milchproben wurden mit Ameisensäure vorbehandelt.

Ergebnisse

Gehalte an freien Aminosäuren in Karpfen und Forellen. Die Gehalte an freien Aminosäuren sind in Fischen allgemein höher als in Landtieren. Dies liegt daran, dass die primäre Funktion dieser Verbindungen die Osmoregulation in aquatischen Organismen ist. Die Gehalte und Art der freien Aminosäuren sind vom Fisch (Familie, Spezies, etc.), Muskeltyp (rot oder weiß) und anderen Faktoren wie Jahreszeit, Temperatur und Futter abhängig. (RUIZ-CAPILLAS *et al.* 2010, LUTEN 2008). Während der Lagerung von gekühltem Fisch treten Änderungen bei den freien Aminosäuren bedingt durch Muskelautolyse und

später durch Mikroorganismen auf (RUIZ-CAPILLAS *et al.* 2001).

Die Gehalte an freien Aminosäuren in den untersuchten Karpfen (Abb. 1) unterlagen individuellen Schwankungen und nahmen tendenziell während der Lagerung ab. Die Gesamtgehalte an freien Aminosäuren lagen bei allen untersuchten Karpfen zwischen 269 und 636 mg/100 g (Mittelwert (MW): 530 mg/100 g Fischgewebe). Den Hauptanteil machte davon das Taurin (82-223 mg/100 g, MW: 175 mg/100 g) aus.

Das Karpfenfilet enthielt gemittelt neben Taurin (ca. 33 %) (Abb. 2) noch beachtliche Mengen an Histidin (ca. 25 %) und Glycin (ca. 21 %) sowie deutliche Mengen an Lysin und Alanin (jeweils ca. 5 %).

Die Gesamtgehalte an freien Aminosäuren lagen bei allen untersuchten Forellen (Abb. 3) zwischen 190 und 380 mg/100 g Fischfilet (MW: 278 mg/100 g) und nahmen während der Lagerung tendenziell ab. Während der Lagerung blieben die absoluten Tauringehalte jedoch relativ konstant. Die Chromatogramme der Forellenproben enthielten zwei deutliche Peaks, die keiner Substanz zugeordnet werden konnten.

Die mengenmäßig am stärksten vertretenen freien Aminosäuren waren bei den Forellenfilets (Abb. 4) neben Glycin und Alanin, Taurin und Histidin.

Gehalte an freien Aminosäuren in Schweinefleischproben. Die Schweinefleischproben wiesen erwartungsgemäß niedrigere Gesamtgehalte (Abb. 5) an freien Aminosäuren auf. Die Gehalte lagen zwischen 103 und 231 mg/100 g Muskel (MW: 177 mg/100 g). Dabei handelte es sich bei allen Proben in etwa zur Hälfte um Taurin (MW: 91 mg/100 g). Man erkennt bei den 25 untersuchten Kaumuskelproben (*Musculus masseter*) deutliche individuelle Schwankungen. Dies gilt auch bei verschiedenen Individuen einer Rasse (z. B. Bayern Hybrid: S4-S7 oder DExDL: S12, S13, S16, S23).

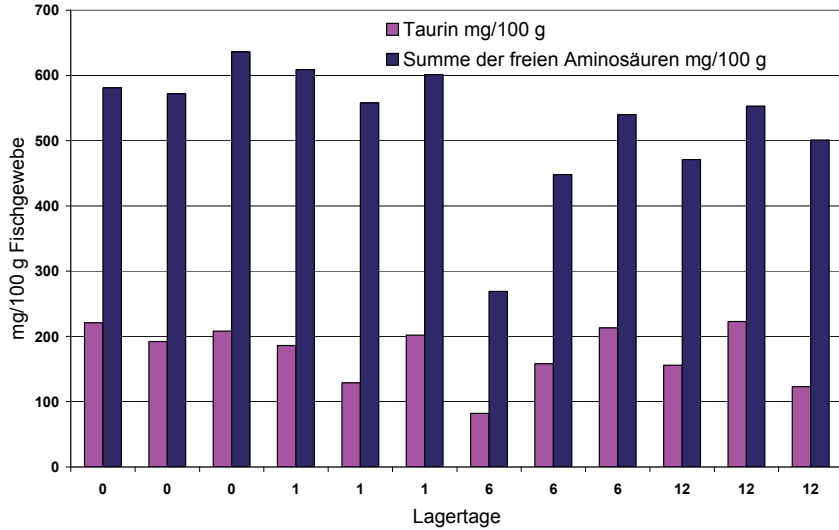


Abb. 1: Taurin- und Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in den einzelnen Karpfen

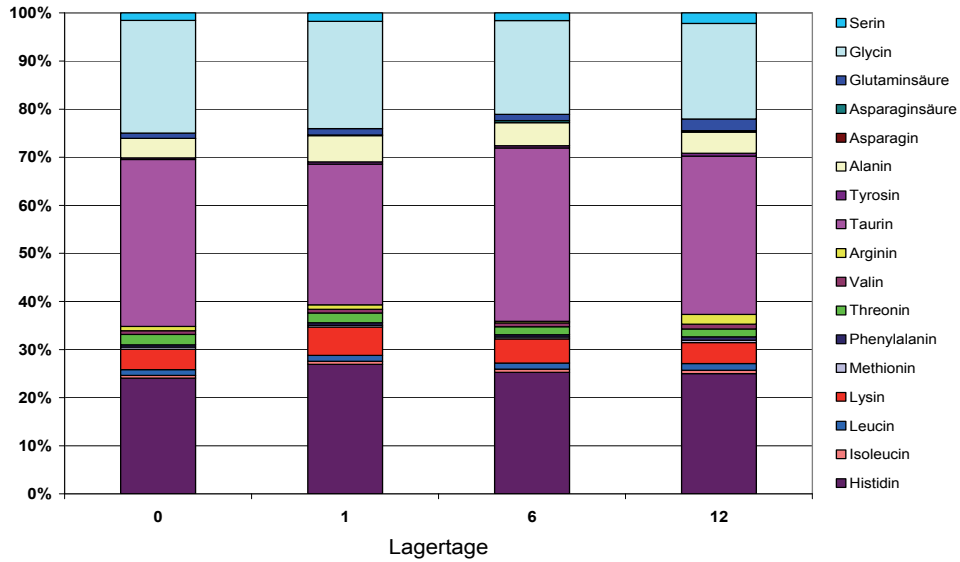


Abb. 2: Durchschnittliche prozentuale Zusammensetzung der freien Aminosäuren in Karpfen

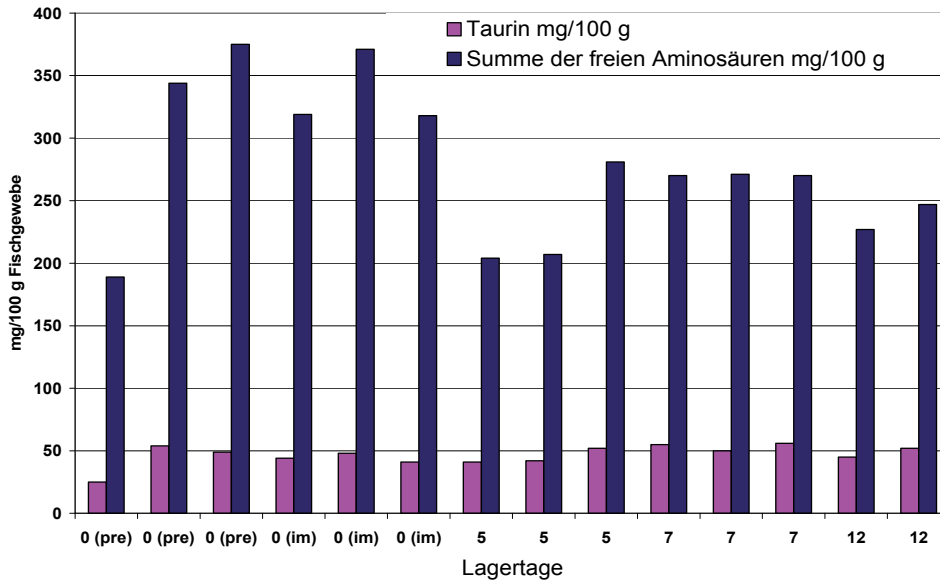


Abb. 3: Taurin- und Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in den einzelnen Forellen

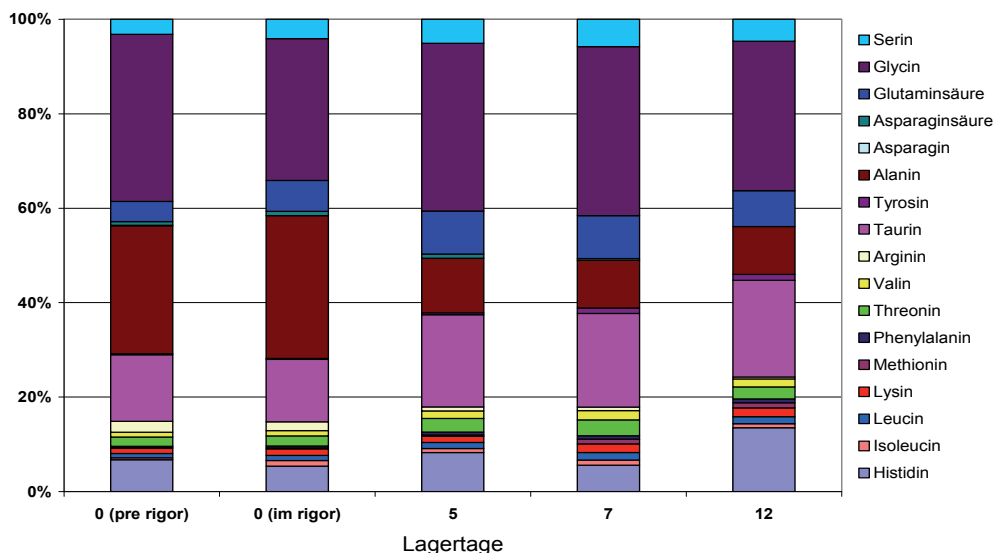


Abb. 4: Durchschnittliche prozentuale Zusammensetzung der freien Aminosäuren in Forellen

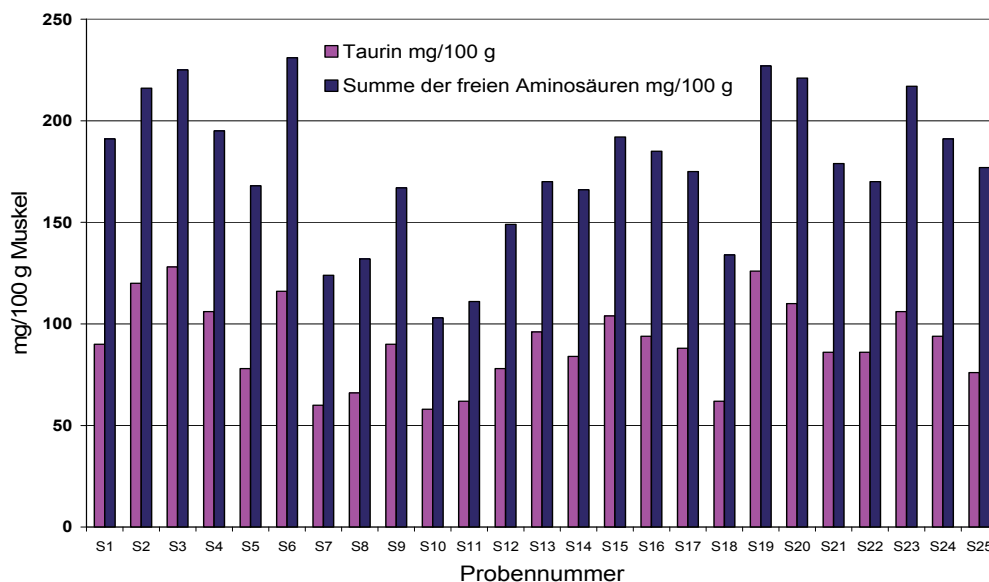


Abb. 5: Taurin- und Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in den Schweinefleischproben

Neben Taurin (Abb. 6) kommt nur noch Alanin in nennenswerten Mengen vor. Die übrigen Aminosäuren kommen dagegen nur in geringen Konzentrationen vor. Bei allen Schweinefleischproben traten im Chromatogramm drei deutliche Peaks auf, die nicht zugeordnet werden konnten.

