

**Untersuchungen zum Verbleib von ausgewählten
¹⁴C-markierten Lebensmittelinhaltsstoffen nach
Lebensmittelverarbeitungsprozessen und der Verdauung**

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

- Doktor der Naturwissenschaften -

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der
Bergischen Universität Wuppertal



vorgelegt von

Patricia Elisabeth Leitner (M.Sc.)

aus Wien

Wuppertal, November 2021

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit
von September 2018 bis November 2021
unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. Mark Bücking und Herrn Prof. Dr. Hans-Willi Kling

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20220324-113922-5

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20220324-113922-5>]

DOI: 10.25926/11kz-rt13

[<https://doi.org/10.25926/11kz-rt13>]

In Kooperation mit dem ICON-Projekt und Unterstützung TALENTA Förderprogramm.



Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe. Dabei habe ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet und alle wörtlich oder inhaltlich übernommen Stellen als solche gekennzeichnet. Des Weiteren erkläre ich, dass die Dissertation weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung schon einer anderen Fakultät einer wissenschaftlichen Hochschule vorgelegen hat.

Schmallenberg, den _____
(Datum)

(Patricia Elisabeth Leitner)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Mark Bücking für die Möglichkeit, meine Promotion in der Abteilung Umwelt- und Lebensmittelanalytik am Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME durchführen zu können. Weiterhin möchte ich mich für viele wertvolle Ratschläge und Anregungen sowie die internationale Kooperation mit der Monash-Universität bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Hans-Willi Kling bedanke ich mich vielmals für die freundliche Betreuung und Unterstützung meiner externen Promotion.

Dr. Bernd Göckener möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung meiner Arbeit in Form von interessanten Diskussionen sowie wertvollen Anregungen und Ratschlägen danken.

Ebenfalls möchte ich mich für die engagierte und tolle Unterstützung in Form von wissenschaftlichen Abschlussarbeiten bei Timur Saraçoğlu, Bianca Unewisse und Anna Weis bedanken.

Meinen Kollegen aus der Abteilung Umwelt- und Lebensmittelanalytik Claire MacKenzie, Hardebusch, Stephan Hennecke, Kerstin Bücking, Jan Bröckelmann, Claire MacKenzie, Lisa Pepping, Jens Nowak, René Lämmer und ganz besonders Kevin Severin möchte ich herzlich für die Unterstützung im Labor und jeglicher Hilfestellungen danken.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Kollegen von der Monash University Prof. Dr. Louise Bennett, Dr. Margaret Murray und Dr. Sophie Selby-Pham für die fachlichen Anregungen, Telefonkonferenzen und Projektmeetings bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern des IME bedanken, die bei Fragen immer gern geholfen haben. Besonders bedanke ich mich hierfür bei Theo Görtz, Mike Kruse, Alice Drilling, Thomas Ludemann und Ruben Schlinkert für die Unterstützung der Planung und Durchführung radioaktiver Versuche. Bei Dr. Christan Gärtner möchte ich mich besonders für die Aufnahme und Auswertung der NMR-Spektren bedanken.

Für die freundliche Aufnahme und vielen lustigen Momente möchte ich allen Kollegen aus dem "Wilzenberg-Raum" danken, ohne denen das Leben im Sauerland um einiges langweiliger gewesen wäre.

Zuletzt bedanke ich mich noch bei meiner Familie und Freunde, die mich in dieser herausfordernden Zeit stets unterstützt haben.

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ALA	alpha-Linolensäure
Bq	Becquerel
CCS	collision cross sections
CE	Kollisionsenergie; engl. collision energy
CID	Kollisionsinduzierte Fragmentierung; engl. collision induced dissociation
COSY	engl. correlation spectroscopy
CPM	Zählungen pro Minute; engl. counts per minute
DKP	(2S-cis)-(-)-5-Benzyl-3,6-dioxo-2-piperazin-essigsäure
DPM	Zerfälle pro Minute; engl. desintegrations per minute
dSPE	dispersive Festphasenextraktion; engl. dispersive solid phase extraction
EG	Europäische Gemeinschaft
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit; engl. European Food Safety Agency
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtAc	Ethylacetat
FA	Ameisensäure; engl. formic acid
HCD	Higher-energy collisional dissociation (s. HCD-Kollisionszelle, Orbitrap)
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie (engl. Hydrophilic interaction chromatography)
HLB	Hydrophile lipophile Balance (engl. Hydrophilic lipophilic balance; hier: Oasis SPE-Variante)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie; engl. high-resolution mass spectrometry
LSC	Flüssigszintillationszählung; eng. liquid scintillation counting
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie

MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NERs	nicht extrahierbare Rückstände
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
NMR	Kernspinresonanz (Spektroskopie); engl. nuclear magnetic resonance (spectroscopy)
PAH	Phenylalaninhydroxylase
PKU	Phenylketonurie
PMT	Photomultiplier
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
SPE	Festphasenextraktion; engl. solid phase extraction
TOCSY	engl. total correlation spectroscopy
t-SIM	gezielte Einzelionenmessung; engl. target single ion monitoring
U(H)PLC	Ultra-Hochleistungs-Flüssigchromatographie; engl. Ultra (High) Performance Liquid Chromatography
UHQ	Reinstwasser; engl. Ultra High Quality Water
USI	Unispray
YG	Yttriumglas

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abstract	XII
Zusammenfassung.....	XIV
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Verdauung.....	3
2.1.1 Metabolisierung des L-Tyrosins	3
2.1.2 Neurotransmitter des L-Tyrosins.....	6
2.1.3 Synthese und Metabolisierung der Alpha-Linolensäure.....	8
2.2 Lebensmittelverarbeitungsprozesse.....	10
2.2.1 L-Tyrosin als Lebensmittelinhaltsstoff.....	11
2.2.2 ALA als Lebensmittelinhaltsstoff	12
2.2.3 Aspartam als Lebensmittelzusatzstoff	13
2.2.3.1 Verwendung und Herstellung	13
2.2.3.2 Metabolisierung und Phenylketonurie	14
2.2.3.3 Vorbehalte gegenüber Aspartam als Süßstoff.....	15
2.3 Radioaktiv-Analytik.....	16
2.3.1 Aktivitätsbestimmung.....	17
2.3.2 Radio-Flüssigchromatographie und HRMS	19
2.3.2.1 Hochauflösendes Massenspektrometer – Q Exactive™ Plus	21
2.3.2.2 Hochauflösendes Massenspektrometer – Vion-IMS-QToF	23
3 Material und Methoden.....	26
3.1 Verbleib von Lebensmittelinhaltsstoffen nach der Verdauung.....	26
3.1.1 Tyrosin.....	28
3.1.1.1 Tyrosin in der Matrix Plasma.....	33
3.1.1.2 Tyrosin in der Matrix Darm.....	34
3.1.1.3 Tyrosin in der Matrix Cerebellum	36
3.1.1.4 Tyrosin in der Matrix Exkremente.....	37

3.1.2	ALA.....	39
3.1.2.1	ALA in der Matrix Leber.....	41
3.1.2.2	ALA in der Matrix Exkrememente.....	42
3.1.3	Chemikalien und Geräte	43
3.2	Verbleib von Lebensmittelinhaltsstoffen nach Lebensmittel- verarbeitungsprozessen	45
3.2.1	Tyrosin.....	46
3.2.1.1	Probenaufarbeitung.....	46
3.2.1.2	Radio-UHPLC-HRMS-Messungen	47
3.2.1.3	Identifizierung potenzieller Abbauprodukte	48
3.2.2	ALA.....	55
3.2.3	Aspartam	56
3.2.3.1	Radio-UHPLC-HRMS-Methodenentwicklung.....	56
3.2.3.2	Erhitzungsversuch Kleingebäck	60
3.2.3.3	Erhitzungsversuch Rapsöl.....	61
3.2.3.4	Erhitzungsversuch Kaffee	62
3.2.3.5	Identifizierung potenzieller Abbauprodukte	63
3.2.3.6	Erhitzungsversuche wässriger Lösungen.....	68
3.2.4	Chemikalien und Geräte	71
4	Ergebnisse	74
4.1	Verbleib von Lebensmittelinhaltsstoffen nach der Verdauung.....	74
4.1.1	Tyrosin.....	74
4.1.1.1	Tyrosin in der Matrix Plasma.....	75
4.1.1.2	Tyrosin in der Matrix Darm.....	77
4.1.1.3	Tyrosin in der Matrix Cerebellum	79
4.1.1.4	Tyrosin in der Matrix Exkrememente.....	80
4.1.2	ALA.....	85
4.1.2.1	ALA in der Matrix Leber.....	86
4.1.2.2	ALA in der Matrix Exkrememente.....	86
4.2	Verbleib von Lebensmittelinhaltsstoffen nach Lebensmittel- verarbeitungsprozessen	90

4.2.1	Tyrosin.....	90
4.2.1.1	Probenaufarbeitung.....	90
4.2.1.2	Radio-UHPLC-HRMS-Messungen	90
4.2.1.3	Identifizierung potenzieller Abbauprodukte	92
4.2.2	ALA.....	97
4.2.3	Aspartam	99
4.2.3.1	Radio-UHPLC-HRMS-Methodenentwicklung	99
4.2.3.2	Erhitzungsversuch Kleingebäck	100
4.2.3.3	Erhitzungsversuch Rapsöl.....	101
4.2.3.4	Untersuchung potenzieller Abbauprodukte	103
4.2.3.5	Erhitzungsversuch Kaffee	112
4.2.3.6	Erhitzungsversuche in wässrigen Lösungen	113
5	Diskussion.....	123
5.1	Verbleib von Lebensmittelinhaltsstoffen nach der Verdauung.....	123
5.1.1	Tyrosin.....	123
5.1.2	ALA.....	128
5.1.3	Versuchsübergreifende Diskussion	130
5.2	Verbleib von Lebensmittelinhaltsstoffen nach Lebensmittel- verarbeitungsprozessen	133
5.2.1	Tyrosin.....	133
5.2.2	ALA.....	134
5.2.3	Aspartam	135
5.2.4	Versuchsübergreifende Diskussion	141
6	Ausblick.....	143
7	Literaturverzeichnis	145
8	Anhang.....	153
8.1	Ergänzende Abbildungen	153
8.2	Ergänzende Tabellen	170
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	171
8.4	Tabellenverzeichnis.....	176

Abstract

A direct link between certain food ingredients and specific human diseases is well known. In contrast little is known about which transformation products formed during digestion or food processing are associated with health effects. This thesis was implemented in an international project addressing these questions.

The first part of this thesis investigates the fate of two food ingredients, L-tyrosine and alpha-linolenic acid, after digestion. For this purpose, analytical methods were developed to contribute to the identification of metabolites of these parent compounds. A feeding study was conducted with pigs administered with the ^{14}C -labeled parent substances. Due to the low radioactivity of the samples matrix, elaborate extraction methods were developed. The samples were measured by using ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry with an intermediate radio detector (radio-UHPLC-HRMS). The excrement samples of both test groups were the only ones to show the required activity per gram to detect radio peaks, whereas for the other matrices, despite elaborate extraction methods, no metabolites could be detected by radio detector. Nevertheless, by showing the complexity of metabolite identification, approaches or suggestions for further research could be given.

The second part of this thesis deals with food processing experiments. For this purpose, the ^{14}C -labeled compounds from the digestion study were used and typical frying experiments were conducted. Additionally, the sweetener aspartame was examined and the formation of possible degradation products was investigated after various food processing experiments. Furthermore, the stability of aspartame in realistic use, such as in coffee or diet coke, was examined. For this purpose, a ^{14}C -labeled aspartame standard was ordered and the samples were measured using radio-UHPLC-HRMS. In total, five degradation products of aspartame were detected. Two degradation products, already described in the literature, were identified using the corresponding standards. For one unknown degradation product, the structure could be elucidated by proposed chemical formula and standard. For the investigation of a further unknown degradation product NMR (engl. nuclear magnetic resonance) measurements were conducted. A fifth degradation product showing reduced polarity was detected, for which four different structures were proposed using special fragmentation experiments. In summary, no degradation products were formed by the proper use of aspartame in hot beverages. Nevertheless, different degradation

products were found by heating experiments with still unknown toxicological properties. Therefore, the usage of aspartame in for instance bakery products should be carefully considered.

Zusammenfassung

Ein direkter Zusammenhang zwischen bestimmten Lebensmittelinhaltsstoffen und der menschlichen Gesundheit ist bekannt. Im Gegensatz dazu ist häufig unbekannt, welche Umwandlungsprodukte von Lebensmittelinhaltsstoffen, die bei der Lebensmittelverarbeitung oder -verdauung entstehen, mit welchen gesundheitlichen Auswirkungen assoziiert sind. Diese Arbeit ist in ein internationales Projekt implementiert, das sich mit diesen Fragestellungen beschäftigt.