Gehalte an freien Aminosäuren in Milchproben. Die Gesamtgehalte an freien Aminosäuren in den Kuhgemelken unterlagen individuellen Schwankungen (Abb. 7). Auch bei jeder einzelnen Kuh konnte an den unterschiedlichen Tagen sowie im Laufe eines Tages zum Teil deutlich unterschiedliche Gehalte festgestellt werden. Die Gesamtgehalte betragen im Mittel

77 mg/L (Min: 51 mg/L, Max: 109 mg/L). Diese relativ niedrigen Gehalte entsprechen Literaturwerten (SCHÜLLER 2007, RENNER *et al.* 1989).

Bei allen Milchproben traten im Chromatogramm drei deutliche Peaks auf, die nicht zugeordnet werden konnten. Alle untersuchten Proben enthielten nur sehr wenig Taurin (MW: 4,7 mg/L, Min: 2,2 mg/L, Max: 8,8 mg/L). Die im Handel gekaufte UHT-Milch enthielt vergleichbare Mengen an freien Aminosäuren und Taurin. Die geringen Taurinwerte werden durch Angaben in der Literatur bestätigt (ERBERSDOBLER *et al.* 1990, RENNER *et al.* 1989, MEHAIA *et al.* 1992).

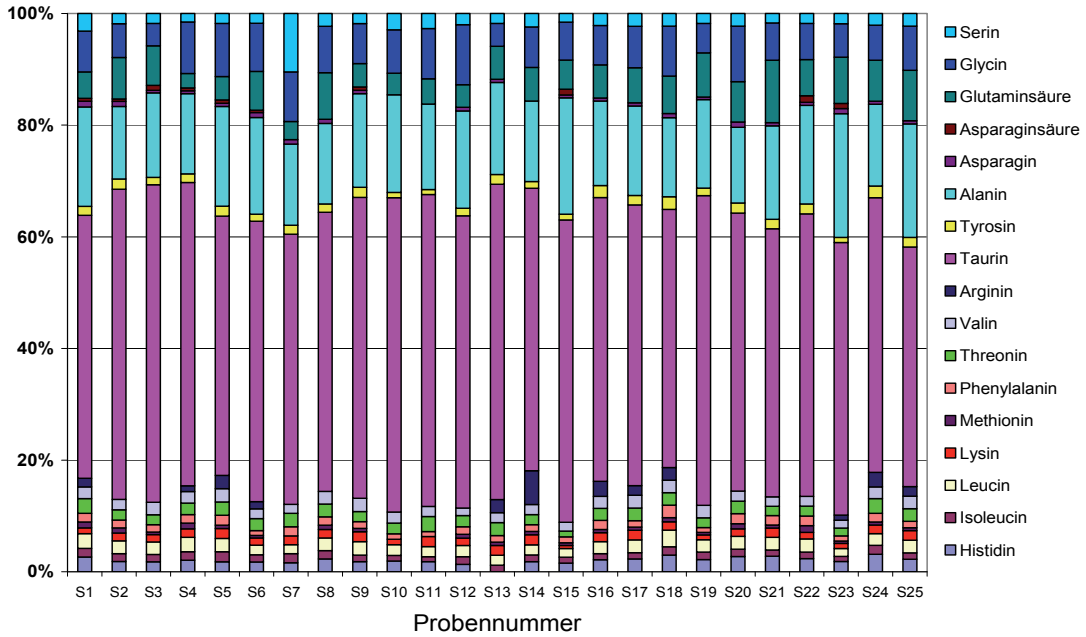


Abb. 6: Prozentuale Zusammensetzung der freien Aminosäuren in den einzelnen Schweinefleischproben

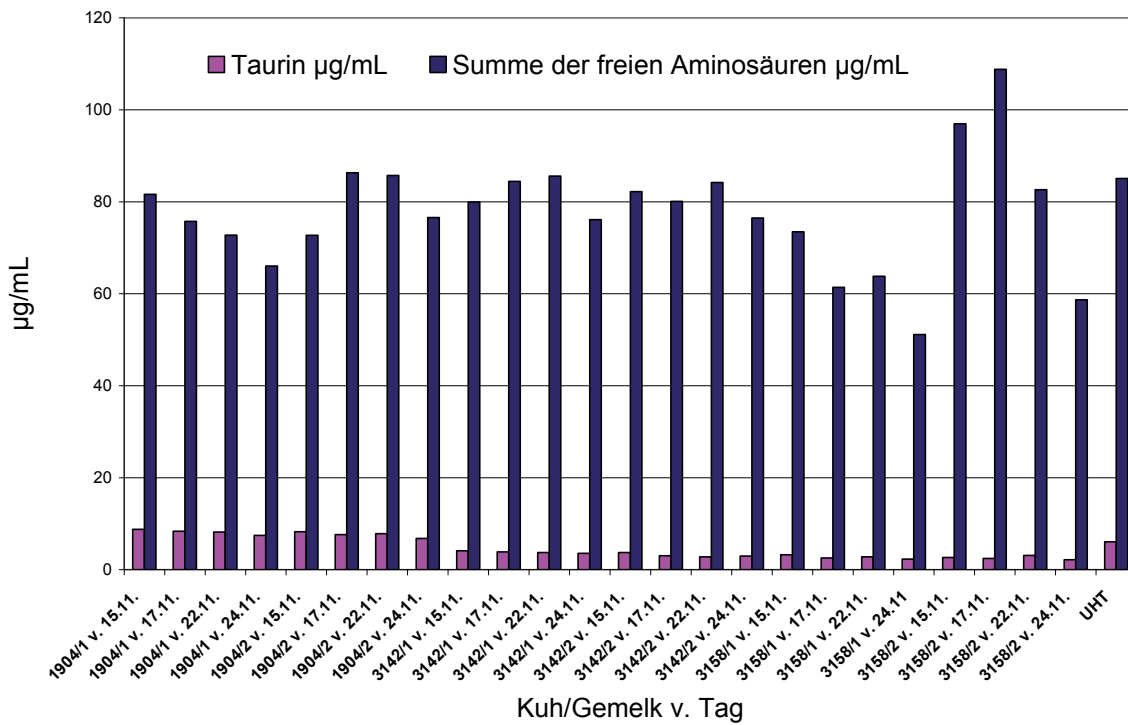


Abb. 7: Taurin- und Gesamtgehalt an freien Aminosäuren in den einzelnen Gemelken

Die häufigsten freien Aminosäuren waren Glutaminsäure, Histidin, Glycin, Alanin, Taurin, Serin und Asparaginsäure (Abb. 8). Alle anderen Aminosäuren waren nur in sehr niedrigen Konzentrationen vertreten.

Zusammenfassung: freie Aminosäuren in Fisch-, Milch- und Schweinefleischproben

Die Gehalte an freien, d.h. nicht protein-gebundenen Aminosäuren in Kuhmilch sind sehr gering und unterscheiden sich

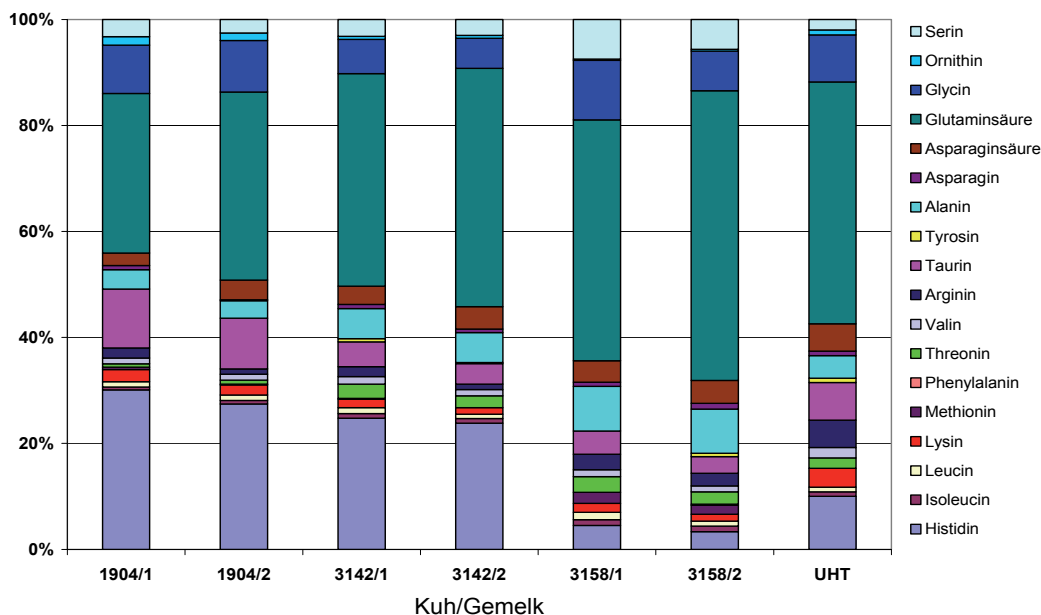


Abb. 8: Gemittelte prozentuale Zusammensetzung der freien Aminosäuren in den Morgen (/1)- und Abend (/2)-Gemelken verschiedener Kühe

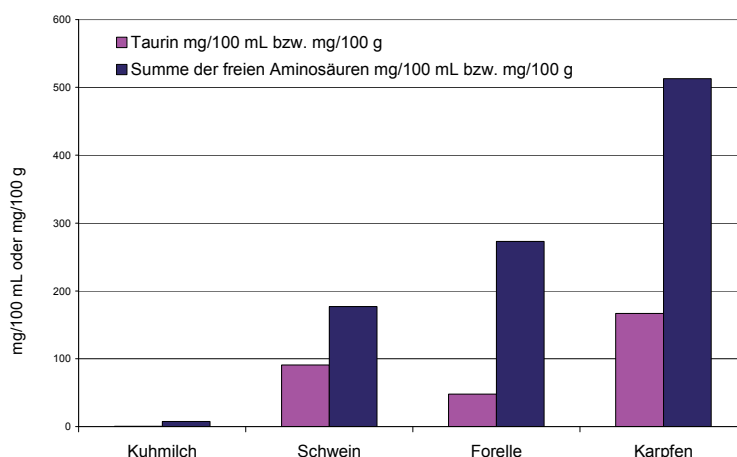


Abb. 9: Vergleich der gemittelten Gesamtgehalte (mg/100 g bzw. mg/100 mL) an freien Aminosäuren und an Taurin

Tab. 2: Die vier häufigsten freien Aminosäuren

Reihenfolge	Kuhmilch	Schwein	Forelle	Karpfen
1	Glutaminsäure	Taurin	Glycin	Taurin
2	Histidin	Alanin	Alanin	Histidin
3	Glycin	Glycin	Taurin	Glycin
4	Alanin	Glutaminsäure	Glutaminsäure	Lysin

deutlich von den in Schweine- und Fischfleisch gefundenen Werten (Abb. 9).