Der erste Teil dieser Arbeit behandelt den Verbleib von zwei Lebensmittelinhaltsstoffen nach der Verdauung. Bei den Lebensmittelinhaltsstoffen handelt es sich um L-Tyrosin und Alpha-Linolensäure. In dieser Arbeit wurden analytische Methoden entwickelt, um zur Identifizierung von Metaboliten dieser Ausgangsverbindungen beizutragen. Hierfür wurde eine Fütterungsstudie mit Schweinen durchgeführt, denen die ^{14}C -markierten Ausgangssubstanzen verabreicht wurden. Für die einzelnen Matrices wurden aufgrund der niedrigen Aktivitäten aufwendige Extraktionsmethoden entwickelt und die Proben mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen. Die Exkrement-Proben beider Versuchsgruppen zeigten als einzige die benötigte Aktivität pro Gramm zur Detektion von Radiopeaks. Hierfür wurden Radiopeaks detektiert, wohingegen für die anderen Matrices trotz aufwendiger Extraktionsmethoden keine Metabolite per Radiodetektor erfasst werden konnten. Dennoch konnte die Komplexität der Identifizierung von Metaboliten aufgezeigt und Ansätze bzw. Anregungen für weitere Forschungsarbeiten gegeben werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit Lebensmittelverarbeitungsprozessen. Dazu wurden die ^{14}C -markierten Verbindungen aus der Verdauungsstudie genutzt und in einem simulierten Frittier-Prozess untersucht. Bei der Alpha-Linolensäure kam es hierbei zur Bildung von flüchtigen Abbauprodukten und bei dem L-Tyrosin wurde ein Abbauprodukt mit einer Anlagerung an die Ausgangsverbindung detektiert. Zusätzlich wurde der Süßstoff Aspartam untersucht. Hierbei wurde die Bildung möglicher Abbauprodukte nach verschiedenen Lebensmittelverarbeitungsprozessen untersucht. Darüber hinaus wurde die Stabilität von Aspartam im realitätsnahen Gebrauch, wie zum Beispiel in Kaffee oder Cola Light, betrachtet. Hierfür wurde die ^{14}C -markierte Substanz eingesetzt und die Proben mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen. Insgesamt konnten fünf Abbauprodukte des Aspartams detektiert werden. Zwei Abbauprodukte, die bereits in der Literatur beschrieben sind, wurden mittels der entsprechenden Standards identifiziert. Für ein unbekanntes Abbauprodukt konnte die

Struktur durch Summenformelvorschlag und Standard aufgeklärt. Die Struktur eines weiteren unbekanntes Abbauproduktes wurde mittels NMR untersucht. Ein fünftes Abbauprodukt zeigte sich mit verringerter Polarität. Für dieses konnten vier verschiedene Strukturen durch spezielle Fragmentierungsexperimente vorgeschlagen werden. Bei der zweckmäßigen Anwendung von Aspartam in Heißgetränken konnten keine Abbauprodukte detektiert werden. Dennoch zeigten sich verschiedene Abbauprodukte bei Erhitzungsexperimenten mit bisher unbekanntes toxikologischen Eigenschaften. Demnach sollte die Verwendung von Aspartam zum Beispiel in Backwaren sorgfältig überlegt werden.

1 Einleitung und Zielsetzung

Eine der größten menschlichen Errungenschaften des letzten halben Jahrhunderts ist der Fortschritt in der Lebensmittelproduktion. Nahrungsmittel in ausreichender Menge und eine ausgewogene Ernährung stellen eine globale Herausforderung und die Basis für eine gesunde Gesellschaft dar. Eine Ernährungssicherheit besteht dann, wenn alle Menschen, zu jeder Zeit, physischen, sozialen und wirtschaftlichen Zugang zu ausreichenden, sicheren und nahrhaften Lebensmitteln haben [1].

Die Ernährungsforschung wird seit dem 19. Jahrhundert betrieben und liefert Erkenntnisse für gesundheitsfördernde Empfehlungen. Seit dem 21. Jahrhundert liegt der Fokus der Forschung auf Ernährungsformen, die die Prognose von koronaren Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs begünstigen [2]. Bei einigen psychischen Erkrankungen, wie beispielsweise bei Depressionen und Schizophrenie, wurde ein Zusammenhang zwischen psychischer Gesundheit und Ernährung in zahlreichen Studien festgestellt [3-8]. Insbesondere Aminosäuren, die als Präkursor für biogene Amine wie Dopamin und Serotonin dienen, stehen hierbei im Fokus [3-8]. Resultierend aus diesen Daten konnte ein Zusammenhang zwischen Depression und Ernährung im Kontext mit Übergewicht und westlicher Ernährung festgestellt werden [9, 10]. Ergänzend wurde in Studien festgestellt, dass westliche Ernährung einen negativen Einfluss auf das Verhältnis der Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren hat. Durch die erhöhte Aufnahme von Omega-6-Fettsäuren nimmt der Anteil an Omega-3-Fettsäuren ab. Dadurch wird deutlich mehr Arachidonsäure gebildet und entzündliche Prozesse im Körper werden gefördert [11].

Ein wichtiger Aspekt muss hierbei hervorgehoben werden: Nur die direkte Beziehung zwischen Lebensmittelinhaltsstoffen und Gesundheit ist bekannt. Im Gegensatz dazu ist unbekannt, welche Umwandlungsprodukte mit welchen gesundheitlichen Auswirkungen während der Verdauung bzw. der Lebensmittelverarbeitung assoziiert sind. Der erste Teil dieser Arbeit ist in ein internationales Projekt implementiert, das sich mit diesen Fragestellungen beschäftigt. Hier sollen erste Hilfestellungen geleistet werden, um anschließend eine exemplarische Bewertung und Entschlüsselung des Verbleibs der Alpha-Linolensäure und des L-Tyrosins nach der Verdauung zu erlangen.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit Lebensmittelverarbeitungsprozessen. Hierbei soll der Verbleib dieser Lebensmittelinhaltsstoffe nach einem Verarbeitungsprozess untersucht werden. Als zusätzliche Substanz wurde der Süßstoff Aspartam ausgewählt. Die Auswirkungen des Zuckerkonsums auf die Gesundheit sind ein kontroverses Thema. Viele Forschungsergebnisse zeigen, dass ein erhöhter Konsum von überschüssigem Zucker die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Typ-2-Diabetes fördert [12]. Aufgrund dessen wird nach Alternativen gesucht, die eine hohe Süßkraft und einen geringen physiologischen Brennwert aufweisen. Aspartam ist ein weit verbreiteter Süßstoff, der als Zusatzstoff in vielen Lebensmitteln Anwendung findet [13, 14]. Die Fragestellung in dieser Arbeit fokussiert sich auf die Untersuchung der Bildung möglicher Abbauprodukte bei Lebensmittelverarbeitungsprozessen. Ebenso wurde die Stabilität von Aspartam in wässrigen Lösungen in Abhängigkeit von Temperatur, pH-Wert und Zeit untersucht.

Durch Nutzung radioaktiver Nuklide – hier das radioaktive Kohlenstoff-Nuklid 14 (^{14}C) – können Ausgangsstoffe von Interesse gezielt markiert werden, sodass mit entsprechender Analytik deren Verbleib nachverfolgt werden kann. Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung von ausgewählten ^{14}C -markierten Substanzen nach Lebensmittelverarbeitungsprozessen und der Verdauung, um somit einen Beitrag zur Entschlüsselung des Verbleibs der Abbauprodukte oder Metabolite zu erhalten. Im Fokus stehen hierbei die Entwicklung geeigneter Probenvorbereitungsmethoden, Extraktionsverfahren sowie analytische Methoden. Diese umfassen flüssigchromatographische Trennverfahren in Kopplung mit hochauflösender Massenspektrometrie und Radiodetektoren.

2 Theoretische Grundlagen

Im folgenden Kapitel werden die Lebensmittelinhaltsstoffe L-Tyrosin, Alpha-Linolensäure – hinsichtlich ihrer Rolle bei der Verdauung beschrieben. Des Weiteren werden die Substanzen als Lebensmittelinhaltsstoffe eingeordnet. Hinsichtlich der Lebensmittelverarbeitungsprozesse wird der Süßstoff Aspartam vorgestellt und dessen Wirkung dargelegt. Anschließend wird ein Überblick über die Analytik mit radioaktiv markierten Substanzen gegeben.

2.1 Verdauung

Lebensmittel bestehen hauptsächlich aus Makromolekülen wie Proteinen, Polysacchariden und Lipiden. Um dem Körper die enthaltenen Nährstoffe zur Verfügung stellen zu können, muss die Nahrung verdaut werden [15]. Die Verdauung oder Digestion bezeichnet die hydrolytische Zerlegung komplexer Nahrungsstoffe in ihre monomeren Bestandteile. Dadurch entstehen aus hochmolekularen Verbindungen Niedermolekulare, wie zum Beispiel Aminosäuren sowie Mono- und Disaccharide. Die Verdauung beim Menschen findet vorwiegend im Mund, Magen, Zwölffingerdarm und im Dünndarm statt. Die meisten Nährstoffe werden im Dünndarm resorbiert. Nachdem die Makromoleküle in ihre Einzelbestandteile zerlegt wurden, werden diese über die Dünndarmzotten ins Blut und in die Lymphe übergeleitet. Dadurch werden die energiereichen Stoffe für den Organismus bereitgestellt [16]. Der Stoffwechsel bzw. Metabolismus darf nicht mit der Verdauung gleichgesetzt werden. Unter Stoffwechsel versteht man alle biochemischen Umwandlungen von Stoffen im Körper, z. B. die Umwandlung von Nahrungsmitteln in Zwischenprodukte, auch Metaboliten genannt. Um diese Makronährstoffe zur Verfügung stellen zu können, müssen sie zuerst verdaut werden. Die Verdauung ist somit die Voraussetzung für den Metabolismus [17].

2.1.1 Metabolisierung des L-Tyrosins

L-Tyrosin (IUPAC: (S)-2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)-propionsäure) ist eine aromatische Aminosäure, die in den meisten Proteinen vorkommt (siehe Abbildung 1).

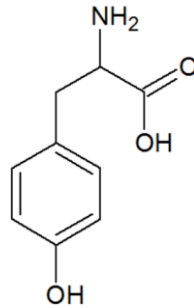


Abbildung 1: Strukturformel des L-Tyrosins

Im menschlichen und tierischen Organismus kann sie aus Phenylalanin, durch das Enzym 4-Monooxygenase, gebildet werden. Daher zählt sie zu den nicht-essentiellen Aminosäuren [18].

Um L-Tyrosin aus der Nahrung resorbieren zu können, müssen die Proteine erst gespalten werden. Durch die Magensäure werden die Proteine im Magen denaturiert und durch das Enzym Pepsin (Endopeptidase) in diverse Polypeptide gespalten. Anschließend werden sie im Duodenum (Zwölffingerdarm) durch Endopeptidasen (Trypsin, Chymotrypsin) und Exopeptidasen (Carboxypeptidase A und B) in Oligopeptide und freie Aminosäuren gespalten. Freie Aminosäuren können aktiv über Na⁺-abhängige Transport-Kanäle resorbiert werden. Das L-Tyrosin gelangt über Mukosazellen ins Blut und von dort weiter über die Pfortader zur Leber [19, 20]. In der Leber kann es über den anabolen Stoffwechsel zur Synthese von verschiedenen Makromolekülen verwendet oder katabol über die Transaminierung zur 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure abgebaut werden. Über eine anschließende Decarboxylierung und Hydroxylierung entsteht Homogenitinsäure, die zu Fumerat und Acetoacetat abgebaut wird. Dieser katabole Stoffwechsel dient der Energiegewinnung aus Proteinen (Abbildung 2) [21].

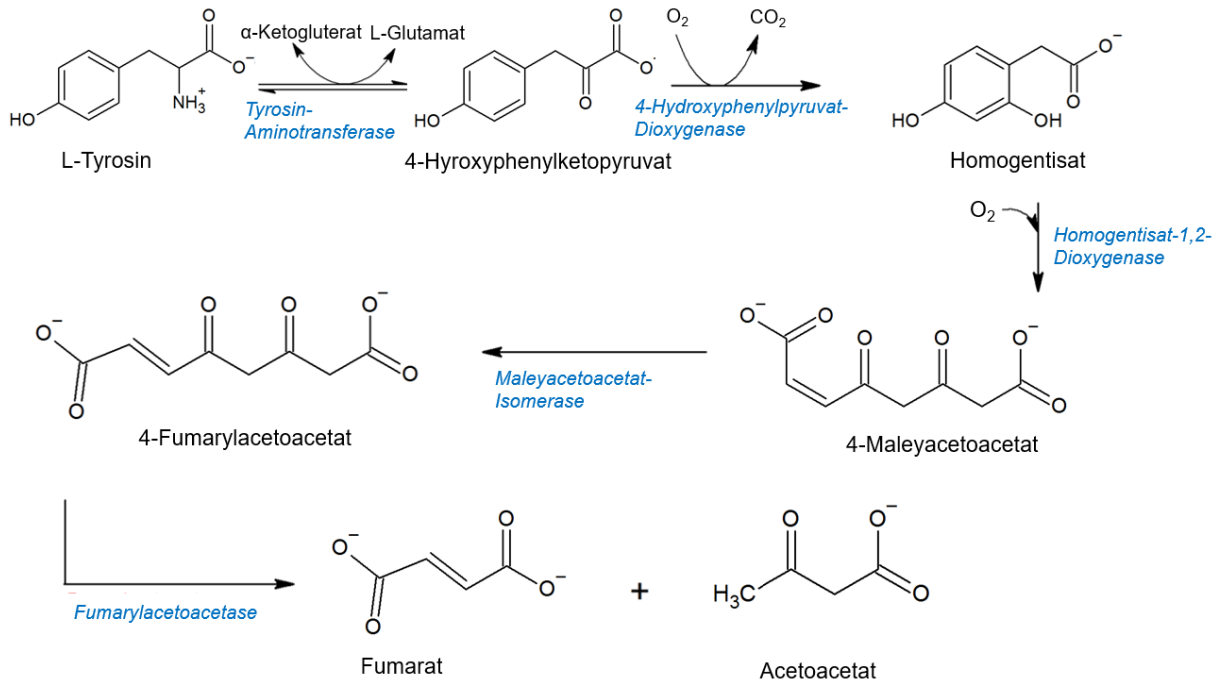


Abbildung 2: ketogener Abbau von L-Tyrosin [21]

Neben der Desaminierung kann L-Tyrosin über enzymatische Decarboxylierung mittels DOPA-Decarboxylase zu dem biogenen Amin Tyramin abgebaut werden. Anschließend kann über die Tyrosinase das Katecholamin Dopamin gebildet werden oder alternativ über die Monoamino-Oxidase das 4-Hydroxyphenylacetaldehyd, das weiter zu 4-Hydroxyphenylacetat reagiert (siehe Abbildung 3).