Fischfleisch enthält im Allgemeinen beträchtliche Mengen an Taurin (LUTEN 2008), was auch hier vor allem bei den Karpfen der Fall war. Aber auch in dem von verschiedenen Schweinerassen un-

tersuchten Kaumuskelfleisch konnten relativ große Mengen an Taurin nachgewiesen werden. Lediglich in den Milchproben waren nur Spuren davon feststellbar.

Die vier häufigsten freien Aminosäuren in den untersuchten Proben sind in der Tabelle 2 zusammengestellt. Sie machen

circa 75-85 % des gesamten freien Aminosäurepools aus. Bei allen Untersuchungsmaterialien gehört Glycin zu den vier häufigsten freien Aminosäuren. Bei drei der vier Matrices gehören Glutaminsäure, Alanin sowie Taurin dazu. Der Karpfen enthält große Mengen an den unentbehrlichen Aminosäuren Histidin und Lysin.

Alle Matrices enthielten Verbindungen, die nicht zugeordnet werden konnten.

Bestimmung von Ribonucleosiden in Fisch-, Milch- und Schweinefleischproben

Hintergrund

Ribonucleoside sind monomere Metabolite im Stoffwechsel der oligomeren Ribonucleinsäuren. Strukturell betrachtet sind Ribonucleoside Purin- und Pyrimidinderivate, die N-glycosidisch mit der Ribose (D-Ribose oder 2-Desoxy-D-ribose) verknüpft sind.

Natürlich vorkommende modifizierte Ribonucleoside werden als pathobiochemische Markermoleküle angewendet. Im Bereich der Arzneimittelforschung werden chemisch modifizierte Ribonucleoside z. B. als „nucleosidische reverse Transkriptase Inhibitoren“ bei der Behandlung von HIV-Infektionen seit Jahren angewendet (zur Übersicht: MARTIN *et al.* 2007). Außerdem üben modifizierte Ribonucleoside modulierende Effekte auf Zellkulturen aus, so z. B. apoptotische und antiproliferative Wirkung auf Caco-2-Zellen (MEISEL *et al.* 1998).

Ribonucleoside werden mit der Nahrung hauptsächlich als Nucleoproteine aufgenommen und im Verlauf der Verdauung durch Translokationssysteme in die Körperzellen transportiert. In der Milch gehören Ribonucleoside und deren monophosphorylierte Spezies, die Ribonucleotide, als minore Inhaltsstoffe zur Nicht-Protein-Stickstoff-Fraktion (NPN-Fraktion). Für Milch-Ribonucleoside wurde ein spezies-spezifisches Gehaltsmuster beobachtet, so dass z. B. Rohmilch von Kuh, Schaf und Ziege anhand des Ribonucleosid-Musters unterschieden werden könnte. Im Bereich der Milchverarbeitung sind Ri-

bonucleoside wertvolle Parameter, so bei der Differenzierung von Buttersorten oder bei der Milch-Wärmebehandlung (Hitzeindikator m6Ado) (MARTIN *et al.* 1997, 2006, 2011). Auch eine Hochdruck-Behandlung übt einen Einfluss auf Ribonucleosid-Gehalte in Milch aus (MARTIN *et al.* 2008).

In Fisch ist der Katabolismus von Ribonucleotiden (Ribonucleosid-5'-monophosphaten) bekannt (TEJADA 2009). So konnte bei der Lagerung von Wels-Filets auf Eis gezeigt werden, dass die IMP-Gehalte während der Lagerung abnahmen, wohingegen die Ino-Gehalte bis zum 7. Lagerungstag anstiegen, danach aber wieder abnahmen (ÖZOGUL *et al.* 2009).

Ribonucleoside/-tide wurden auch in behandeltem Fleisch bestimmt: In einer neueren Studie (MADRUGA *et al.* 2010) wurde der Zusammenhang von IMP- und Ino-Gehalten in gegartem Ziegenfleisch unter sensorischen Gesichtspunkten untersucht. Durch das Garen nahmen die Gehalte an Ino, IMP und GMP ab, nur bei AMP wurde eine Zunahme gefunden. Beim Braten und Grillen von Schweinefleisch (*Musculus semimembranosus*) konnten hingegen keine Korrelationen u. a. zwischen IMP-, Ino-Gehalten und sensorischen Eigenschaften beobachtet werden (MEINERT *et al.* 2007).

Neben diesen beschriebenen Untersuchungen ist die Bestimmung und Charakterisierung von unmodifizierten und modifizierten Ribonucleosiden in Milch, Fisch und Fleisch von Interesse, um ein umfassenderes Bild über diese Nucleinsäuremonomere als potentielle qualitätsrelevante Metabolite zu erhalten.

Analysenverfahren

Die Ribonucleosid-Bestimmung erfolgt mit Hilfe eines etablierten Zwei-Säulen-HPLC-Analysensystems, bei dem die Ribonucleoside in einer mit chemisch modifiziertem Aminophenylboronsäure-Gel gefüllten Vorseule kovalent aus der entsprechenden Matrix gebunden werden (SCHLIMME *et al.* 1990). Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines Diodenarray-Detektors bei einer Messwellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Die Quantifizierung wird mittels eines externen Standards ausgeführt, in dem folgende un-

modifizierte und modifizierte Ribonucleoside enthalten sind: Cyd: Cytidin; Urd: Uridin; m1Ado: 1-Methyladenosin; Ino: Inosin; Guo: Guanosin; Ado: Adenosin; m6Ado: N6-Methyladenosin; t6Ado: N6-Carbamoyl-L-threonyladenosin; m6,2Ado: N6-Dimethyladenosin.

Ergebnisse

Üblicherweise werden Ribonucleosid-Gehalte in flüssigen Medien in $\mu\text{mol/L}$ oder $\mu\text{mol/mL}$ angegeben. In der vorliegenden Arbeit wurden zum Vergleich der Ergebnisse in Milch, Fisch und Fleisch die Daten in $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ (Milch, entspricht angenähert $\mu\text{g}/100\text{ g}$) bzw. $\text{mg}/100\text{ g}$ (Fisch und Fleisch) berechnet und aufgeführt.

Ribonucleosid-Gehalte in Milchproben. Erwartungsgemäß wurden neben den unmodifizierten Ribonucleosiden Cyd, Urd, Ino, Guo und Ado auch die modifizierten Ribonucleoside m1Ado und t6Ado nachgewiesen. Der Hitzeindikator m6Ado, der durch thermisch-induzierte Dimroth-Umlagerung aus m1Ado gebildet wird (SCHLIMME *et al.* 1994), konnte in den Rohmilchproben erwartungsgemäß nicht detektiert werden. Urd lag in den Proben in der höchsten Konzentration vor, gefolgt von Cyd. Die drei untersuchten Kühe wurden absichtlich wegen ihrer unterschiedlichen Laktationstage zu Beginn des Melkens ausgesucht: So hatte Kuh Nr. 3158 zu Beginn der Untersuchung den 257. Lactationstag, Kuh-Nr. 3142 den 112. und Kuh-

Nr. 1904 den 48. Lactationstag. In früheren, umfangreichen Untersuchungen zu Ribonucleosid-Gehalten innerhalb der Lactation (SCHLIMME *et al.* 1991) wurde gezeigt, dass sich nach den erhöhten Ribonucleosid-Gehalten der Kolostralphase die Gehalte auf ein nahezu konstantes Niveau einpendeln. Interessanterweise wurden in den Milchproben von Kuh-Nr. 3158 geringere Ribonucleosid-Gehalte gefunden als in den Proben von Kuh-Nr. 1904 (Tab. 3), d. h. zum Ende der Lactation scheinen die Ribonucleosid-Gehalte abzunehmen. Generell konnten in den Abendgemelken geringfügig höhere Ribonucleosid-Konzentrationen bestimmt werden als in den Morgengemelkproben.

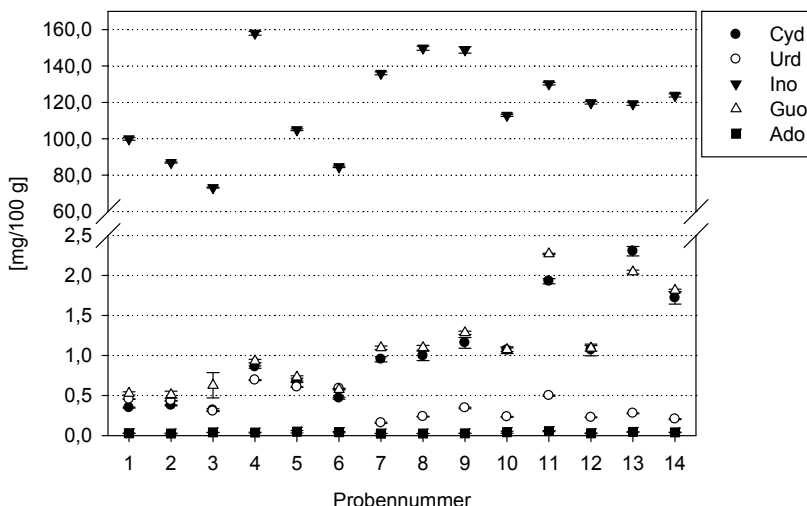
Ribonucleosid-Gehalte in Fischproben (Forellen und Karpfen).