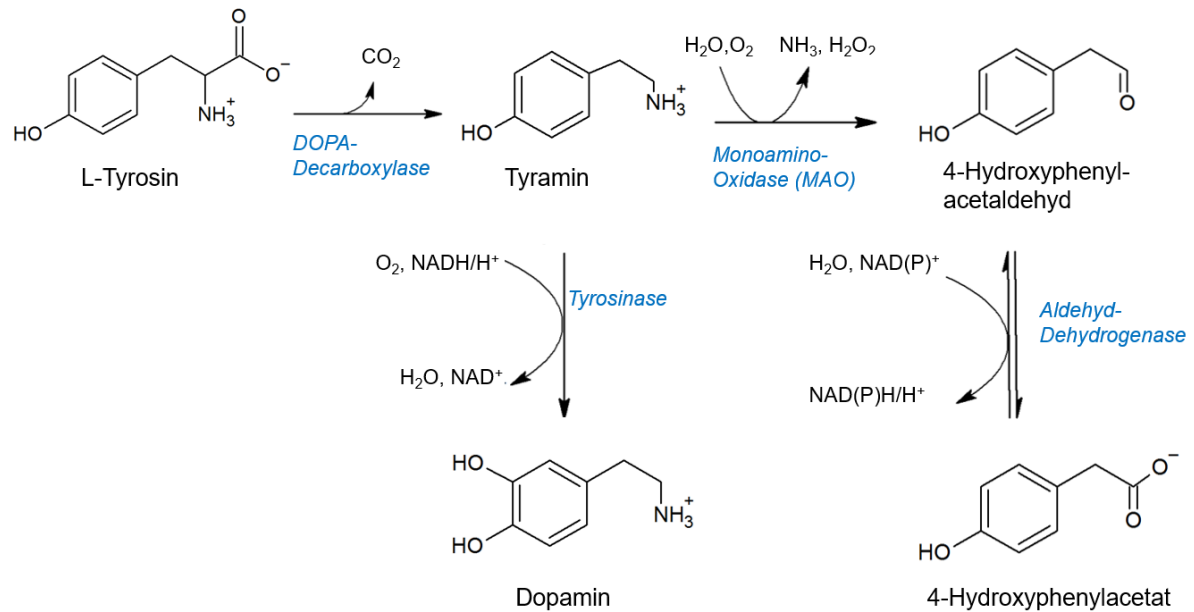


Abbildung 3: alternativer Abbauweg von L-Tyrosin [22]

Tyramin wirkt als indirektes Sympathomimetikum und führt zu einem Anstieg der Herzfrequenz und einer Erhöhung des Blutdrucks. Diese Symptomatik tritt jedoch aufgrund der schnellen Verstoffwechslung von Tyramin zu 4-Hydroxyphenylacetaldehyd mittels MAO (Monoaminoxidase) nicht ein. In Kombination mit pharmakologischen, unselektiven MAO-Hemmern kann der Tyramin-Abbau gehemmt werden. Es kommt zu einer erhöhten Freisetzung von Noradrenalin. Diese Querkombination aus erhöhter Tyramin-Aufnahme und pharmakologischer Hemmung der MAO wird auch als *Cheese-Effekt* bezeichnet und in der Therapie von Depressionen angewandt [22].

2.1.2 Neurotransmitter des L-Tyrosins

L-Tyrosin dient nicht nur als Ausgangspunkt für das biogene Amin-Tyramin, sondern auch als Präkursor für Katecholamine. Bei Katecholaminen handelt es sich um eine wichtige Gruppe von Neurotransmittern. Sie dienen als Überträger von Nervenimpulsen im Zentralnervensystem und vegetativen Nervensystem. Zu den biologisch bedeutsamen Katecholaminen zählen Dopamin und seine Derivate. Bekannte Vertreter sind Adrenalin und Noradrenalin (Abbildung 4) [23].

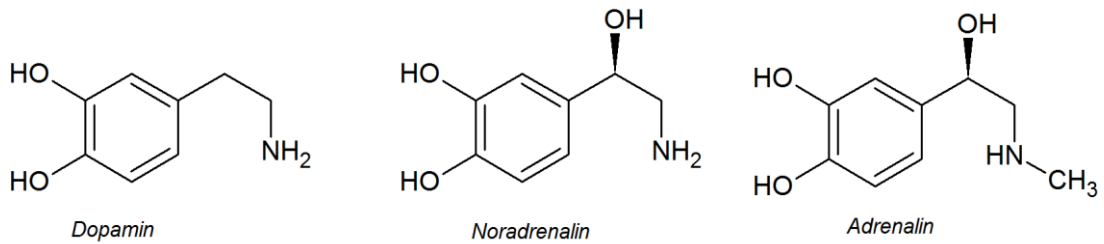


Abbildung 4: bekannte Katecholamine [23]

Im menschlichen Körper werden Katecholamine im Nebennierenmark und im Zentralnervensystem aus L-Phenylalanin und L-Tyrosin gebildet. Als Zwischenprodukt entsteht das 3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin (L-DOPA). Als Kofaktor dient das Tetrahydrobiopterin (THB). Das Dihydrobiopterin (DHB) stellt die oxidierte Form des Kofaktors dar. Mithilfe der DOPA-Decarboxylase wird Dopamin gebildet. Dopamin wird im Volksmund als Glückshormon bezeichnet. Die tatsächliche psychotrope Wirkung ist die Antriebsteigerung bzw. Steigerung und Erhöhung der Motivation. Dopamin kann mithilfe einer Hydroxylase zu (R)-Noradrenalin umgewandelt werden. Katalysiert wird diese Reaktion durch Ascorbinsäure (Asc.) Über eine Transferase wird das Noradrenalin weiter zu Adrenalin umgewandelt werden. Als Methyl donor dient hierbei das S-Adenoilmethion (SAM) (Abbildung 5) [23, 24].

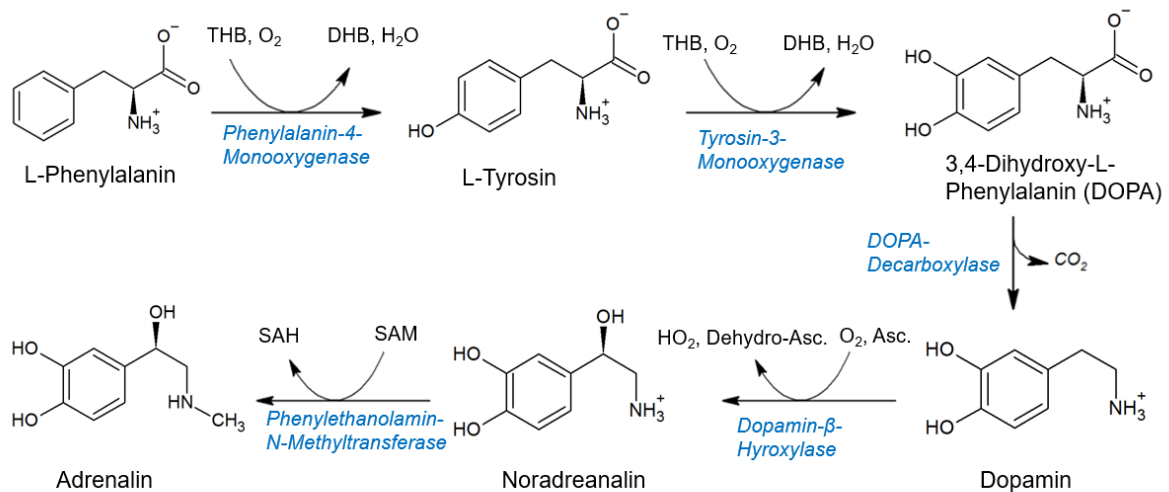


Abbildung 5: Bildung der Katecholamine aus aromatischen Aminosäuren [23]

Es gibt Hinweise, dass die Ernährung im Zusammenhang mit Depressionen und anderen psychischen Störungen steht [25]. Bestimmte Ernährungsgewohnheiten (z. B. eine mediterrane Ernährung) scheinen das Risiko von psychischen Störungen zu verringern, während andere (z. B. die westliche Ernährung) das Risiko erhöhen. Während allgemein anerkannt ist, dass eine hohe Aufnahme von Obst, Gemüse, Vollkornprodukten und ungesättigten Fetten schützend ist, und eine hohe Aufnahme von verarbeiteten Lebensmitteln (fettreich, zuckerreich) die psychische Gesundheit beeinträchtigt, sind die zugrundeliegenden biologischen Mechanismen nicht endgültig geklärt. Ein weiterer Zusammenhang wird zwischen dem Verzehr von verarbeiteten Lebensmitteln (stark wärmebehandelt) und Depressionen und der psychischen Gesundheit durch die Produktion von Neurotransmitter-ähnlichen Produkten aus der Fermentation von Maillard-modifizierten Proteinen durch das Mikrobiom vermutet. [26]. Manche Bakterien aus der menschlichen Darmflora haben die Fähigkeit, neuroaktive Substanzen, wie zum Beispiel Neurotransmitter, aus dem Katabolismus von Aminosäuren zu synthetisieren. Zu diesen Verbindungen zählen die γ -Aminobuttersäure, Noradrenalin, Histamin und Serotonin [27].

2.1.3 Synthese und Metabolisierung der Alpha-Linolensäure

Alpha-Linolensäure (IUPAC: (9Z, 12Z, 15Z)-Octadeca-9,12,15-triensäure), kurz ALA, ist eine Omega-3-Fettsäure. Eine Omega-3-Fettsäure ist dadurch charakterisiert, dass die letzte Doppelbindung bei der drittletzten C-C-Bindung (vom Carboxy-Ende aus gezählt) vorliegt (Abbildung 6) [28].

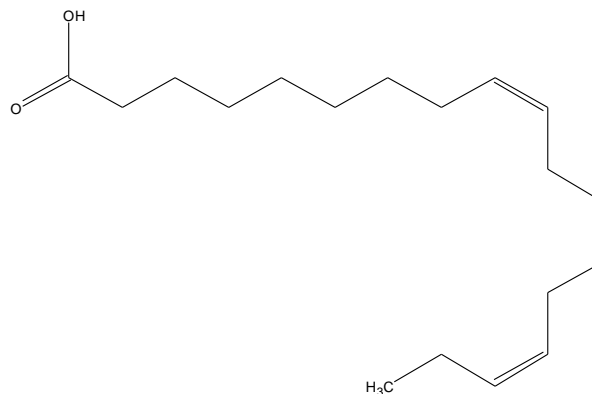


Abbildung 6: Strukturformel der ALA

Um biochemisch Doppelbindungen in Fettsäuren einführen zu können, werden bestimmte Enzymkomplexe benötigt, sogenannte Desaturasen. Die Desaturasen von Säugetieren zeichnen sich dadurch aus, dass sie nur zwischen der Carboxylgruppe und dem C-Atom 9 eine Doppelbindung einführen können. Bei der ALA handelt es sich somit um eine essenzielle Fettsäure und muss über die Nahrung aufgenommen werden [29].

Um die ALA resorbieren zu können, muss sie in Form von freien Fettsäuren oder Monoglyceriden vorliegen. Die enzymatische Spaltung beginnt bereits im Mund durch linguale Lipasen und wird im Magensaft fortgesetzt. Die Lipide sorgen im Dünndarm für die Freisetzung vom Peptidhormon Cholecystokinin, wodurch die Gallensäure-Produktion in der Gallenblase stimuliert wird und die Lipide emulgiert werden. Cholecystokinin sorgt ebenfalls für die Freisetzung von Lipasen in der Bauchspeicheldrüse und im Zwölffingerdarm, wodurch die emulgierten Triglyceride weiter zu Monoglyceriden und freien Fettsäuren hydrolysiert werden. Die Resorption im Darmlumen erfolgt sowohl aktiv als auch passiv über die Bürstensaummembran. Es kommt zu einer Reveresterung, bei der die freien Fettsäuren wieder mit den Monoglyceriden unter Wasserabspaltung zu Triglyceriden verestert werden. Die Lipoproteinpartikel, Chylomikronen, transportieren die Fette über das Lymphsystem in den Blutkreislauf [30, 31]. Tritt ALA in den Blutkreislauf ein, ist der mögliche metabolische Verbleib vielfältig (siehe Abbildung 7) [32].

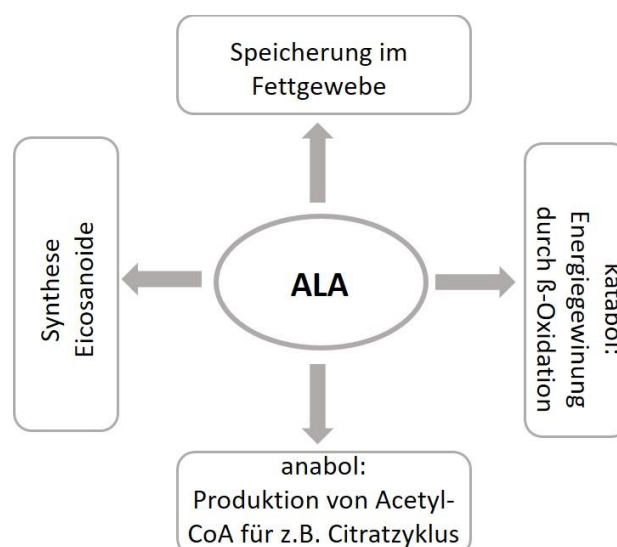


Abbildung 7: metabolischer Verbleib der ALA [32]

ALA dient insbesondere als Präkursor für die Synthese von Eicosanoiden. Dabei handelt es sich um Gewebshormone, die eine Vielzahl biologischer Wirkmechanismen begleiten, wie zum Beispiel Blutgerinnung, Blutdruck, Herzfrequenz sowie wichtige Funktionen im Immunsystem. Eicosanoide werden durch Oxidationsreaktionen (Epoxidation oder Hydroxylierung), Umlagerungsreaktionen und Elongation gebildet. Ihr Grundgerüst besteht aus 20 Kohlenstoffatomen. Die Oxidation wird durch unterschiedliche Enzyme vermittelt und führt entsprechend zu verschiedenen Stoffgruppen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Stoffgruppen nach Eicosanoid-Oxidation [33]

Enzyme	Stoffgruppen
Lipoxygenasen (LOX)	Leukotriene
Cyclooxygenasen (COX)	Prostaglandine, Thromboxane
Cytochrom P450 (CYP)	20-Hydroxyeicosatetraensäure

In Relation zu den anderen C18-Fettsäuren (Ölsäure oder Linolsäure) weist ALA eine höhere Affinität zu den Enzymen LOX und COX auf. Linolsäure dient als Ausgangssubstanz für die Bildung der Omega-6-Fettsäure Arachidonsäure. Durch die höhere Affinität der ALA zu den Enzymen wird die Bildung der Arachidonsäure gehemmt. Arachidonsäure verstärkt die inflammatorische Wirkung durch die Bildung spezifischer Eicosanoide [33].