Forelle. Im Vergleich zur Kuhmilch wurden in den untersuchten Forellen-Proben keine modifizierten Ribonucleoside nachgewiesen. Ein weiterer Unterschied besteht im Ribonucleosid-Konzentrationsbereich im Vergleich Kuhmilch-Forellen: Während in Kuhmilch die Gehalte in $[\mu\text{g}/100\text{ mL}]$ angegeben wurden, werden bei den Forellenproben nunmehr $\text{mg}/100\text{ g}$ aufgeführt. Die Gehalte an Cyd, Urd, Guo und Ado betragen $<2,5\text{ mg}/100\text{ g}$ (Abb. 10), wobei, als min-max-Werte angegeben, Cyd im Bereich $0,318 \pm 0,016 - 2,326 \pm 0,043\text{ mg}/100\text{ g}$ vorliegt, Guo im Bereich $0,489 \pm 0,025 - 2,271 \pm 0,010$ und Ado im Bereich $0,023 \pm 0,001 - 0,056 \pm 0,007\text{ mg}/100\text{ g}$.

Tab. 3: Ribonucleosid-Gehalte $[\mu\text{g}/100\text{ mL}]$ in Kuhrohmilch: Gemittelte Daten aus jeweils 4 Morgen- und Abendgemelkproben

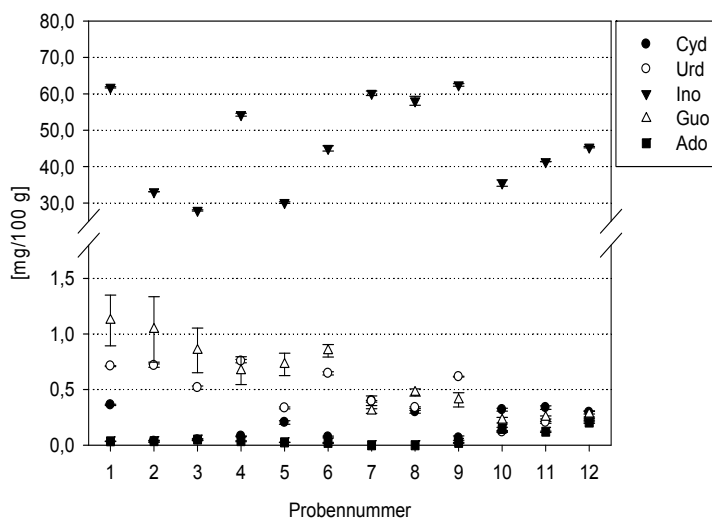
$[\mu\text{g}/100\text{ mL}]$ \pm s.d.	Morgengemelk	Abendgemelk	Morgengemelk	Abendgemelk	Morgengemelk	Abendgemelk
	Kuh 1904		Kuh 3142		Kuh 3158	
Cyd	$124,0 \pm 0,8$	$105,0 \pm 0,7$	$114,6 \pm 1,4$	$108,7 \pm 1,4$	$97,5 \pm 0,6$	$92,0 \pm 1,2$
Urd	$614,5 \pm 1,8$	$680,0 \pm 3,4$	$351,2 \pm 3,5$	$434,1 \pm 4,7$	$189,5 \pm 0,8$	$231,9 \pm 2,3$
m1Ado	$15,5 \pm 0,3$	$13,2 \pm 0,4$	$14,4 \pm 0,5$	$15,2 \pm 0,7$	$12,6 \pm 0,3$	$13,9 \pm 0,4$
Ino	$7,1 \pm 0,2$	$13,0 \pm 0,5$	$4,3 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,4$	$5,3 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,5$
Guo	$12,0 \pm 0,3$	$18,2 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,3$	$6,7 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,1$
Ado	$50,1 \pm 0,8$	$29,5 \pm 0,7$	$35,6 \pm 0,6$	$23,8 \pm 0,4$	$30,1 \pm 0,7$	$21,8 \pm 0,5$
m6Ado	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
t6Ado	$22,8 \pm 0,4$	$25,8 \pm 0,6$	$19,6 \pm 0,6$	$21,6 \pm 0,5$	$28,2 \pm 0,5$	$32,0 \pm 1,0$
m6,2Ado*	$1,3 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,0$	$1,6 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,1$	$6,3 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,1$
Summe	$847,2 \pm 5,0$	$885,9 \pm 6,6$	$546,9 \pm 7,6$	$616,7 \pm 8,5$	$371,5 \pm 3,5$	$408,4 \pm 6,2$

* Peak-Identifizierung nicht eindeutig



Legende: Proben-Nr. 1-3: 0 Tage Lagerdauer (*pre rigor*); Proben-Nr. 4-6: 0 Tage Lagerdauer, 4 h nach dem Kauf, im *rigor*; Proben-Nr. 7-9: 5 Tage Lagerdauer; Proben-Nr. 10-12: 7 Tage Lagerdauer; Proben-Nr. 13-14: 12 Tage Lagerdauer, Lagerung auf Eisbett im Kühlraum

Abb. 10: Ribonucleosid-Gehalte [mg/100 g] in einzelnen Forellen-Proben



Legende: Proben-Nr. 1-3: 0 Tage Lagerdauer (*pre rigor*); Proben-Nr. 4-6: 1 Tag Lagerdauer (vermutlich *post rigor*, Fisch war nicht (mehr) starr); Proben-Nr. 7-9: 6 Tage Lagerdauer; Proben-Nr. 10-12: 12 Tage Lagerdauer, Lagerung auf Eisbett im Kühlraum

Abb. 11: Ribonucleosid-Gehalte [mg/100 g] in einzelnen Karpfen-Proben

Für Urd wurden min-max-Werte im Bereich $0,159 \pm 0,008 - 1,232 \pm 0,005$ mg/100 g gefunden, wobei in einer Bestimmung für Urd ein Wert von $23,5 \pm 1,197$ mg/100 g vorlag. Wahrscheinlich war der Urd-Substanzpeak von anderen, im isokratischen HPLC-Bereich nicht abtrennbaren Substanzen unterlagert, so dass dieser hohe Wert generiert wurde. Ino hingegen lag um eine Größenordnung höher im Bereich von $73,151 \pm 0,263 - 157,950 \pm 1,053$ mg/100 g vor.

Durch Bestimmung von IMP und AMP könnte in weiteren zukünftigen Untersuchungen festgestellt werden, inwieweit das nachgewiesene Ino z. B. aus IMP hydrolytisch freigesetzt wird.

Karpfen. In den untersuchten Karpfen-Proben (Abb. 11) lagen die unmodifizierten Ribonucleoside Cyd, Urd, Guo und Ado in einem Bereich $< 1,5$ mg/100 g vor (min-max Daten: Cyd: $0,034 \pm 0,005 - 0,400 \pm 0,043$; Urd: $0,097 \pm 0,003 - 0,777 \pm 0,011$;

Guo: $0,198 \pm 0,025 - 1,166 \pm 0,300$; Ado: $< \text{Nachweisgrenze} - 0,203 \pm 0,006$). Auch in den Karpfenproben lag Ino wiederum in den höchsten Konzentrationen vor ($27,966 \pm 0,190 - 62,441 \pm 0,339$). Die relativ hohen Streuungen bei Guo in den Proben 1-5 wurden durch einen coeluierenden Peak verursacht, der durch Aufnahme von Diodenarray-UV-Spektren leider nicht identifiziert werden konnte.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann man festhalten, dass zumindest bei 10 Tagen Lagerdauer ein geringerer Ino-Gehalt vorliegt als bei 6 Tagen Lagerdauer.

Im Vergleich zu den untersuchten Karpfen-Proben lagen in den Forellen-Proben höhere Gehalte an frei verfügbaren Ribonucleosiden vor. Wie schon bei den Forellen-Proben vorgeschlagen, sollten die „Quellen“ für die hohen Ino-Gehalte anhand von Ribonucleotidbestimmungen noch weitergehend erörtert werden.

Ribonucleosid-Gehalte in Fleischproben. Beim Schweinefleisch wurden 25 Kaumuskelpollen (*Musculus masseter*) untersucht. Wie auch bei den Forellen- und Karpfenproben konnten im Schweinefleisch nur die unmodifizierten Purin- und Pyrimidin-Ribonucleoside nachgewiesen werden. Bezogen auf 100 mL bzw. 100 g des jeweiligen Lebensmittels, liegen auch in den Schweinefleischproben die Gehalte an Cyd, Urd, Guo und Ado $< 2 \text{ mg}/100 \text{ g}$ vor (Tab. 4). Auch in Schweinefleischproben kommt Ino mit den höchsten Gehalten der detektierten Ribonucleoside vor. Die angegebenen Variationskoeffizienten umschreiben die biologische Schwankung: Ino und Guo zeigen in den untersuchten Proben die geringfügigsten Schwankungen auf.

Zusammenfassung: Ribonucleoside in Fisch-, Milch- und Schweinefleischproben

In Fisch und Fleisch liegen, bezogen auf 100 mL bzw. 100 g des jeweiligen Lebensmittels, um etwa 2 Zehnerpotenzen höhere Gehalte an frei verfügbaren Ribonucleosiden vor als in Kuhrohmlch. Modifizierte Ribonucleoside wie m1Ado und t6Ado konnten bislang nur in Milch nachgewiesen werden. Der Hitzeindikator m6Ado konnte erwartungsgemäß in den untersuchten Rohmilchproben nicht nachgewiesen werden.

In zukünftigen Untersuchungen sollten parallel ausgeführte Ribonucleotid-Bestimmungen Erkenntnisse über „Ribonucleosid-Quellen“ liefern, so z. B. bei der Lagerung von Fischproben. Weiterhin muss aufgeklärt werden, ob modifizierte Ribonucleoside prinzipiell in Fisch- und Fleischproben nicht vorliegen, oder aber ob bei der Probenvorbereitung die modifizierten Spezies hydrolytisch abgebaut werden und damit nicht erfasst werden können. Untersuchungen zur Wiederfindung aus den Perchlorsäure-Extrakten haben zu dieser Annahme jedoch bislang keine Hinweise ergeben.