2.2 Lebensmittelverarbeitungsprozesse

Lebensmittel werden üblicherweise mit Nährstoffen wie Proteinen, Fetten, Kohlenhydraten und Inhaltsstoffen wie Vitaminen, Mineralstoffen, Ballaststoffen und Wasser assoziiert. All diese Komponenten bilden eine komplexe Matrix, deren Verarbeitung zahlreiche Veränderungen zur Folge hat [34]. Zur Lebensmittelverarbeitung zählen einfache Prozesse wie zum Beispiel Waschen, Schneiden, Mahlen, aber auch das Aussetzen hoher Temperaturen (Kochen, Backen, Frittieren) sowie die Beimischung von Prozesschemikalien und Mikroorganismen [35]. Die Verarbeitung von Lebensmitteln hat physikalische sowie chemische Veränderungen zur Folge. Art und Ausmaß der Veränderung sind abhängig von der Zusammensetzung der Lebensmittelmatrix und den Prozessbedingungen wie

Temperatur, pH-Wert und Anwesenheit von Sauerstoff. Zum einen kann dadurch die Verdaulichkeit erhöht werden, zum anderen kann jedoch auch die biologische Wertigkeit vermindert werden. Ebenfalls ist die Entstehung toxischer Abbauprodukte nicht auszuschließen [36, 37]. Als besonders prominentes Beispiel ist hier das kanzerogene Acrylamid zu nennen. Dieses Abbauprodukt entsteht bei hohen Temperaturen von über 120°C aus Kartoffel- und Getreideprodukten [38].

2.2.1 L-Tyrosin als Lebensmittelinhaltsstoff

Im Reinzustand ist L-Tyrosin ein farbloser, nadelförmiger Feststoff, der sich schwer in Wasser (0,38 g/L bei 20 °C) lösen lässt. In organischen Lösungsmitteln ist es ebenfalls nahezu unlöslich. Wie alle Aminosäuren ist L-Tyrosin ein Zwitter-Ion und liegt abhängig vom pH-Wert unterschiedlich geladen vor. Die Löslichkeit wird durch diese Ladungsverteilung bestimmt. Am isoelektrischen Punkt weist L-Tyrosin die geringste Löslichkeit auf (Tabelle 2).

Tabelle 2: pKs-Werte von L-Tyrosin [39]

Isoelektrischer Punkt	5,7
α -COOH pK _s	2,2
α -NH ₃ pK _s	9,1
Seitenkette pK _s	10,1

Die Löslichkeit kann durch die Verschiebung des pH-Wertes in den sauren oder basischen Bereich deutlich erhöht werden [39]. L-Tyrosin ist in zahlreichen Lebensmitteln enthalten und kommt in besonders hohen Mengen in Käse, Rind und Schweinefleisch, Lachs, Eiern und Sojabohnen vor [40]. Wichtig ist jedoch nicht nur der Anteil eines Inhaltstoffes in einem Lebensmittel, sondern auch die Stabilität während und nach der Verarbeitung. Beim Kochen und Backen von Rindfleisch werden deutliche Verluste an Aminosäuren festgestellt [41]. Des Weiteren wird ein thermischer Abbau von Aminosäuren unter dem Einfluss hoher Temperaturen beobachtet. Dabei kommt es üblicherweise zu einer Decarboxylierung, bei der ein Kohlenstoffdioxid-Molekül abgespalten wird [42]. Bei Einfluss hoher Temperaturen kommt es zwischen Aminverbindungen (Aminosäuren) und reduzierenden Verbindungen (reduzierende Zucker) zu Maillard-Reaktion. Diese nicht-enzymatische

Bräunung tritt bei der Erhitzung von kohlenhydrat- und proteinhaltigen Lebensmitteln auf. Dabei kommt es zur Bildung zahlreicher Abbauprodukte wie zum Beispiel das Acrylamid und Aromastoffen [43].

2.2.2 ALA als Lebensmittelinhaltsstoff

Chemisch, als Ester gebunden, findet sich ALA in vielen Triglyceriden. Besonders reich ist sie in pflanzlichen Ölen wie Leinöl (55 %) und Perillaöl (60 %) enthalten [44]. Den Omega-3-Fettsäuren werden besonders gute Eigenschaften zugesprochen, da sie im Zusammenhang stehen, das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen zu senken [45]. Im menschlichen Körper wird ein geringer Teil der ALA zu zwei weiteren Omega-3-Fettsäuren umgewandelt, der Docosahexaensäure (DHA) und der Eicosapentaensäure (EPA). Um den Tagesbedarf an Omega-3-Fettsäuren zu decken, empfiehlt die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) eine tägliche Aufnahme von 250 mg EPA und/oder DHA [46].

Die konjugierten Doppelbindungen machen die Fettsäure sehr oxidationsempfindlich an der Luft. Besonders die Autoxidation spielt hier eine Rolle, bei der es zur Entstehung diverser Hydroxy-, Oxo- und Cyclo-Verbindungen kommt. Man spricht von Autoxidation, da diese Reaktion in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff ohne Zutun anderer Substanzen abläuft. Der Mechanismus beginnt mittels Sauerstoff und einem Initiatorradikal unter Bildung eines Peroxyradikals. Das Peroxyradikal abstrahiert anschließend ein Wasserstoffatom aus der Alkylkette. Dabei entstehen ein Hydroperoxid und ein Alkylradikal. Das Alkylradikal reagiert wieder mit Sauerstoff zu einem Peroxyradikal. In dieser Kettenfortpflanzungs-Reaktion werden Hydroperoxide gebildet. Das Hydroperoxid kann zu einem Alkoxyradikal und Hydroxylradikal zerfallen. Diese Radikale können Wasserstoffatome von der Alkylkette abziehen und Wasser bzw. Alkohol und Alkylradikale bilden. Mittels Sauerstoff wiederholt sich die radikalische Reaktion. In der Lebensmittelproduktion wird dieser Prozess als Ranzigwerden von Fetten bezeichnet [37, 47].

Ungesättigte Fettsäuren sind nicht nur empfindlich gegenüber Luftsauerstoff, sondern auch temperatursensitiv. Bei EPA und DHA kommt es zur Bildung von nicht-flüchtigen Abbauprodukten wie Polymeren und cyclischen Fettsäuremonomeren [48]. Durch die

Oxidation kommt es bei der ALA vorwiegend zur Bildung flüchtiger und nicht-flüchtiger Aldehyde, wie zum Beispiel Acetaldehyddiethylacetal [49].

2.2.3 Aspartam als Lebensmittelzusatzstoff

Aspartam (L-Aspartyl-L-phenylalaninmethylester) ist eine farblose, kristalline Substanz, die einen süßen und aromaverstärkenden Geschmack aufweist. Es leitet sich aus den Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Asparaginsäure ab und ist zu einem Dipeptid verknüpft (siehe Abbildung 8).

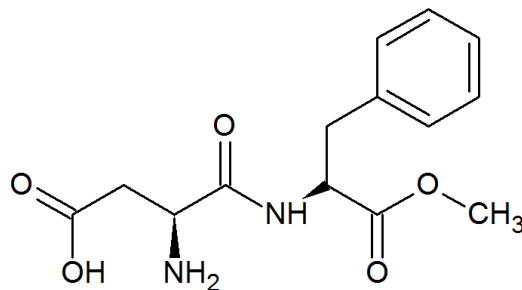


Abbildung 8: Strukturformel Aspartam

Im Jahr 1965 wurde das Aspartam durch den Wissenschaftler James Schlatter zufällig entdeckt, als er an der Synthese des Peptidhormons Gastrin arbeitete und dabei den starken süßen Geschmack feststellte [13]. Die Stabilität von Aspartam in Lösungen hängt von der Zeit, der Temperatur und dem pH-Wert ab. Die optimale Stabilität wird im schwach-sauren pH-Bereich zwischen pH 2,5 und 5,5 erreicht. Ab Temperaturen von 150 °C findet ein rascher Zerfall des Aspartams statt [14].

2.2.3.1 Verwendung und Herstellung

Aufgrund der Eigenschaft des Aspartams, süß zu schmecken, wird Aspartam – auch E 591 genannt – als Süßstoff und somit als Lebensmittelzusatzstoff eingesetzt. Anwendung findet der Süßstoff besonders in brennwertverminderten Light-Produkten und diätischen Lebensmitteln. Durch seine hohe Süßkraft, ca. 180- bis 200-mal höher als die von Glucose, reichen kleine Mengen als Zusatz aus. Der Kaloriengehalt von 4 kcal/g kann in mit Aspartam gesüßten Lebensmitteln folglich vernachlässigt werden.

Aspartam ist in 600 Produkten und über 90 Ländern als Süßstoff zugelassen. Besonders häufig ist er in kalorienfreien Getränken wie Cola Light oder zuckerfreien Kaugummis zu finden. Des Weiteren wird er in Arzneimitteln oder Zahnhygiene-Produkten für die Maskierung von Bitterstoffen eingesetzt. Darüber hinaus findet er unter dem Namen Equal® als Tafelsüße Anwendung [13, 14].

Für die Herstellung von Aspartam sind chemische und enzymatische Verfahren beschrieben. Ausgangsstoff für die chemische Synthese ist (S)-Asparaginsäure. Durch die Reaktion mit Phosphorylchlorid wird dieses in ein cyclisches Carbonsäureanhydrid umgewandelt. Die Umsetzung mit (S)-Phenylalaninmethylester liefert anschließend Aspartam (siehe Abbildung 9) [50, 51].

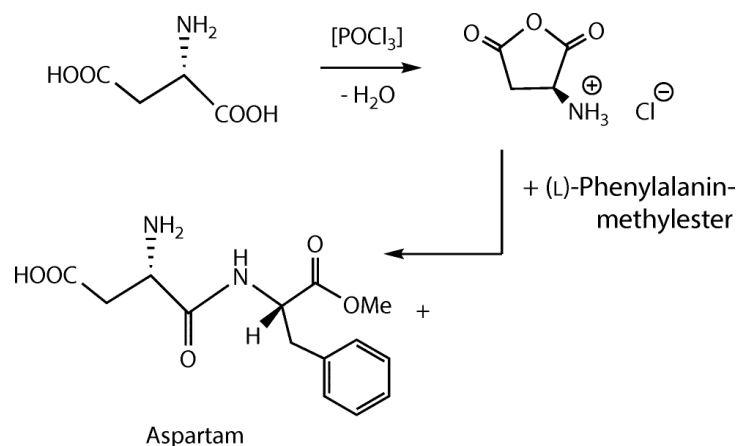


Abbildung 9: chemische Synthese des Aspartams [50, 51]

Aspartam liegt in zwei Varianten vor – der Alpha- und Beta-Form. Nur die Alpha-Form weist einen süßen Geschmack auf. Wird die Kopplung der Aminosäuren L-Phenylalanin-Methylester und L-Asparaginsäure chemisch hergestellt, entsteht sowohl die süße Alpha-Form als auch die nicht süße Beta-Form. Durch enzymatische Verfahren können die Beiden getrennt werden [52].

2.2.3.2 Metabolisierung und Phenylketonurie

Um Aspartam resorbieren zu können, wird es im intestinalen Lumen mittels Peptidasen zum Dipeptid L-Aspartylphenylalanin sowie Methanol hydrolysiert. Das Dipeptid wird anschließend durch eine Peptidase in die einzelnen proteinogenen Aminosäuren,

Asparaginsäure und Phenylalanin, umgesetzt. Das Methanol wird zu Kohlenstoffdioxid und Formaldehyd abgebaut. Diese Einzelkomponenten werden anschließend von sogenannten Mukosazellen aufgenommen und ins Blut weitergegeben [53].

Aspartam darf von Menschen mit der Stoffwechselerkrankung Phenylketonurie nicht aufgenommen werden. Bei der Phenylketonurie handelt es sich um eine angeborene Stoffwechselerkrankung, bei der es infolge eines Enzymdefekts zu einer herabgesetzten Umwandlung von L-Phenylalanin zu L-Tyrosin kommt. Infolgedessen sammelt sich Phenylalanin im Körper an und wird zu einem Teil zu Phenylbenztraubensäure umgewandelt. Mögliche Folgen sind Hirnschädigungen, eine verlangsamte geistige Entwicklung und ein verkümmertes Wachstum. In Deutschland werden Säuglinge nach der Geburt auf das Enzym Phenylalanin-Hydroxylase untersucht, sodass die Erkrankung sehr früh festgestellt werden kann. In der EU müssen Aspartam-haltige Produkte mit dem Hinweis „enthält eine Phenylalaninquelle“ oder „mit Phenylalanin“ gekennzeichnet sein [54].

2.2.3.3 Vorbehalte gegenüber Aspartam als Süßstoff

Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 ist Aspartam in Deutschland in bestimmten Höchstmengen zugelassen. In der EU ist die erlaubte Tagesdosis auf 40 mg/kg Körpergewicht beschränkt, wobei die durchschnittliche Verbraucherexposition mit 0,1 bis 1,9 mg/kg weit unter diesem Wert liegt [55].

Im Jahr 2014 wurden weltweit rund 18.670 Tonnen des Süßstoffes verbraucht [56]. Viele Studien befassen sich mit den möglichen negativen Aspekten, die mit dem Konsum von Aspartam in Zusammenhang gebracht werden. Studien im Jahr 1993 und 2014 untersuchten den Zusammenhang zwischen Aspartam-Konsum und Befindlichkeitsstörungen, insbesondere depressiven Verstimmungen. Ab einer Aspartam-Aufnahme von 25 mg/kg Körpergewicht konnte eine Verschlechterung der Stimmung beobachtet werden. Signifikante Ergebnisse konnten jedoch nicht erzielt werden, weswegen in diesem Bereich weiterer Forschungsbedarf besteht [57].

In weiteren Studien wurde der Zusammenhang von Aspartam-Konsum und Kopfschmerzen, insbesondere Migräne, untersucht. Auch dahingehend konnte keine eindeutige Korrelation nachgewiesen werden [58].

Weitere Untersuchungen wurden bezüglich der mutagenen und kanzerogenen Wirkung von Aspartam durchgeführt. Aufgrund der nicht eindeutigen Datenbestände kam die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) zu dem Entschluss, dass kein belegbarer Zusammenhang zwischen dem Konsum von Aspartam und einem erhöhten Krebs-Risiko besteht [59, 60].

Ein weiterer diskutierter Aspekt ist die Entstehung von Methanol während des Abbaus von Aspartam. Methanol gilt ab Dosen von 0,1 g/kg Körpergewicht als gefährlich und ist somit toxikologisch gesehen nicht unbedeutend. Pro Liter eines mit Aspartam zugesetzten Getränkes werden 55 mg Methanol im menschlichen Körper gebildet. Bei der Diskussion muss aber ebenfalls betrachtet werden, dass Methanol auch natürlich in Lebensmitteln vorkommt. Beispielsweise enthalten Fruchtsäfte circa 680 mg/L. Somit besteht keine gesundheitliche Gefahr durch das Metabolisierungsprodukt Methanol [14].

2.3 Radioaktiv-Analytik

Radioaktive Nachweismethoden sind heutzutage aus der Analytik und den Biowissenschaften nicht mehr wegzudenken. Sie überzeugen insbesondere durch ihre hohe Spezifität. Der direkte Nachweis der Strahlung liefert zuverlässige Ergebnisse. Oftmals wird das radioaktive Kohlenstoff-Nuklid ^{14}C eingesetzt, um Ausgangsstoffe gezielt zu markieren, und somit deren Verbleib verfolgen zu können [61, 62].

Kohlenstoff kommt mit mehreren Isotopen in der Natur vor. Bei den Isotopen ^{12}C und ^{13}C handelt es sich um stabile Isotope. Hingegen weist das radioaktive Isotop ^{14}C eine Instabilität auf. Natürliches ^{14}C kommt mit einer Häufigkeit von 1 zu 10^{12} nur in sehr geringen Mengen vor und hat somit auf die Radioaktivanalytik im Grunde keinen Einfluss. Abbauprodukte und metabolische Prozesse können mithilfe von synthetisierten ^{14}C -Verbindungen verfolgt werden. Das ^{14}C -Isotop zerfällt durch β -Zerfall in ^{14}N -Stickstoff, einem Antineutrino und einem Elektron. Die abgegebene Strahlung kann genutzt werden, um Abbauprodukte in chromatographischen Trennprozessen aufzuspüren oder die Wiederfindungsrate in Extraktionsprozessen zu verfolgen. Die Halbwertszeit des ^{14}C -Isotops beträgt 5.730 Jahre, wodurch keine

signifikanten Änderungen der Aktivitätsmengen auftreten [63]. Die ionisierende Strahlung eines β -Strahlers weist eine niedrige spezifische Aktivität auf und lässt sich gut abschirmen, wodurch ein relativ sicherer Umgang mit der Radioaktivität gewährleistet werden kann. Die spezifische Aktivität beschreibt die Aktivität pro Stoffmasse eines Radionuklids [64]. Für die Gewinnung eines ^{14}C -Isotops wird eine Stickstoffverbindung, z. B. Calciumnitrat oder Aluminiumnitrit, bestrahlt. Das hierdurch gewonnene radioaktive ^{14}C -Isotop kann für die Synthese von Substanzen genutzt werden [65].

2.3.1 Aktivitätsbestimmung

Der Einsatz von radioaktiven Substanzen bietet den Vorteil, bei jedem Prozessschritt die Aktivität bestimmen zu können. Je nach Probenart kommen unterschiedliche Techniken zum Einsatz.

Einen besonderen Stellenwert nimmt dabei die Flüssigszintillationszählung (LSC, engl. liquid scintillation counting) ein, mit der flüssige Proben vermessen werden können. Die niederenergetische Betastrahlung wird in messbare Lichtimpulse umgewandelt. Für die LSC-Messung wird die Probe in ein entsprechendes Vial gegeben und mit einem Zusatz (Cocktail) versetzt. Beim LSC-Cocktail handelt es sich um ein Gemisch aus Lösungsmitteln und einem oder mehreren Szintillationen. Die Lösungsmittel ermöglichen eine Mischung der Probe mit dem Cocktail ohne Phasentrennung und Trübung und dienen als Überträger der Strahlung. Eingesetzt werden vor allem aromatische Lösungsmittel wie Xylol, Benzol oder Toluol. Die Betastrahlung führt zur Anregung des konjugierten π -Systems der Aromaten, wodurch die Energie auf den Szintillator übertragen wird. Die Szintillatoren werden in einen angeregten Zustand versetzt und emittieren Lichtimpulse bei der Rückkehr in den Grundzustand [66]. Um die Lichtimpulse zu detektieren, werden Photomultiplier-Röhren (PMT, engl. photo multiplier tube) eingesetzt (siehe Abbildung 10) [67].

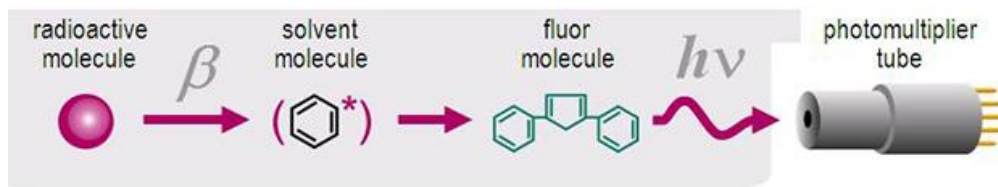


Abbildung 10: schematische Übersicht über den Szintillationsprozess [68]

Für die Messungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde als LSC-System der Hidex 600 SL verwendet. Die Messung der Proben erfolgt in einer Blei-Kammer, in der drei Photomultiplier im Dreieck um das LSC-Gefäß angeordnet sind. Durch diese Anordnung der Detektoren können zufällige Lichtimpulse (z. B. Hintergrundstrahlung) herausgefiltert werden. Weiteres kann über das Verhältnis der Lichtimpulse, die mehrfach gemessen werden, einen Korrekturfaktor, den TDCR-Faktor (engl. triple-double coincidence ratio), bestimmt werden. Dieser beschreibt die Abschwächung der Lichtimpulse in der Probe durch zum Beispiel Farbstoffe [69]. Durch Einbeziehen des TDCR-Faktors und der gezählten Lichtimpulse (CPM, engl. counts per minute) können die Zerfälle pro Minute (DPM, engl. disintegrations per minute) berechnet werden. Wird dieser Wert auf Sekunden umgerechnet, entspricht er der SI-Einheit Becquerel (1 Bq = 1 Zerfall/Sekunde) [70].

Die Radioaktivität kann nicht nur in flüssigen Proben, sondern auch in Feststoffproben gemessen werden. Zur Anwendung kommt hier ein sogenannter Oxidizer, mit dem Probenaliquots vollständig verbrannt werden. Die Probe wird unter O_2 -Zufuhr vollständig zu CO_2 verbrannt und bildet bei Anwesenheit von ^{14}C -Substanzen auch $^{14}CO_2$ -Moleküle. Anschließend werden die Gase in eine Aminlösung (z. B. 3-Methoxypropylamin) geleitet und mittels des Prozesses der Aminwäsche zu Carbamidsäuren umgesetzt und aufgefangen. In Abbildung 11 ist der schematische Aufbau eines Oxidizers aufgeführt.

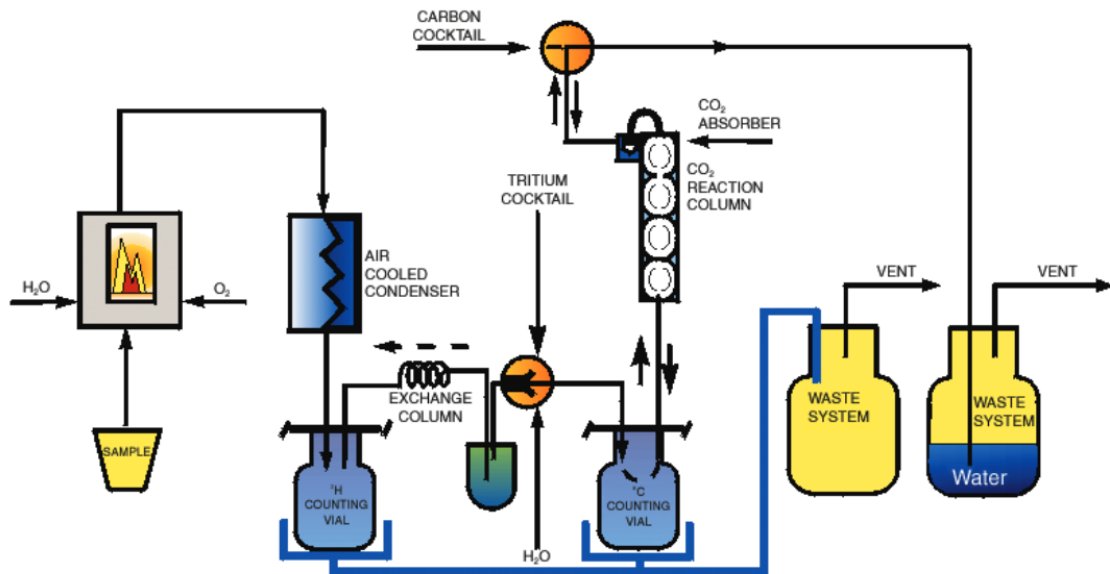


Abbildung 11: Aufbau eines Oxidizers [71]

Die entstandene Lösung kann mit einem LSC-Cocktail versetzt und mittels LSC vermessen werden. Der Oxidizer bietet gegenüber der Flüssigszintillation den Vorteil, feste Proben ohne vorherige Extraktion vermessen zu können [71].

2.3.2 Radio-Flüssigchromatographie und HRMS

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgt die Detektion möglicher Abbauprodukte und Metabolite durch Kopplung mit einer UHPLC (ultra high performance liquid chromatography), einem zwischengeschalteten Radiodetektor und einem hochauflösenden Massenspektrometer (HRMS). Eine Übersicht ist in Abbildung 12 dargestellt.

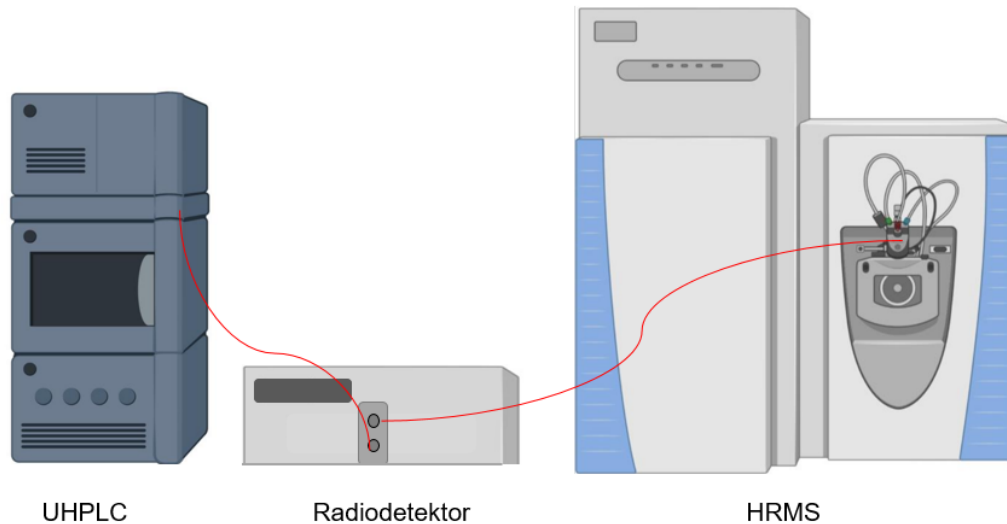


Abbildung 12: Kopplung UHPLC, Radiodetektor und HRMS

Die UHPLC ist ein flüssigchromatographisches System und eine Optimierung der HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Dieses System bietet kurze Analysezeiten, hohe Effizienz und einen höheren Probendurchsatz mit kleineren Probenvolumina. Die Optimierung resultiert aus dem Säulenmaterial mit Partikeldurchmessern kleiner als $2\ \mu\text{m}$. Durch diese kleinen Partikel entsteht ein starker Gegendruck von bis zu 1.200 bar, weshalb die technischen und physikalischen Anforderungen an die Anlage und deren Bauteile sehr hoch sind [72, 73].

Der Radiodetektor fungiert in diesem System als Durchflussdetektor. Das Messprinzip gleicht der davor beschriebenen Methode der Flüssigszintillationszählung. Die β -Strahlung bringt die Szintillatoren in einen angeregten Zustand und Lichtimpulse werden bei der Rückkehr in den Grundzustand emittiert. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass es sich bei dem System im Radiodetektor um einen Feststoffsintillator handelt [74]. Üblicherweise werden anorganische Feststoffsintillatoren eingesetzt, die aus einem spezifisch geformten Teflonschlauch mit Kristallbeschichtung bestehen. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Feststoffsintillator handelt es sich um Yttriumglas (YG). Das Zellvolumen dieser Szintillationszelle liegt bei 0,075 mL [75].

Der Radiodetektor spielt eine zentrale Rolle bei der Identifizierung potenzieller Abbauprodukte und Metaboliten, da diese auch in komplexen Extrakten mit hoher

Selektivität detektiert werden können. Es wird ein Radiochromatogramm erzeugt, mit dem die Retentionszeiten der Radiopeaks mit den Daten des Massenspektrometers verglichen werden können. Es wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Systeme hochauflösender Massenspektrometer verwendet. Im Folgenden soll im Detail auf die Funktionsweise dieser Messinstrumente eingegangen werden.

2.3.2.1 Hochauflösendes Massenspektrometer – Q Exactive™ Plus

Der Großteil der massenspektrometrischen Analysen dieser Arbeit wurde an der Q Exactive™ Plus von der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Die Q Exactive™ Plus zählt zu den Hybridgeräten und stellt eine Vereinigung von einem Quadrupol und einer Orbitrap dar (siehe Abbildung 13). Sie bietet eine Auflösung von bis zu 280.000, wodurch auch kleinste Massendifferenzen mit einer Genauigkeit von unter 5 ppm detektiert werden können [76]. In Abbildung 13 ist der Aufbau der Orbitrap bzw. der Q Exactive™ Plus abgebildet.