Bestimmung von Dinucleosidpolyphosphaten in Fisch-, Milch- und Schweinefleischproben

Hintergrund

Dinucleosidpolyphosphate, kurz Np_nN , gehören zu den Alarmonen – oder Alarm-Hormonen – wobei N Adenosin (A), Guanin (G), Cytidin (C) und Uridin (U) sein können. Alarmone regulieren zelluläre Prozesse, die Lebewesen auf Stressoren reagieren lassen und damit ihre Überlebenswahrscheinlichkeit erhöhen. Als

Tab. 4: Ribonucleosid-Gehalte [mg/100 g] in Schweinefleisch (*Musculus masseter*, Probenanzahl n = 25)

[mg/100 g]	Cyd	Urd	Ino	Guo	Ado
Mittelwert (n = 25)	$0,581 \pm 0,024$	$1,261 \pm 0,027$	$57,060 \pm 1,807$	$1,152 \pm 0,083$	$0,091 \pm 0,009$
min – max	0,359 – 1,271	0,824 – 1,913	37,883 - 78,308	0,712 – 1,515	0,044 – 0,194
VK [%] ^{a)}	36,79	21,56	12,42	16,81	40,84

^{a)}Variationskoeffizient zur Beschreibung der Messwertstreuung (biologische Schwankung)

Stress werden Ereignisse definiert, bei denen intrinsische oder extrinsische Faktoren – oder Stressoren – die dynamischen Gleichgewichte bedrohen, die jeder Organismus anstrebt. Zu den extrinsischen Faktoren zählen physische Veränderungen wie Hitze oder Kälte, chemische Faktoren, aber auch psychologische bzw. psychosoziale Stressoren (SCHLÜTER, 2006). Umgekehrt könnte man also annehmen, dass die intrazellulären Gehalte an Np_nN als Stressmarker betrachtet werden können. In der Natur sind Dinucleosidpolyphosphate mit 2 Adeninresten, also Diadenosinpolyphosphate (Ap_nA) bei weitem am häufigsten anzutreffen.

Diadenosinpolyphosphate (Ap_nA) bestehen aus zwei Adenosinmolekülen, die über eine Brücke aus n Phosphatgruppen miteinander verbunden sind. Die Phosphatkettenzahl n kann von 2 bis 7 variieren.

Diadenosinpolyphosphate befinden sich in nahezu allen pro- und eukaryontischen Zellen. Typische intrazelluläre Gehalte bei Säugetieren betragen für Ap_4A ca. 0,05-1 μM , für Ap_3A ca. 5-10 μM und für Ap_5A ca. 7 μM (McLENNAN, 2000). Ihre Konzentration scheint direkt mit dem Zellwachstum bzw. der Apoptose, aber auch mit dem Auftreten von oxidativem- oder Hitzestress zu korrelieren (MIRAS-PORTUGAL *et al.* 1998). Ap_nA wurden in Thrombozyten nachgewiesen. Daneben werden sie zusammen mit Mononucleotiden in chromaffinen Zellen der Nebennieren, in Herzgewebe sowie in Nervenzellen gespeichert (GUZMÁN-ARANGUEZ *et al.* 2007). Obwohl Diadenosinpolyphosphate innerhalb der Zelle nur eine relativ geringe Lebensdauer aufweisen, scheinen sie, einmal in den extrazellulären Raum entlassen, über eine recht hohe Stabilität zu verfügen. Diese

Stabilität sorgt dafür, dass sie als Signaltransmitter im vaskulären bzw. Nervensystem geeignet sind. In der vorliegenden Studie wurden die Verbindungen mit $n=3$ bis $n=5$, also Ap_3A , Ap_4A und Ap_5A untersucht.

Bereits sehr frühzeitig wurde die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) auf Umkehrphasen (C18) zur Auftrennung komplexer Gemische, und so auch zur Auftrennung der Ap_nA genutzt. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend entweder mittels Dünnschichtchromatographie oder mit Hilfe von enzymatischen Nachweisverfahren detektiert und auch quantifiziert (OGILVIE, 1983). Dazu kamen Kaliumhydrogenphosphatpuffer als Eluenten und Ionenpaarreagenzien zur Verbesserung der Retention zum Einsatz. Bis in die heutige Zeit werden solche Systeme zusammen mit UV-Detektoren zum Nachweis der Ap_nA eingesetzt (CASTANY *et al.*, 2011). Mit der Entwicklung von MALDI-MS (Matrix assisted Laser desorption – mass spectrometry) wurden häufig Off-line Kopplungen mit chromatographischen Trenntechniken eingesetzt (KROM *et al.*, 2007 und JANKOWSKI *et al.* 2005). Die Entwicklung von robusten HPLC-MS Kopplungen mit verschiedenen Ionisierungstechniken und die Verfügbarkeit von flüchtigen Ionenpaarreagenzien und Modifiern führten folgerichtig zum Einsatz dieser Methoden um Ap_nA nachzuweisen und zu quantifizieren (MONDS *et al.* 2010).

Der Einsatz von hochauflösenden Massenspektrometern mit umfangreichen Screening-Techniken, wie in der vorliegenden Studie, erlaubt zudem die Generierung einer Vielzahl von Zusatzinformationen aus einem einzigen Probenextrakt.

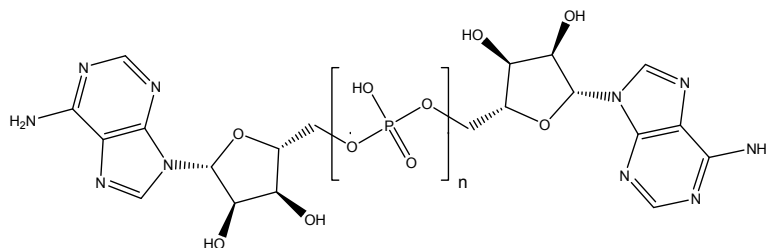


Abb. 12: Allgemeine Strukturformel der Ap_nA

Analysenverfahren

Probenvorbereitung

Fleisch- und Fischproben. 5 mL des Perchlorsäureextraktes wurden in 15 mL PE-Zentrifugenröhrchen pipettiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurden 650 µL einer 3 M Kaliumcarbonatlösung (Kaliumcarbonat p.A. Merck KGaA, Darmstadt) hinzugefügt. Nach Abklingen der heftigen Reaktion wurden die Röhrchen bei 6000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. 850 µL des klaren Überstandes wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und mit 150 µL einer Lösung aus 100 mM Ammoniumformiat und 10 mM N,N-Dimethylhexylamin (DMHA) (LC-MS Qualität Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) versetzt und mittels Vortex gründlich vermischt. Die entstandene Lösung wurde über einen Spritzenvoratzfilter (Minisart RC 4, Fa. Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen) in 1,5 mL HPLC-Vials filtriert.

Milchproben. 850 µL des Extraktes wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und mit 150 µL einer Lösung aus 100 mM Ammoniumformiat und 10 mM DMHA versetzt und mittels Vortex gründlich vermischt. Die entstandene Lösung wurde über einen Spritzenvoratzfilter (Minisart RC 4, Fa. Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen) in 1,5 mL Vials filtriert.

Standards

Ap_nA-Standards (Triammonium P¹, P³-Di(adenosin-5')-triphosphat (Ap₃A), Tetraammonium P¹, P⁴-Di(adenosin-5')-tetraphosphat (Ap₄A) und Pentaammonium P¹, P⁵-Di(adenosin-5')-pentaphosphat (Ap₅A)) wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bezogen. Zur Herstellung der Stammlösungen wurden 1 mg/mL des jeweiligen Ap_nA in deionisiertem Wasser gelöst, aliquotiert und die Aliquote bei -20 °C gelagert.

Kalibrierstandards (Fleisch und Fisch)

Aus den Stammlösungen wurden arbeits-täglich Kalibrierstandards (5000 ng/mL-50 ng/mL) ebenfalls durch Lösen in 6%-iger Perchlorsäure erstellt. Diese Kalibrierstandards wurden analog den Fleisch- bzw. Fischextrakten aufbereitet.

Kalibrierstandards (Milch)

Aus den Stammlösungen wurden arbeits-täglich Kalibrierstandards (5000 ng/mL-50 ng/mL) ebenfalls durch Lösen in deionisiertem Wasser erstellt. Diese Kalibrierstandards wurden analog den Milchextrakten aufbereitet.

HPLC-MS

Die so erhaltenen Extrakte bzw. Kalibrierstandards wurden mittels einer Kopplung aus Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie, bestehend aus einer Ultimate 3000 RS HPLC (Dionex GmbH Deutschland, Idstein) und dem hochauflösenden Flugzeitmassenspektrometer (Time of Flight, TOF) maXis (Bruker Daltonic GmbH, Bremen) ausgestattet mit einer ESI (Elektrospray Ionisierungs)-Quelle untersucht. Die flüssigchromatographische Trennung der Ap_nA erfolgte mittels einer Gemini NX C18 HPLC-Säule (3 µm, 110 Å, 150 x 3 mm) mit entsprechender Vorsäule (4 x 2 mm) (Phenomenex LTD, Aschaffenburg). Als Trennprinzip kam eine Ionenpaar-chromatographie zum Einsatz mit N,N-Dimethylhexylamin (DMHA) als Ionenpaar-reagenz. Der Eluent setzte sich aus einer ternären Mischung von A: Wasser/Acetonitril (LC-MS-Qualität, LGC Standards GmbH, Wesel) 90 %/10 %, v/v; 10 mM DMHA, B: Acetonitril; 10 mM DMHA sowie C: 100 mM Ammoniumformiat-/Ameisensäure-Puffer (LC-MS-Qualität Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) pH 5,2; 10 mM DMHA zusammen. Der genutzte Gradient ist der Tabelle 5 zu entnehmen.

Der Fluss lag bei 0,3 mL/min, die Säulentemperatur bei 20 °C. Je Probenextrakt bzw. Kalibrierstandard wurden 60 µL injiziert. Es erfolgte eine zusätzliche UV-Detektion bei 254 nm.

Tab. 5: HPLC-Gradient zur Trennung der Ap_nA

Zeit [min]	B [%]	C [%]
0	0	15
10	30	15
15	30	15
20	0	15
25	0	15

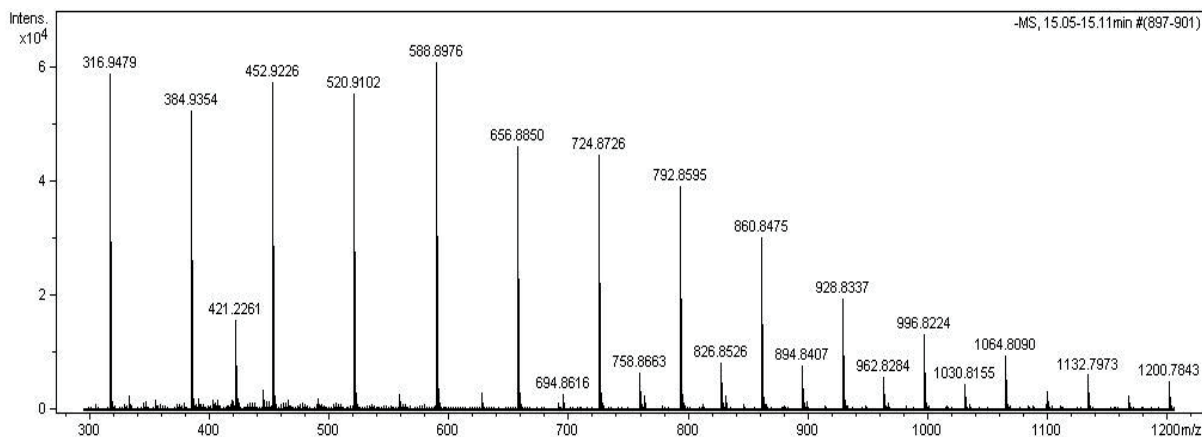


Abb. 13: Interne Massenkalibrierung, Messbereich 300-1200 m/z

Die Kapillarspannung des Massenspektrometers lag bei 4500 V. Das Spray-Gas (Stickstoff) wurde mit 4,0 bar, das Trockengas (ebenfalls Stickstoff) mit 10,0 L/min zugeführt. Die Trockentemperatur lag bei 200 °C. Aufgenommen wurde im negativen Modus. Im MS-Modus wurden Spektren mit einer Frequenz von 1 Hz in einem Massenbereich von 300-1200 m/z aufgenommen. Die Massekalibrierung erfolgte innerhalb jeder Messung mittels Na-Formiat-Clustern im jeweiligen Messbereich (Abb. 13). Als maximale akzeptable Standardabweichung über den gesamten Messbereich wurden 0,5 ppm festgelegt.