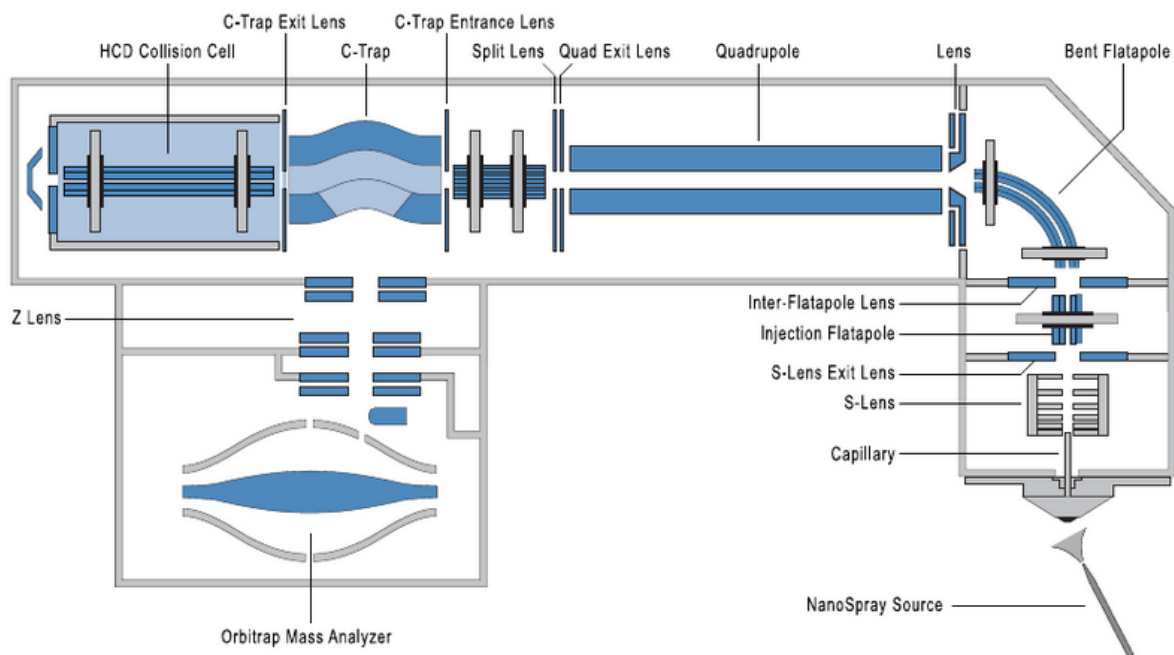


Abbildung 13: Aufbau Q Exactive™ Plus (Thermo Fisher Scientific) [77]

Den Startpunkt bildet der Probeneinlass, wo die chromatographisch aufgetrennten Proben in die Ionenquelle gelangen. Für die Ionisation kommen, je nach analytischer Fragestellung, unterschiedliche Verfahren zum Einsatz. Besonders verbreitet ist die

ESI (Elektronensprayionisation), da sie sich durch eine breite Anwendungsmöglichkeit und Robustheit auszeichnet [78, 79]. Die Probe wird durch eine Sprühkapillare (Innendurchmesser ca. 75 μm) geleitet, an deren Ende eine Spannung von etwa 3-4 kV angelegt ist. Es kommt zur Bildung eines elektrischen Feldes zwischen der Sprühkapillare und der Gegenelektrode. An der Spitze der Sprühkapillare kommt es zu einem Überschuss gleichartig geladener Ionen, die sich gegenseitig abstoßen und den sogenannten Taylor-Kegel bilden. Es bildet sich ein Strahl an der höchsten Ladungsdichte, der anschließend in viele kleine Tröpfchen zerfällt. Anschließend verdampft das Lösemittel der Tröpfchen und führt zu einer erhöhten Dichte des elektrischen Feldes an der Tropfen-Oberfläche. Das Resultat ist die sogenannte Coulomb-Explosion, bei der die Tropfen aufgrund der Abstoßung gleichartiger Ladung in viele kleinere Tropfen zerfallen [80, 81]. Ein Teil dieser Tröpfchen wandert über einen Skimmer in ein Hochvakuumbereich. Die Ionen werden über eine sogenannte S-lens (stacked-ring ion guide; mehrere hintereinander geschaltete Ringelektroden) fokussiert und wandern über eine um 90° gebogene Ionenleitung (engl. bent flatapole) weiter. In dieser werden neutrale Gase und Lösungsmittelteilchen ausgesondert [82]. Anschließend wandern die Ionen weiter zum Quadrupol, in dem Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses fokussiert werden [83]. Von dort können die Ionen in eine gebogene Quadrupol-Falle (C-Trap) geleitet werden. In der C-Trap können die Ionen akkumuliert, gespeichert und thermalisiert werden. Die C-Trap dient somit als Entkoppelung der Orbitrap von allen vorhergehenden Schritten der Ionenerzeugung, Desolvatation und Selektion der Vorläufer-Ionen. Durch Hochspannungsimpulse werden Ionen anschließend in die Orbitrap befördert [84-87]. Die Orbitrap ist ein Ionenfallen-Massenspektrometer und bildet das Kernstück der Q Exactive™ Plus. Sie besteht aus einer spindelförmigen Elektrode, um die sich die Ionen aufgrund der elektrostatischen Anziehung auf Kreisbahnen (Orbits) bewegen. Gleichzeitig schwingen die Ionen entlang der Achse der Elektrode. Die Frequenz dieser Schwingung erzeugt in den Detektorplatten Signale, die durch Fourier-Transformation mathematisch zu einem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) umgewandelt werden (siehe Abbildung 14) [87, 88].

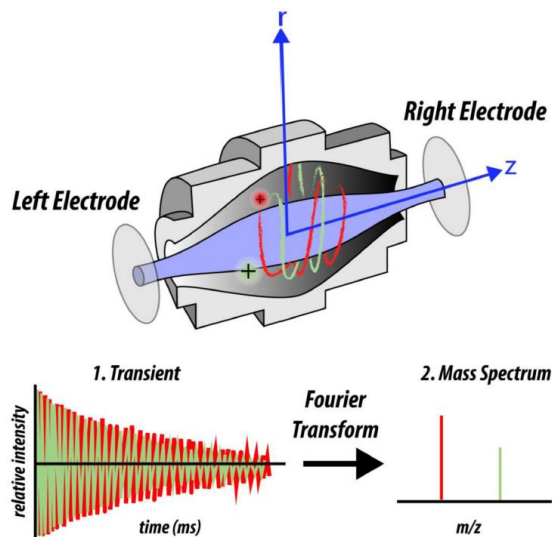


Abbildung 14: Übersicht einer Orbitrap und Umwandlung der erzeugten Frequenz in ein Massenspektrum mittels Fourier-Transformation [88]

Von der C-Trap können die Ionen auch in eine HCD-Kollisionszelle (engl. higher-energy collisional dissociation) weitergeleitet werden. In dieser können die Ionen fragmentiert werden. Im Gegensatz zu einem konventionellen Massenspektrometer, in dem Ionisierung und Massenanalyse kontinuierlich erfolgt, arbeitet die Ionenfalle bzw. die Orbitrap diskontinuierlich. Die Q Exactive™ Plus bietet die Möglichkeit zur Tandem-Massenspektrometrie, bei der massenselektierte Ionen einer zweiten massenspektrometrischen Analyse unterzogen werden [89].

2.3.2.2 Hochauflösendes Massenspektrometer – Vion-IMS-QToF

Für die Untersuchungen der Aspartam-Proben wurde zusätzlich ein Vion-IMS-QToF der Firma Waters® verwendet. Das Vion-IMS-QToF zählt ebenfalls zu den Hybridgeräten, bei denen zwei verschiedene Massenanalytoren miteinander kombiniert werden. Für die Identifizierung kann zusätzlich die Ionenmobilität (IMS) unterstützen [90]. In Abbildung 15 ist der Aufbau des Vion-IMS-QToF dargestellt.

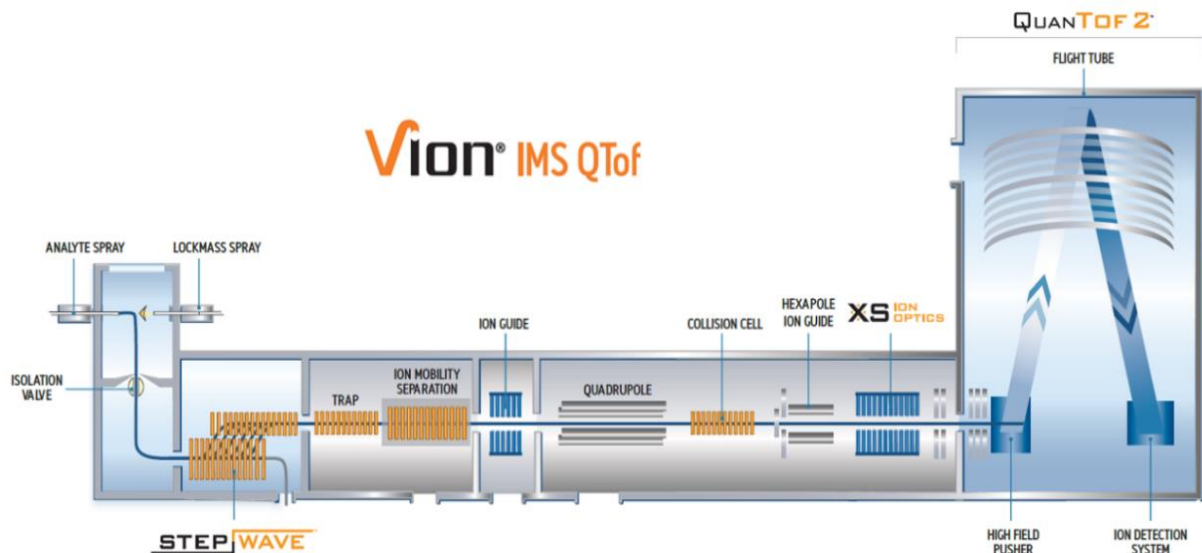


Abbildung 15: Aufbau eines Vion-IMS-QToF [90]

Von der UHPLC kommend, muss der flüssige Analyt beim Übergang in das Massenspektrometer ionisiert werden. Als Ionisationsquelle kann entweder eine ESI-Quelle oder eine Unispray-Quelle (USI) verwendet werden. Bei der UniSpray™-Ionisation wird die Hochspannung an eine zylindrische Zielelektrode angelegt. Dadurch kann es bei einigen Substanzen zu einer verbesserten Empfindlichkeit, im Vergleich zur ESI, kommen. Zurückzuführen ist dies auf die Bildung kleinerer Tröpfchen und die bessere Desolvatation [91]. Die Ionen gelangen nach der Vernebelung in ein ZSpray™. Das ZSpray™ weist eine spezielle orthogonale Anordnung auf um somit nichtionische Matrixbestandteile abzutrennen. Dadurch können auch stark matrixbelastete Proben analysiert werden [92].

Die ionisierten Teilchen werden anschließend zur weiteren Analytik in das Ionenmobilitätsspektrometer (engl. ion mobility spectrometry, IMS) weitergeleitet. Unter der Ionenmobilität wird die Trennung von ionischen Substanzen während ihres Drifts durch ein Gas unter Einfluss eines elektrischen Feldes verstanden. Durch die Kollision mit Gasmolekülen werden die Ionen, je nach räumlicher Molekülstruktur, gebremst. Die Driftzeit jedes Ions hängt von seiner Größe, Form und Ladung ab. Die Driftzeit kann in einen Kollisionsquerschnittswert (engl. collision cross section value; CCS) umgerechnet werden. Der CCS stellt ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal eines Ions in der Gasphase dar und gibt Hinweise auf die chemische Struktur bzw.

dreidimensionale Konfirmation. Somit stellt das IMS eine zusätzliche Dimension der Trennung dar [93, 94].

Zur Massenanalyse gelangen die Ionen anschließend in einen Quadrupol, in dem je nach eingestelltem m/z -Verhältnis bestimmte Ionen durchgelassen werden. Als zweiter Massenanalysator wird ein Time of Flight (TOF) eingesetzt. In diesem werden Ionen mit unterschiedlichen m/z -Verhältnissen während ihres Fluges entlang einer feldfreien Driftstrecke von bekannter Länge zeitlich dispergiert. Am Ende der Flugstrecke befindet sich ein Detektor, mit dem die Flugzeit von Emitter bis zum Detektor gemessen wird. Meist wird ein Sekundärelektronenvervielfacher, der die Signale verstärkt, eingesetzt [95]. Bei dem TOF In Abbildung 15 ist ein Reflektor eingebaut. Der Reflektor fungiert als Ionenspiegel, der Ionen mit gleicher Masse aber unterschiedlichen kinetischen Energien zeitlich fokussiert. Ionen mit höherer kinetischer Energie dringen tiefer in den Reflektor ein als energiearme Ionen. Der Reflektor ermöglicht somit eine Flugzeitkorrektur, die das Auflösungsvermögen des TOF-Analysators verbessert. Mit dem TOF ist eine simultane Bestimmung aller Massen möglich, wodurch sehr schnelle Messungen ohne Einschränkungen im Massenbereich ermöglicht werden [96, 97].

3 Material und Methoden

In der folgenden Arbeit wurden im Rahmen eines internationalen Projektes Untersuchungen zum Verbleib von Tyrosin und ALA nach der Verdauung durchgeführt. Bei dem Tyrosin handelt es sich nachfolgend immer um das L-Isomer. Um den Verbleib nachverfolgen zu können, wurde das radioaktive ^{14}C -Nuklid eingesetzt. Als Modellorganismen dienten hier Schweine, denen die ^{14}C -markierten Substanzen verabreicht wurden. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Entwicklung analytischer Methoden um mögliche Metabolite zu identifizieren.

Der zweite Teil dieser Arbeit behandelt Lebensmittelverarbeitungsprozesse. Die radioaktiven Substanzen aus der Fütterungsstudie wurden einem typischen Frittier-Prozess unterzogen. Weitere Lebensmittelverarbeitungsprozesse wurden mit dem Süßstoff Aspartam durchgeführt. Hier wurde ebenfalls der ^{14}C -markierte Standard eingesetzt und die Substanz einer Lebensmittelmatrix wie Rapsöl, Gebäck oder Kaffee zugegeben. Anschließend wurden Verarbeitungsprozesse, also Frittieren, Backen und Kochen, nachgestellt. Abschließend wurde die Stabilität des Aspartams in wässrigen Medien bei unterschiedlichen Werten für Temperatur, Zeit und pH-Wert untersucht.

Für die Proben wurden aufwendige Extraktionsverfahren entwickelt. Anschließend wurden sie mit speziellen Radioaktivitäts-Detektionsverfahren sowie hochauflösender Massenspektrometrie analysiert.

3.1 Verbleib von Lebensmittelinhaltsstoffen nach der Verdauung

Um den Verbleib der zwei ausgewählten Nährstoffe ^{14}C -Tyrosin und ^{14}C -ALA nach der Verdauung zu untersuchen, wurde eine Fütterungsstudie durchgeführt. Die Fütterungsstudie wurde in Melbourne an der Monash University durchgeführt und ist nicht Bestandteil der Arbeit. Als Modellorganismen wurden Jungschweine verwendet, da diese ein dem Menschen ähnliches Verdauungssystem aufweisen [98]. In Abbildung 16 ist das Design der Fütterungsstudie dargestellt.

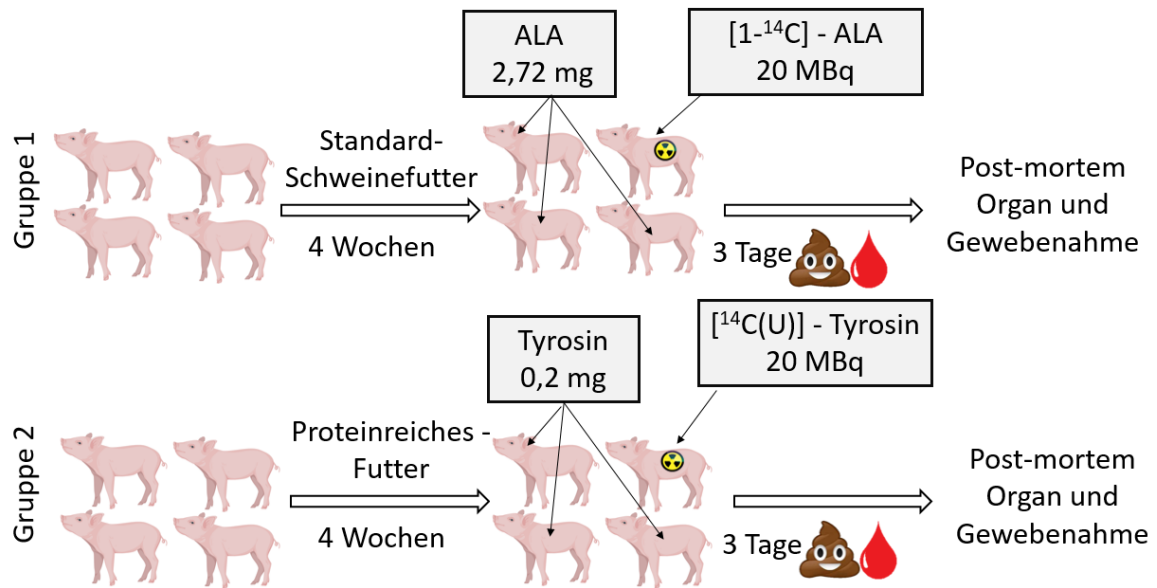


Abbildung 16: Design der Fütterungsstudie

Insgesamt wurden acht Tiere, aufgeteilt auf zwei Gruppen, eingeschlossen. Bei den Schweinen handelte es sich um junge Tiere mit einem maximalen Gewicht von 20 kg. Mittels einer speziellen Ernährung wurde die Darmflora zunächst 24 Tage konditioniert. Hierfür erhielt die ALA-Gruppe ein herkömmliches Schweinefutter. Dies setzte sich vor allem aus Weizen, Gerste, Lupinen und Sojamehl zusammen. Für die Verabreichung der ALA wurden leicht verdauliche Kapseln gewählt, wodurch die Resorption bereits beim Kauen stattfinden konnte. Ein Schwein aus Gruppe 1 hat die ^{14}C -markierte ALA verabreicht bekommen, die anderen drei Schweine bekamen die nicht-radioaktiv markierte Substanz. Bei der Tyrosin-Gruppe wurde dem Futter ein hocherhitztes Protein-Pulver zugesetzt, um das Mikrobiom der Darmflora zu konditionieren. Zusätzlich wurde das Tyrosin in magensaftresistente Kapsel verpackt, um die Resorption zu verhindern und so das Tyrosin vermehrt Fermentationsprozessen im (Dick-)Darm auszusetzen. Bei der Gruppe 2 wurde ebenfalls einem Schwein das ^{14}C -markierte Tyrosin gefüttert und den anderen drei Schweinen die nicht-radioaktive Substanz. Die Schweine, denen die nicht-radioaktive Substanz verabreicht wurde, dienten als Kontrollgruppen. Drei Tage lang wurden täglich Blut- und Exkrement-Proben entnommen. Die Organ- und Gewebentnahme erfolgte Post-mortem. Die Proben wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

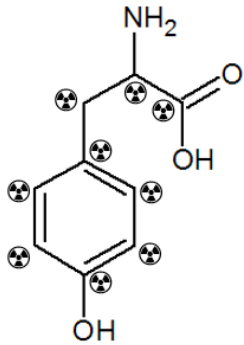
Ein Teil der Proben wurde für die Analyse, mittels Radioaktivitäts-Detektionsverfahren sowie hochauflösender Massenspektrometrie, nach Deutschland an das Fraunhofer Institut IME gekühlt gesendet. Um die Proben mittels Radio-UHPLC-HRMS untersuchen zu können, wurde ein Mindestwert an Radioaktivität von 2 kBq/g anvisiert. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass das Detektionslimit des Radiodetektors von 20 Bq pro Metabolit zu überschritten wird. Das entspräche einer Verabreichung von 20 MBq an ein Schwein mit 10 kg. Während in vielen Staaten Minischweine für wissenschaftliche Studien zugelassen sind, sind in Australien nur herkömmliche Hausschweine zugelassen. Somit wurden für die Studie Jungschweine mit maximal 20 kg gewählt. Darüber hinaus mussten die ethischen Richtlinien bezüglich der Höhe der radioaktiven Administration befolgt und infolgedessen der maximale Wert von 20 MBq eingehalten werden. Daraus resultierte ein neuer Mindestwert von 1 kBq/g.

Bei der Vermessung der Aktivitäten der Gewebeproben von den ^{14}C -Tyrosin und ^{14}C -ALA Schweinen zeigten sich Werte von weit unter 1 kBq/g (siehe Tabelle 43 im Anhang). Dadurch konnten keine Standard-Methoden aus der Literatur herangezogen werden und es mussten mehrere Aufkonzentrierungsschritte durchgeführt werden.

3.1.1 Tyrosin

Um potenzielle Metabolite und Abbauprodukte zu untersuchen, wurde das Tyrosin als ^{14}C -markierte Substanz erworben. Das ^{14}C -Tyrosin weist eine vollständige radioaktive Markierung auf und liegt somit mit einem spezifischen Isotopenverhältnis vor. Wichtige Daten zum radioaktiven Standard sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: spezifische Daten des ¹⁴C-Tyrosin-Standards

Spezifische Daten	
Markierung	[¹⁴ C(U)]
Lösungsmittel	Ethanol: Wasser (2:98)
Spezifische Aktivität	480 mCi/mmol
Strukturformel mit Angabe der radioaktiven Markierung	 <p>The image shows the chemical structure of Tyrosine, a zwitterionic amino acid. It consists of a benzene ring with a hydroxyl group (-OH) at the para position and a side chain at the other para position. The side chain is -CH2-CH(NH2)-COOH. The structure is annotated with ten radioisotope symbols (circles with a cross) indicating the positions of ¹⁴C labeling: one on the amino group (-NH2), one on the alpha-carbon, one on the beta-carbon, one on the carbonyl carbon, one on the carbonyl oxygen, and five on the benzene ring (at the 2, 3, 4, 5, and 6 positions).</p>

Für die Detektion der Analyten wurde zunächst eine UHPLC-Methode für das Tyrosin entwickelt. Da es sich bei Tyrosin um eine sehr polare Substanz handelt, kam eine ZIC-HILIC (engl. Zwitterionic Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) als Säule zum Einsatz. Die ZIC-HILIC weist durch ihre hydrophile Interaktionschromatografie und zwitterionsche Phase eine gute Retention von Aminosäuren auf [99].

Für die Methodenentwicklung wurden verschiedene Kalibrierstandards hergestellt (siehe Tabelle 4). Als Lösungsmittel wurde ACN gewählt.

Tabelle 4: Kalibrierpunkte Tyrosin

Kalibrierpunkte	kBq/mL	µg/mL
Kal 1	50	0,5
Kal 2	25	0,25
Kal 3	12,5	0,125
Kal 4	6,25	0,063
Kal 5	3,125	0,032

Die Messung und Methodenentwicklung erfolgte mittels flüssigchromatographischer Trennung und anschließender Detektion durch einen Radiodetektor sowie durch ein hochauflösendes Massenspektrometer. Die finalen Parameter für die chromatographische Trennung sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Chromatographische Parameter für die entwickelte ¹⁴C-Tyrosin-Methode mit einer ZIC-HILIC-Säule

UHPLC-System	Acquity Ultra Performance LC Waters Acquity Binary Solvent Manager Acquity Sample Manager Acquity Column Heater			
Trennsäule	SeQuant ZIC-HILIC 3,5 µm, 100 Å, 150 x 2,1 mm			
Säulentemperatur	40 °C			
Injektionsvolumen	20 µL			
Flussrate	0,40 mL/min			
Mobile Phase (ESI positiv und negativ)	A ACN:H ₂ O (80:20, v/v) + 5 mM NH ₄ Ac			
	B H ₂ O + 5 mM NH ₄ Ac			
Gradient (ESI positiv und negativ)	Zeit [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]	Kurve
	0	100	0	Initial
	1	100	0	1
	8	50	50	5
	12	50	50	1
	15	100	0	1

Um ein Radiosignal zu generieren, wurde ein Radiodetektor zwischen die LC- und MS-Einheit integriert. Die gerätespezifischen Einstellungen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Parametereinstellung des Radiodetektors Berthold LB 509

Parameter	Einstellung
Detektorzelle	YG-75-U6M-Durchflusszelle
Nuclide	^{14}C
Cell Modell	YG
Ratem-Units	Min
H-Background [cpm]	1 K
Efficiency-Correction	No
H-Range [cpm]	100 K
Peak-FWHM [sec]	8 sec
H-Time-C (FWHM)	0,5

In Tabelle 7 sind die Messparameter der massenspektrometrischen Detektion dargestellt. Als Messmodus wurde ein FullIMS-AIF (all ion fragmentation) gewählt, der eine Fullscan-Massenspektrometrie in Kopplung mit einer Gesamtionen-Fragmentierung erlaubt.

Tabelle 7: HRMS-Parameter für die entwickelte ^{14}C -Tyrosin-Methode der Q Exactive™ Plus (Orbitrap) im FullIMS-AIF-Modus

Massenspektrometer	Q Exactive™ Plus, Thermo Fisher Scientific	
Ionisationsquelle	Electrospray Ionisation (ESI)	
Software	Thermo Xcalibur 4.0.27.19	
Allg. Quellenparameter	Sheath gas flow rate	35
	Aux gas flow rate	10
	Sweep gas flow rate	2
	Spray voltage	3 kV
	Capillary temperature	320 °C
	S-lens RF-level	55
	Aux gas heater temperature	350 °C
MS-Parameter	Allgemein	
	Polarity	positiv/negativ
	In-source-CID	0,0 eV
	FullIMS	
	scan range	60–750 m/z
	Resolution	140 000
	AGC target	10 ⁶
	Max. injection time	200 ms
	Number of scans	1
	AIF	
	scan range	60–750 m/z
	Resolution	140 000
	AGC target	10 ⁶
	Max. injection time	200 ms
	Collision energy	Stepped NCE: 20,35,50

Der Scanbereich wurde von 50 auf 60 angepasst, um das Acetat-Signal (m/z 59,0139) des Puffers auszublenden.

Für die Untersuchung der Metabolite in den Schweine-Matrices musste im ersten Schritt ein geeignetes Extraktionsverfahren entwickelt werden. Eine besondere Hürde stellten die niedrigen Radioaktivitäten in den Gewebeproben dar, die sich auf weit unter 1 kBq/g beliefen. Dadurch konnten keine Standard-Methoden aus der Literatur herangezogen werden und es mussten mehrere Aufkonzentrierungsschritte durchgeführt werden. Für die Methodenentwicklung der Extraktionsverfahren wurden Schweineproben von der Kontrollgruppe mit dem ^{14}C -Tyrosin-Standard dotiert und aufgearbeitet. Die entwickelten Methoden sind dadurch auf die Ausgangssubstanz Tyrosin spezifiziert und nicht auf die Metabolite. Ziel der Methodenentwicklung war es, den zugesetzten ^{14}C -Standard möglichst quantitativ zu extrahieren. Aufgrund der vielen durchgeführten Experimente sind im Nachfolgenden nur die finalen Methoden beschrieben. Die entwickelten Methoden wurden anschließend auf die Proben des ^{14}C -Tyrosin-Schweins angewandt.