Ergebnisse

Die Quantifizierung der Ap_nA erfolgte über die „Extrahierten Ionenchromatogramme“ (EIC) der Molekülonen $[M-H]^-$. Die Abbildungen 14-16 zeigen die entsprechenden EIC's mit den dazugehörigen Massenspektren. Der lineare Arbeitsbereich der Methode lag bei 0,05-5 $\mu\text{g/mL}$ Ap_nA . Daraus ergeben sich für Fleisch- und Fischproben messbare Gehalte von ca. 300-4000 $\mu\text{g/100 g}$, für Milchproben 5-500 $\mu\text{g/100 mL}$.

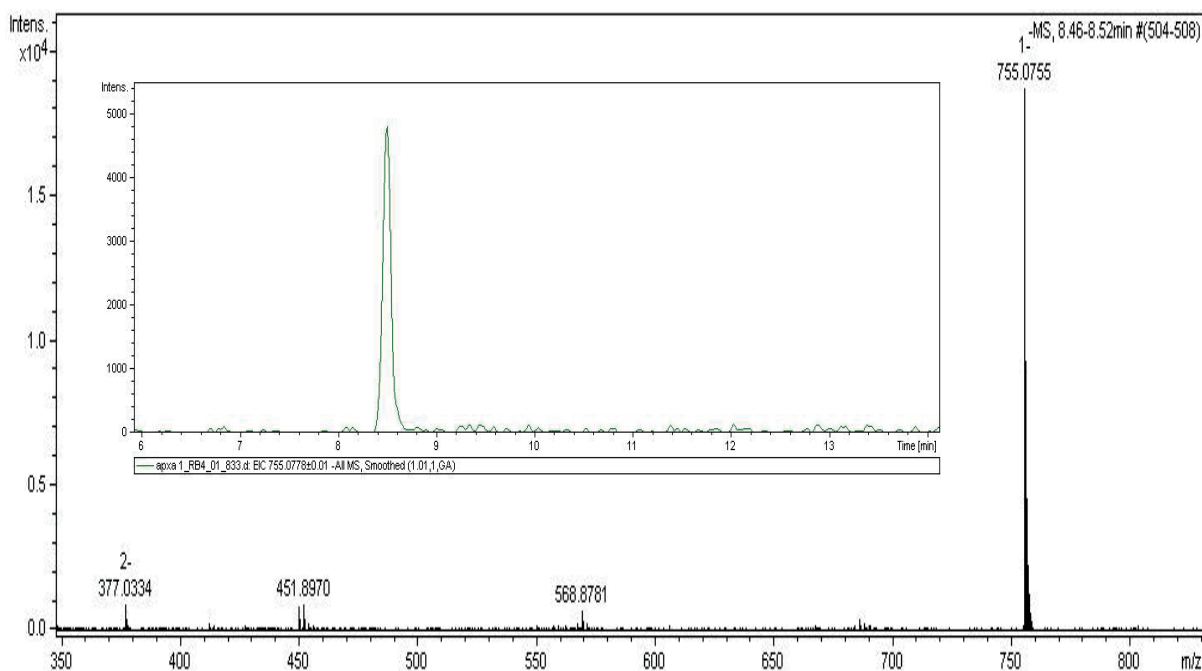


Abb. 14: EIC und Massenspektrum von Ap_3A $[M-H]^-$

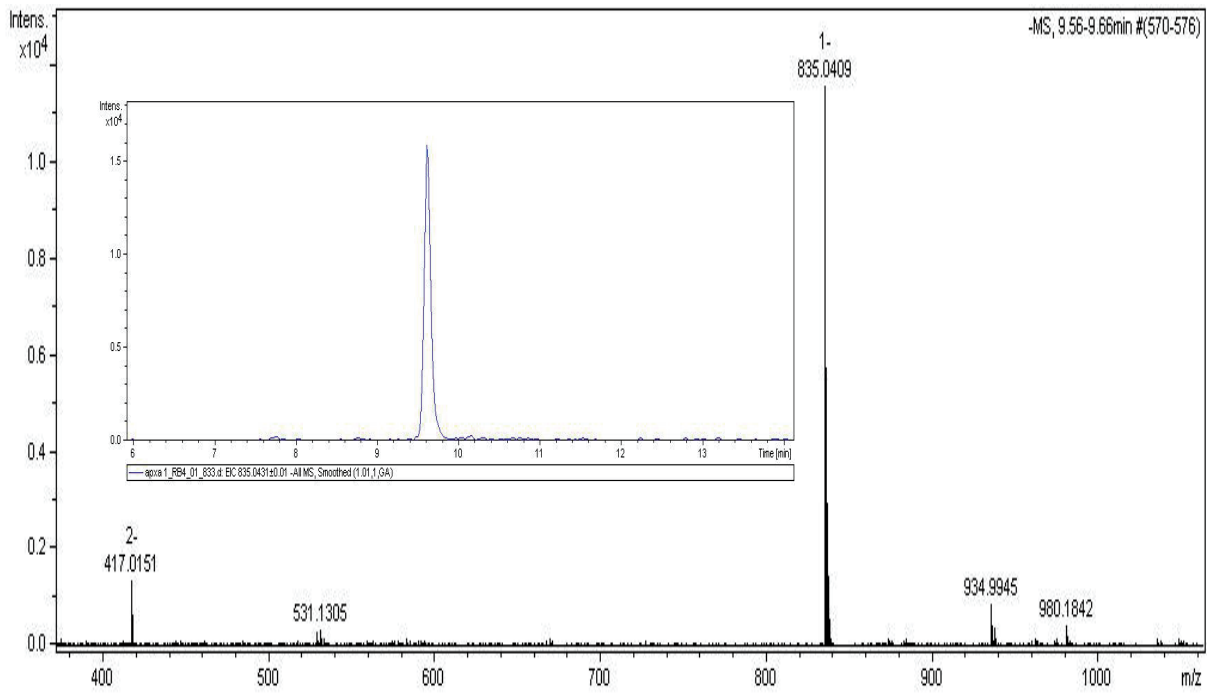


Abb. 15: EIC und Massenspektrum von Ap₄A [M-H]⁻

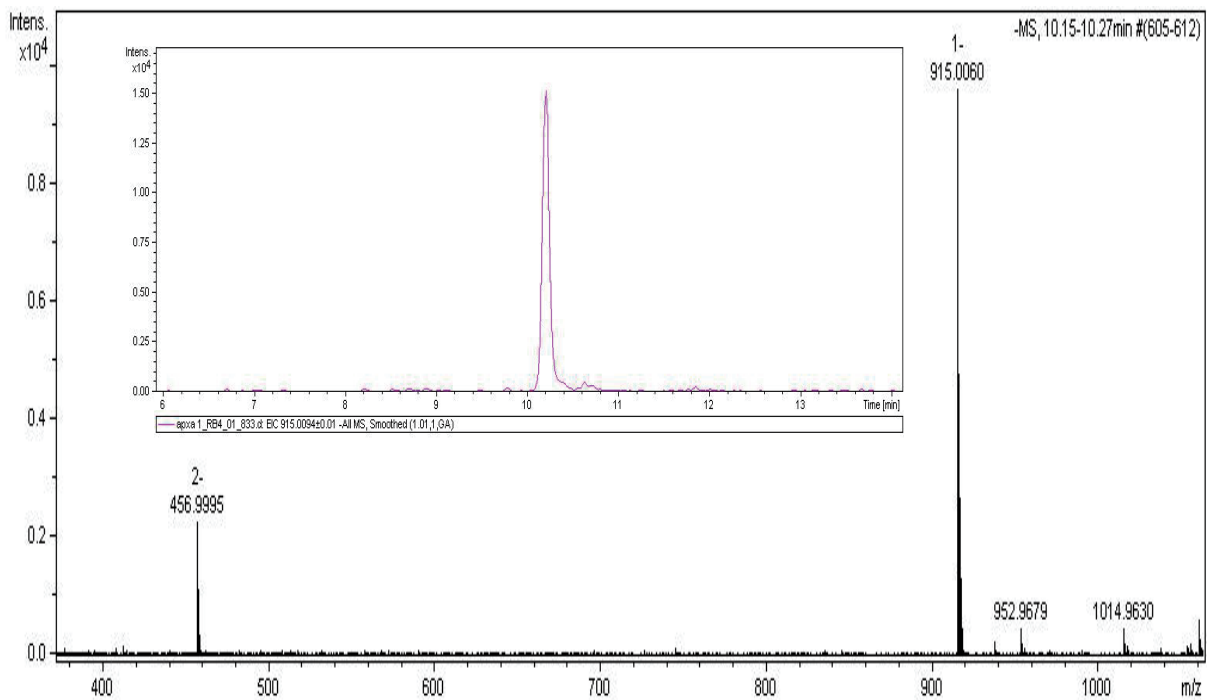


Abb. 16: EIC und Massenspektrum von Ap₅A [M-H]⁻

Tabelle 6 fasst die massenspektrometrisch ermittelten Daten zusammen. Auf Grund der exakten internen Massekalibrierung liegt der Massefehler zwischen den gemessenen und berechneten Molekülionenmassen (m/z) unter 2 ppm.

In einem Teil der Fisch- und Fleischproben konnten Ap_nA nachgewiesen, aber nicht quantifiziert werden. In den Milchproben waren Ap_nA nicht nachweisbar.

Tab. 6: Retentionszeiten und TOF-MS Daten der Ap_nA

Verbindung	Summenformel	Retentionszeit [min]	m/z [M-H] berechnet	m/z [M-H] gemessen	Massefehler [ppm]
Ap ₃ A	C ₂₀ H ₂₇ N ₁₀ O ₁₆ P ₃	8,5	755,0741	755,0755	-1,85
Ap ₄ A	C ₂₀ H ₂₈ N ₁₀ O ₁₉ P ₄	9,6	835,0404	835,0409	-0,60
Ap ₅ A	C ₂₀ H ₂₉ N ₁₀ O ₂₂ P ₅	10,2	915,0068	915,0060	0,87

Im Anschluss sollten die bereits gewonnenen Probenextrakte auf weitere qualitätsrelevante Metaboliten untersucht werden. Dazu musste der Massebereich der Detektionsmethode auf 50-1200 m/z erweitert werden. Außerdem erfolgte eine masseabhängige Fragmentierung der jeweils intensivsten Masse. Im MS/MS Modus erfolgte die Spektrenaufnahme mit 0,5 Hz.

Abbildung 17 zeigt das Basispeak-Chromatogramm einer Schweinefleischprobe.

Im Retentionszeitfenster von 2,92-3,27 min (Abb. 18 und Abb. 19) wurde eine sehr intensive Molekülionenmasse von 347,0398 m/z detektiert.

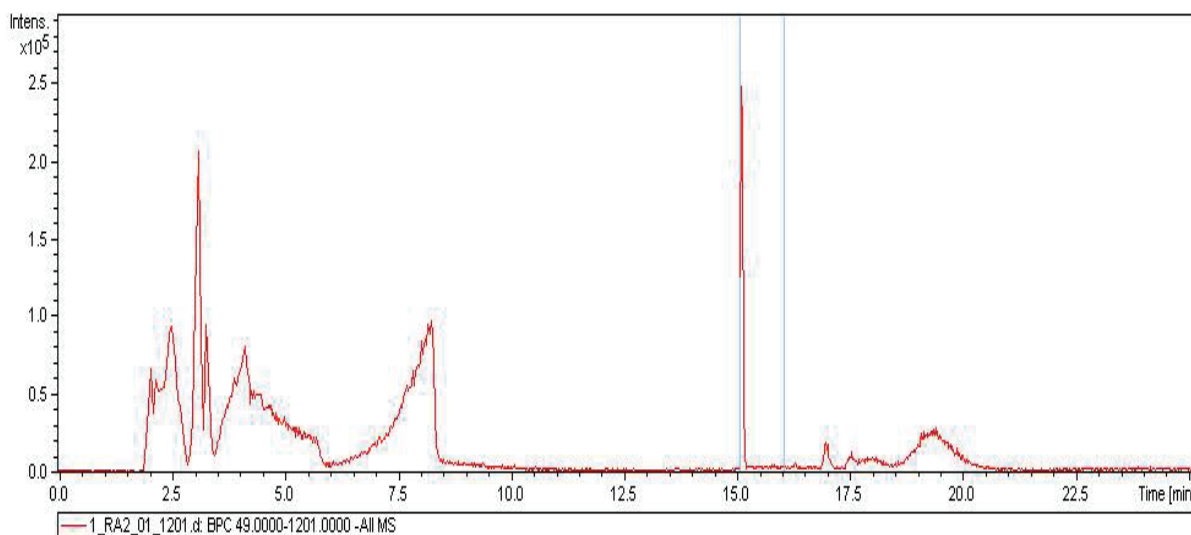


Abb. 17: Basispeak-Chromatogramm eines Schweinefleischextraktes

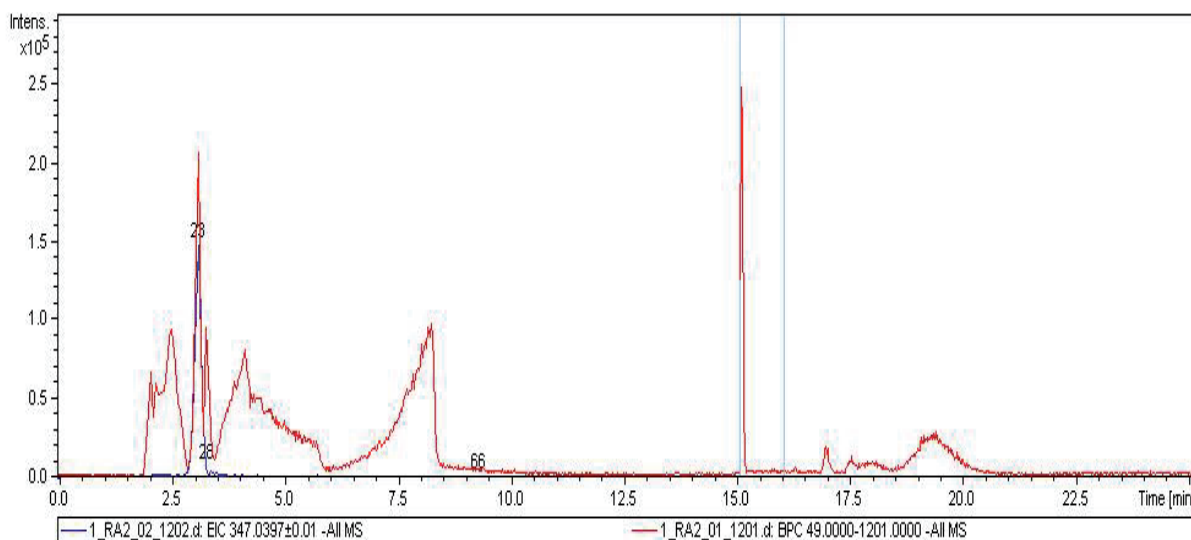


Abb. 18: Basispeak-Chromatogramm eines Schweinefleischextraktes überlagert vom EIC 347,0397±0,01 m/z

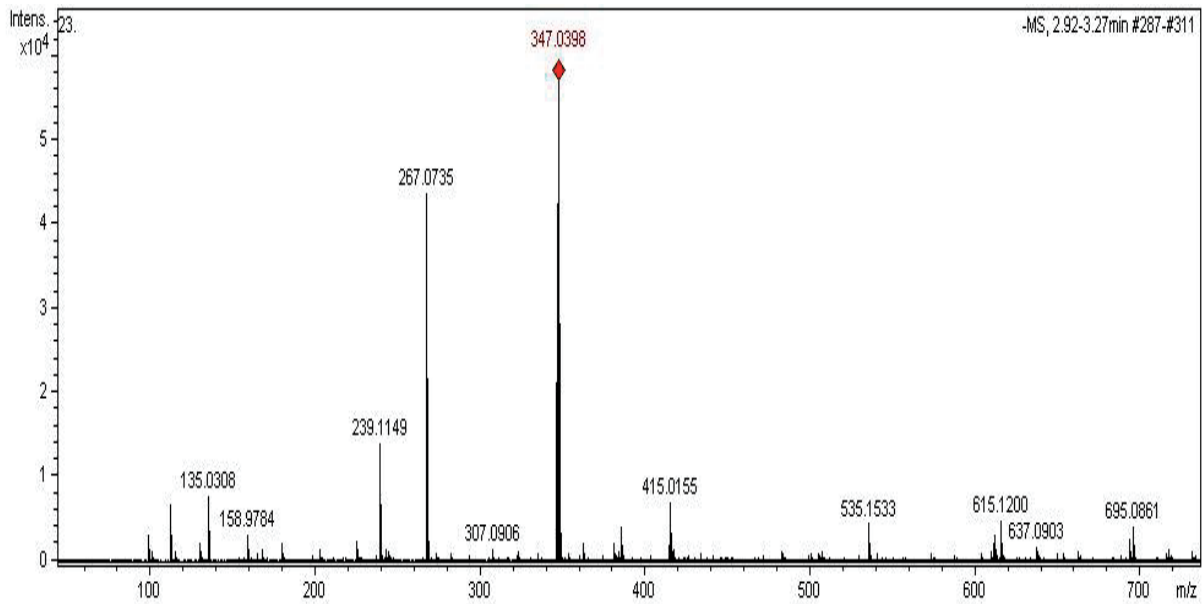


Abb. 19: Massenspektrum im Retentionszeitfenster 2,92-3,27 min

Eine Recherche auf der Internetseite des Scripps Center for Metabolomics in der „Metabolite and Tandem MS Database (METLIN)“ ergab 3 mögliche Treffer: Inosin-5'-monophosphat sowie Inosin-3'-monophosphat mit einer Massedifferenz von 0 ppm sowie 2-(α -D-Mannosyl)-3-phosphoglycerat mit einer Massedifferenz von 3 ppm (jeweils auf das [M-H]⁻ bezogen). Die jeweils intensivsten Massen in einem definierten Zeitfenster wurden innerhalb der gleichen Messung einer Fragmentierung unterzogen. Die Fragmentierungsenergien wurden in einer masse-

abhängigen Matrix definiert und jeweils im Bereich von 80 % und 120 % eingesetzt.

Abbildung 20 zeigt die entsprechende Fragmentierung von 347,0398 m/z. Die Zuordnung z.B. der Fragmentionen 150,9797 m/z und 211,0012 m/z zu den in der Abbildung gezeigten Strukturformeln ergab die eindeutige Identifizierung von Inosin-5'-monophosphat (IMP). Auf analoge Weise wurden unter anderen AMP, ADP, GMP und UMP sowohl in Fleisch als auch in Fischextrakten identifiziert.

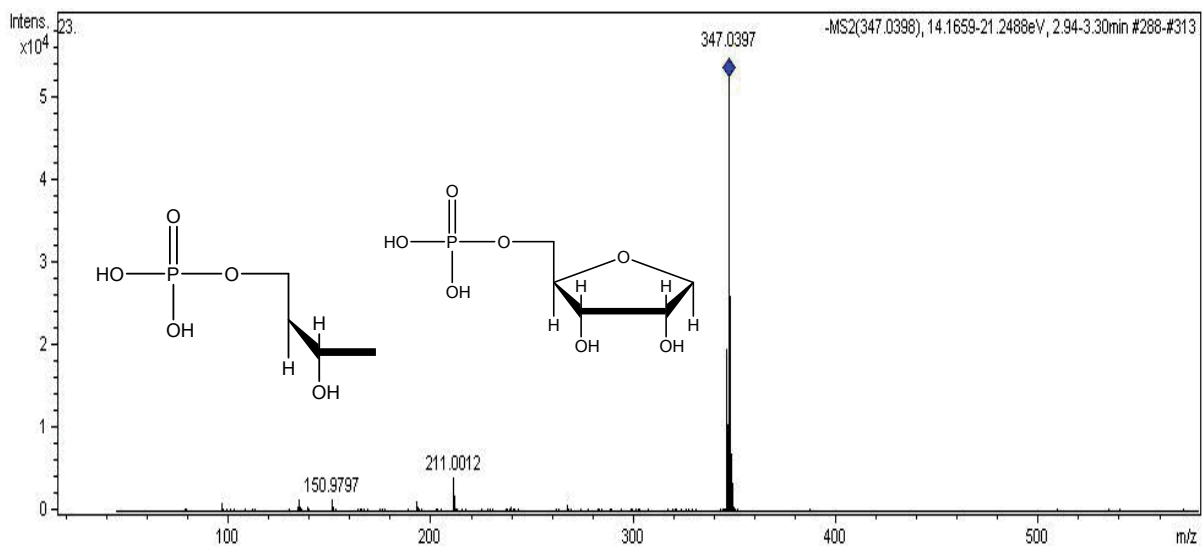


Abb. 20: MS/MS von 347,0398 m/z im Retentionszeitfenster 2,92-3,27 min

Zusammenfassung: Dinucleosidpolyphosphate in Fisch-, Milch- und Schweinefleischproben

Es konnte eine Methode entwickelt werden, mit der unter Einsatz einer HPLC-ESI-TOF-Kopplung seltene Nucleotide – konkret Diadenosinpolyphosphate – in physiologisch relevanten Konzentrationen nachweisbar sind. Die bisher ausgewählten Probenmatrizes scheinen jedoch weniger gut geeignet zu sein, Ap_nA in ausreichendem Maße isolieren zu können. In diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung z. B. von Thrombozyten oder der glatten Gefäßmuskulatur in Betracht zu ziehen. Des Weiteren sollten alternative Probengewinnungs- bzw. Probenaufbereitungsstrategien gesucht werden. Mononucleotide wie AMP, IMP, GMP und UMP sowie ADP konnten in den Fleisch- und Fischextrakten qualitativ nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse ergänzen die Ergebnisse der Ribonucleosidanalytik. Eine Quantifizierung der entsprechenden Nucleotide wäre wünschenswert.

Zusammenfassung und Ausblick

In einem relativ kurzen Zeitraum wurden in einem Gemeinschaftsprojekt des Institutes für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch in Kiel mit der Arbeitsgruppe Analytik in Kulmbach Lebensmittel tierischen Ursprungs auf eine Reihe qualitätsrelevanter Metaboliten hin untersucht. Es wurden neue Erkenntnisse zu Ribonucleosidgehalten sowie den Gehalten an freien Aminosäuren, speziell Taurin, in unterschiedlichen Lebensmitteln erhalten. Außerdem wurde eine neue Analysenmethode zum Nachweis seltener Nucleotide entwickelt, die außerdem Perspektiven eröffnet, ein breites Screening auf weitere relevante Verbindungen durchzuführen. Denkbar wäre in der Zukunft eine Erweiterung der Probenanzahl, um statistische Auswertungsverfahren für alle Zielanalyten sinnvoll einsetzen zu können. Außerdem käme die Erweiterung der Bandbreite der betrachteten Spezies in Betracht.

Danksagung

Wir danken:

Herrn Thomas Schmidt vom Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch für die sorgfältige Durchführung der Aminosäureanalysen.

Frau Longina Reimann und Frau Sabine Splitzer vom Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch für die sorgfältige Durchführung der Ribonucleosidanalysen.

Dem Städtischen Schlachthof Kulmbach um Herrn Dirk Grünh für die freundliche Unterstützung bei der Probenahme der Schweinefleischproben.

Frau Ute Köstner sowie Frau Dr. Aneka Bauer vom Institut für Sicherheit und Qualität bei Fleisch für die Durchführung der Vollanalysen.

Frau Karin Fischer und Frau Edith Müller für die Technische Assistenz bei der Probenvorbereitung für die Messung der Diadenosinpolyphosphate.

Literatur

Antoine, F.R., Wei, C.I., Litell, R.C. und Marshall, M.R. (1999): HPLC Method for analysis of free amino acids in fish using o-phthaldialdehyde pre-column derivatization. *J Agric Food Chem*, 47, S. 5100-5107

Belitz, H.-D. und Grosch, W. (1992): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 4. Auflage

Castany, M., Jordi, I., Catala, J., Gual, A., Morales, M., Gasull, X. und Pintor, J. (2011): Glaucoma patients present increased levels of diadenosine tetraphosphate, Ap_4A , in aqueous humour. *Experimental Eye Research*, 92, S. 221-226

Ebersdobler, H.F., Braasch, S. und Trautwein, E.A. (1990): Einflussgrößen auf den Gehalt an Taurin, Harnstoff und freien Aminosäuren in der Milch mit besonderer Berücksichtigung des Laktationsstadiums und der Rinderrassen. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 63, S. 1-7

Guzmán-Arangué, A., Crooke, A., Perali, A., Hoyle, C. H. V. und Pintor, J. (2007): Dinucleoside polyphosphates in the eye: from physiology to therapeutics. *Progress in Retinal and Eye Research*, 26, S. 674-687

Jankowski, V., Vanholder, L., Henning, L., Karadogan, S., Zidek, W., Schlüter, H. und Jankowski, J. (2005): Isolation and quantification of dinucleoside polyphosphates by using monolithic reverse phase chromatography columns. *Journal of Chromatography B*, 819, S. 131-139

Kron, M., Leykam, J., Kopaczewski, J. und Matus, I. (2007): Identification of diadenosine triphosphate in *Brugia malayi* by reverse phase high performance liquid chromatography and MALDI mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 856, S. 234-238

- Luten, J. (2008): Tailor-made functional seafood for consumers: dietary modulation of selenium and taurine in farmed fish, in: *Improving farmed fish quality and safety*. Ed. O. Lie, CRC Press, S. 343-362
- Madruga, M. S., Elmore, J. S., Oruna-Concha, M. J., Balagiannis, D. und Mottram, D. S. (2010): Determination of some water-soluble aroma precursors in goat meat and their enrolment on flavour profile of goat meat. *Food Chemistry*, 123, S. 513-520.
- Martin, D., Kiesner, C. und Schlimme, E. (1997): Ribonucleosides: Chemical Parameters for Controlling the Heat Treatment of Milk. *Nahrung / Food*, 41 (5), S. 258-267.
- Martin, D. und Meisel, H. (2006): Ribonucleosides: Interesting nucleoside compounds and chemical parameters for characterization of technological treatment of milk and milk products. *Deut. Lebensmittel-Rund.*, 102 (11), S. 501-508.
- Martin, D. und Meisel, H. (2007): Nucleoprotein-derived and unbound ribonucleosides: bioactivity and potential applications. *Curr. Pharm. Des.*, 13 (9), S. 921-932.
- Martin, D., Lorenzen, P. Chr. und Schrader, K. (2008): Influence of high-pressure treatment on ribonucleoside contents and enzyme activities in milk. *Ernährung/Nutrition*, 32 (2), S. 56-64.
- Martin, D., Schlimme, E. und Tait, D. (2011): Nucleosides and Nucleotides in milk, in: *Encyclopedia of Dairy Sciences, Second Edition*. Eds. J. W. Fuquay, P. F. Fox, P. L. H. Mc Sweeney, Academic Press, vol. 3, S. 971-979.
- McLennan, A. G. (2000): Dinucleoside polyphosphates – friend or foe? *Pharmacology & Therapeutics*, 87, S. 73-89
- Mehaia, M.A. und Al-Kanhal, M.A. (1992): Taurine and other free amino acids in milk of camel, goat, cow and man. *Milchwissenschaft*, 47, S. 351-353
- Meinert, L., Tikk, K., Tikk, M., Brockhoff, P. B., Bejerholm, C. und Aaslyng, M. D. (2008): Flavour formation in pork *semimembranosus*: Combination of pan-temperature and raw meat quality. *Meat Sci.*, 80, S. 249-258.
- Meisel, H., Günther, S., Martin, D. und Schlimme, E. (1998): Apoptosis induced by modified ribonucleosides in human cell culture systems. *FEBS-Lett.*, 433, S. 265-268.
- Miras-Portugal, M. T., Gualix, J. und Pintor, J. (1998): The neurotransmitter role of diadenosine polyphosphates. *FEBS Letters* 430, S. 78-82
- Monds, R. D., Newell, P. D., Wagner, J. C., Schwartzman, J. A., Lu, W., Rabinowitz, J. D. und O'Toole, G. A. (2010): Di-Adenosine Tetraphosphate (Ap₄A) Metabolism Impacts Biofilm Formation by *Pseudomonas fluorescens* via Modulation of c-di-GMP-Dependent Pathways. *Journal of Bacteriology*, 192, S. 3011-3023
- Ogilvie, A. und Jakob, P. (1983): Diadenosine 5',5'''-P¹, P³ – Triphosphate in Eucaryotic Cells: Identification and Quantitation. *Analytical Biochemistry*, 134, S. 382-392
- Özogul, F., Kamari, N., Küley, E. und Özogul, Y. (2009): The effects of ice storage on inosine monophosphate, inosine, hypoxanthine, and biogenic amine formation in European catfish (*Silurus glanis*) filets. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 44, S. 1966-1972.
- Renner, E., Schaafsma, G. und Scott, K.J. (1989): Proteins as micronutrients. In: *Mikronutrients in milk and milk-based food products*, Hrsg. E. Renner, Elsevier, S. 9-21
- Ruiz-Capillas, C. und Jiménez-Colmenero, F. (2010): Biogenic amines in Seafood Products, in: *Handbook of Seafood and Seafood Product Analysis*. Eds. L.M.L. Nollet, F. Toldrá, CRC Press, S. 833-850
- Ruiz-Capillas, C. und Moral, A. (2001): Changes in free amino acids during chilled storage of hake (*Merluccius merluccius* L.) in controlled atmospheres and their use as a quality control index. *Eur Food Res Technol*, 212, S. 302-307
- Schlimme, E. und Boos, K.-S. (1990): Ribonucleosides in body fluids: on-line chromatographic cleanup and analysis by a column switching technique, in: *Chromatography and modification of nucleosides, Journal of Chromatography Library*. Eds. C. W. Gehrke, K. C. T. Kuo, Elsevier Science Publishers, 45c, C115-C145.
- Schlimme, E., Ott, F. G. und Kiesner, C. (1994): Reaction kinetics of heat induced formation of N⁶-methyladenosine in milk. *Int. Dairy J.*, 4, S. 617-627.
- Schlimme, E. und Raezke, K.-P., Ott, F.G. (1991): Ribonucleosides as minor milk constituents. *Z. Ernährungswiss.*, 30, S. 138-152.
- Schlüter, H. (2006): Alarmone: Signalfaktoren in der lokalen Regulation. In: *Ganten/ Ruckpaul* (Hrsg.), *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*. *Molekulare Medizin* S. 201-222. Berlin/ Heidelberg: Springer-Verlag
- Schüller, I. (2007): Bestimmung von freien Aminosäuren und biogenen Aminen in Lebensmitteln mittels UPLC. Diplomarbeit an der Universität für Bodenkultur Wien
- Tejada, M. (2009): ATP-derived products and k-value determination, in: *Fishery Products, quality, safety and authenticity*. Eds. H. Rehbein, J. Oehlschlager, Wiley-Blackwell, S. 73-88.
- Undeland, I. (2009): Selected amino acids in fish, in: *Marine functional food*. Ed. J. B. Luten, Wageningen Academic Publishers, S. 43-47
- Yamori, Y., Taguchi, T., Hamada, A., Kunimasa, K., Mori, H. und Mori, M. (2010): Taurine in health and diseases: consistent evidence from experimental and epidemiological studies. *J Biomed Sci*, 17 Suppl 1, S. 6