3.1.1.1 Tyrosin in der Matrix Plasma

Für die Methodenentwicklung wurde Vollblut über einen Metzger bezogen und für die Plasmagewinnung für 10 Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert. Als Gerinnungshemmer wurde Heparin eingesetzt. Der klare Plasmaüberstand konnte anschließend abgenommen werden. Für die Extraktion des Tyrosins aus Blutplasma wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Methanol gewählt. Dazu wurde in einer Dreifachbestimmung 1 mL Plasma mit 25 μL einer 25 kBq/mL- ^{14}C -Tyrosin-Stammlösung dotiert. Diese Dotierung fand nur bei der Methodenentwicklung statt. Zu dem Plasma wurden 5 mL MeOH + 5 % FA (Ameisensäure) zugegeben und für 15 Minuten auf einem Vortex-Mixer geschüttelt. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Extraktionsschritt wurde wiederholt und die Überstände wurden vereinigt. Mittels LSC (Hidex 600 SL) wurde die Aktivität bestimmt. Dazu wurden 900 μL MeOH in ein LSC-Vial vorgelegt, 100 μL der Probe zugegeben und mit 4 mL LSC-Cocktail Ultima Gold versetzt. Die Probe wurde unter Stickstoffstrom abgedampft und in 4 mL H_2O + 5 % FA gelöst. Um mögliche Lipide aus dem Plasma zu entfernen, wurde ein Reinigungsschritt mit Hexan durchgeführt. Dazu wurden 4 mL Hexan der Probe zugegeben, diese für fünf Minuten auf einem Vortex-Mixer geschüttelt und für 10 Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert. Der Hexan-Überstand konnte anschließend

abgenommen werden. Von dem Überstand wurde ebenfalls eine LSC-Messung durchgeführt. Dazu wurden 100 µL Probe entnommen und mit 4 mL LSC-Cocktail SuperSolveX versetzt. Um Matrixinterferenzen wie Proteine, Salze und Phospholipide zu entfernen, wurde eine HLB-Prime-SPE 500 mg (engl. hydrophilic-lipophilic balance solid phase extraction) durchgeführt. Die Kartusche wurde mit 1 mL H₂O + 5 % FA konditioniert. Anschließend wurde die Probe aufgegeben. Nach dem vollständigen Durchlaufen der Probe wurde die Kartusche mit 4 mL H₂O + 5 % FA gespült und wieder mittels LSC vermessen. Dazu wurden 100 µL Probe entnommen mit 4 mL LSC-Cocktail AquaSafe500+ versetzt. Die Proben wurden anschließend bis zur Trockene abgedampft und in 200 µL MeOH + 3 % FA gelöst.

Mit dieser entwickelten Methode wurde 1 mL Plasma des ¹⁴C-Tyrosin-Schweines aufgearbeitet. Dazu wurde im ersten Schritt 100 µL die Aktivität in der Probe bestimmt. Dazu wurden in einer Dreifach-Bestimmung je 50 µL Plasma entnommen und mittels LSC vermessen. Aufgrund der sehr geringen Probenmenge konnte nur eine Einfachbestimmung durchgeführt werden. Die Probe wurde anschließend mittels der Radio-UHPLC-HRMS-Methode, entsprechend Kapitel 3.1.1, vermessen.

Nach der Aufarbeitung mit methanolischer Flüssig-Flüssigextraktion und HLB-Reinigung wurde eine Proteinfällung durchgeführt. Dazu wurde der Rückstand in 2 mL H₂O + 5 % FA gelöst, mit 5 mL ACN versetzt und fünf Minuten auf einem Vortex-Mixer geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation für fünf Minuten bei 4.700 rpm wurde der ACN-Überstand abgenommen und eine LSC-Messung durchgeführt. Dazu wurden 900 µL ACN in ein LSC-Vial vorgelegt, 100 µL Probe hinzugegeben und mit 4 mL LSC-Cocktail SuperSolveX versetzt. Um zu überprüfen, ob das Tyrosin selbst nicht durch die Protein-Präzipitation gefällt wurde, wurde 1 mL einer nicht radioaktiven Plasma-Probe mit 20 µL der ¹⁴C-Tyrosin-Stammlösung mit 25 kBq/mL dotiert. Anschließend wurde mit der oben beschriebenen Methode eine Proteinfällung durchgeführt und die Ausbeute (Wiederfindungsrate) im ACN-Überstand mittels LSC bestimmt.

3.1.1.2 Tyrosin in der Matrix Darm

Die Methode wurde mit einem Schweinedarm, der über einen Metzger bezogen wurde, entwickelt. Im ersten Schritt wurde der tiefgefrorene Darm in kleine Stücke geschnitten

und im gefrorenen Zustand mittels einer Schwingmühle (Retsch MM 400) und der Nutzung von flüssigem Stickstoff homogenisiert. Von dem Probenpulver wurde drei Aliquotes mit je 1 g eingewogen. Das Ziel dieser Methode war es, eine Aufkonzentrierung von je 1 g Probe in 150 μL zu bewerkstelligen. Zu jedem Aliquot wurden 25 μL einer ^{14}C -Tyrosin-Stammlösung (25 kBq/mL) dotiert und für die Extraktion 5 mL MeOH + 5 % FA zugegeben. Die Dotierung des ^{14}C -Standards fand nur bei der Methodenentwicklung statt. Die Proben wurden für 15 Minuten auf einem Vortex-Mixer geschüttelt. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Extraktionsschritt wurde zweimal wiederholt und die Überstände wurden vereinigt. Mittels LSC wurde die Aktivität bestimmt. Dazu wurden 900 μL MeOH in ein LSC-Vial vorgelegt, 100 μL des Extrakts zugegeben und mit 4 mL LSC-Cocktail Ultima Gold versetzt. Die Extrakte wurden unter Stickstoffstrom abgedampft und in 4 mL H_2O + 5 % FA gelöst. Anschließend wurde ein Reinigungsschritt mit Hexan durchgeführt. Dazu wurden 4 mL Hexan zugegeben, für fünf Minuten auf einem Vortex-Mixer geschüttelt und für 10 Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert. Der Hexan-Überstand konnte anschließend abgenommen werden. Von dem Überstand wurde ebenfalls eine LSC-Messung durchgeführt. Nachfolgend wurde eine HLB-Prime-SPE durchgeführt. Die Proben mussten hierbei immer auf zwei Kartuschen aufgeteilt werden, um diese nicht zu verstopfen. Die Kartuschen wurden mit 1 mL H_2O + 5 % FA konditioniert. Anschließend wurden die Proben aufgegeben. Nach dem vollständigen Durchlaufen der Proben wurden die Kartuschen mit 4 mL H_2O + 5 % FA gespült und wieder mittels LSC vermessen. Die Proben wurden anschließend bis zur Trockene abgedampft, in 1 mL MeOH + 3 % FA gelöst und für fünf Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert. Alle Überstände wurden vereinigt und wieder unter Stickstoffstrom bis zur Trocknung abgedampft. Anschließend wurden die Proben in 150 μL MeOH + 3 % FA gelöst. Bei den finalen Proben wurden LSC-Messungen durchgeführt.

Diese entwickelte Methode wurde auf die ^{14}C -Tyrosin-Schweinedarm-Proben der Fütterungsstudie angewandt. Die Aktivität in den Proben wurde mittels eines Oxidizers bestimmt. Dazu wurden dreimal je 50 mg getrocknete Probe eingewogen und verbrannt. Die Proben wurden mittels Radio-UHPLC-HRMS-Methode entsprechend Kapitel 3.1.1 vermessen.

Nach der Aufarbeitung mit methanolischer Fest-Flüssigextraktion und HLB-Reinigung wurde eine Proteinfällung durchgeführt. Dazu wurde der Rückstand in 6 mL H₂O + 5 % FA gelöst, mit 7 mL ACN versetzt und fünf Minuten auf einen Vortex-Schüttler gestellt. Nach anschließender Zentrifugation für fünf Minuten bei 4.700 rpm wurde der ACN-Überstand abgenommen und eine LSC-Messung durchgeführt. Dieser Extraktionsschritt mit ACN wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die Überstände wurden vereinigt und wieder unter Stickstoffstrom abgedampft. Eine Lösung der Probe bzw. weitere LSC oder Radio-UHPLC-HRMS war aufgrund der Trübung der Probe nicht möglich. Die festen Probenrückstände wurden mittels eines Oxidizers vermessen. Dazu wurden jeweils 50 mg getrockneter Probe eingewogen und für drei Minuten verbrannt.

3.1.1.3 Tyrosin in der Matrix Cerebellum

Die Methodenentwicklung wurde mit einem Schweinehirn, das über einen Metzger bezogen wurde, durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das tiefgefrorene Gehirn in kleine Stücke geschnitten und im gefrorenen Zustand mittels einer Schwingmühle (Retsch MM 400) und der Nutzung von Flüssigstickstoff homogenisiert. Von dem Probenpulver wurden drei Aliquotes mit je 1 g eingewogen. Zu jedem Aliquot wurden je 25 µL einer 25 kBq/mL ¹⁴C-Tyrosin-Stammlösung dotiert und für die Extraktion 5 mL MeOH + 5 % FA zugegeben. Die Proben wurden für 15 Minuten auf einem Vortex-Mixer geschüttelt. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Extraktionsschritt wurde zweimal wiederholt und die Überstände wurden vereinigt. Mittels LSC wurde die Aktivität bestimmt. Die Proben wurden unter Stickstoffstrom abgedampft und in 5 mL H₂O + 5 % FA gelöst. Aufgrund der Struktur der vermuteten Metabolite (Neurotransmitter, die eine dem Tyrosin ähnliche Struktur aufweisen) wurde eine Kombination aus HLB-Prime-SPE und anschließender MCX-SPE (engl. Mixed-Mode Cation exchange) durchgeführt. Die HLB-Prime-Kartuschen wurden mit 1 mL H₂O + 5 % FA konditioniert. Anschließend wurden die Proben aufgegeben. Nach dem vollständigen Durchlaufen der Proben wurde die Kartuschen mit 4 mL H₂O + 1 % FA gespült und wieder mittels LSC vermessen. Die MCX-Kartuschen wurden mit 3 mL MeOH und anschließend mit 3 mL H₂O + 1 % FA konditioniert. Nachfolgend wurde die Probe aufgegeben. Es folgten Waschschrte mit zweimal 3 mL H₂O + 1 % FA und

zweimal 3 mL MeOH. Die Fraktionen wurden jeweils einzeln aufgefangen. Anschließend wurden die Analyten mit zweimal 3 mL MeOH + 5 % NH₄OH eluiert. Von jeder Fraktion wurde eine LSC-Messung durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Radioaktivität bei der Probenaufgabe und den Waschsritten verlorengegangen ist. Die Proben wurden anschließend unter Stickstoffstrom abgedampft und in 200 µL MeOH + 3 % FA gelöst. Die Proben wurden vereinigt, erneut abgedampft und in 200 µL MeOH + 3 % FA gelöst. Von der finalen Probe wurde eine LSC-Messung durchgeführt.

Die entwickelte Methode wurde auf die ¹⁴C-Tyrosin-Gehirn-Proben der Fütterungsstudie angewandt. Untersucht wurde dabei das Cerebellum, da dieses in ausreichender Menge vorlag. Die Aktivität in den Proben wurde mittels eines Oxidizers bestimmt. Dazu wurden dreimal je 50 mg getrocknete Probe eingewogen und für drei Minuten verbrannt. Die festen Probenrückstände wurden ebenfalls mit einem Oxidizer vermessen. Dazu wurden jeweils 50 mg getrocknete Probe eingewogen und für drei Minuten verbrannt. Die Proben von der Extraktion mit Methanol + 5 % FA wurden mit der Radio-UHPLC-HRMS-Methode entsprechend 3.1.1 vermessen.

3.1.1.4 Tyrosin in der Matrix Exkremente

Bei den Exkrement-Proben handelte es sich um ein Gemisch aus Urin und Kot. Da die Gruppe der Tyrosin-Schweine eine spezielle proteinhaltige Ernährung bekommen hat, erwies sich die Gülle eines Hausschweins von einem deutschen Bauern als nicht repräsentativ. Aufgrund dessen wurden für die Methoden-Entwicklung die Exkrement-Proben eines Schweines von der Tyrosin-Kontrollgruppe genommen. Es wurden drei Aliquotes mit je 1 g eingewogen. Zu jedem Aliquot wurden 25 µL einer ¹⁴C-Tyrosin-Stammlösung (25 kBq/mL) dotiert und für die Extraktion 5 mL MeOH + 5 % FA zugegeben. Die Proben wurden für 15 Minuten auf einem Vortex-Mixer geschüttelt. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Extraktionsschritt wurde zweimal wiederholt und die Überstände vereinigt. Mittels LSC wurde die Aktivität bestimmt. Die Proben wurden unter Stickstoffstrom abgedampft und in 5 mL H₂O + 5 % FA gelöst. Um mögliche Fette zu entfernen, wurde ein Reinigungsschritt mit Hexan durchgeführt. Hierfür wurden 4 mL zu jeder Probe gegeben, für fünf Minuten auf einem Vortex-Mixer geschüttelt und

für 10 Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert. Der Hexan-Überstand konnte anschließend abgenommen werden. Von dem Überstand wurde ebenfalls eine LSC-Messung durchgeführt. Nachfolgend wurde eine HLB-Prime-SPE durchgeführt. Die Kartuschen wurden mit 1 mL H₂O + 5 % FA konditioniert. Anschließend wurden die Proben aufgegeben. Nach dem vollständigen Durchlaufen der Proben wurden die Kartuschen mit 4 mL H₂O + 5 % FA gespült und wieder mittels LSC vermessen. Die Proben wurden anschließend vereinigt, unter Stickstoffstrom abgedampft und in 150 µL MeOH + 3 % FA gelöst. Von der finalen Probe wurde eine LSC-Messung durchgeführt.

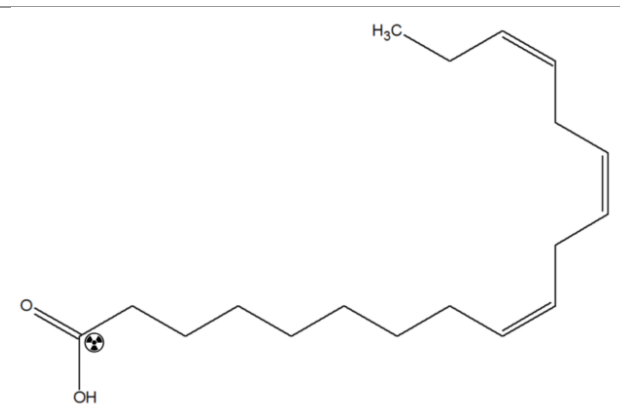
Mit der entwickelten Methode wurden die radioaktiven ¹⁴C-Tyrosin-Exkrement-Proben der Fütterungsstudie aufgearbeitet. Die Aktivität in den Proben wurde mittels eines Oxidizers bestimmt. Dazu wurden dreimal je 50 mg getrocknete Probe eingewogen und verbrannt. Aufgrund der niedrigen Aktivität nach der HLB wurden weitere Elutions-Schritte mit 2 mL H₂O:MeOH (80:20, v/v), 2 mL H₂O:MeOH (50:50, v/v) und 5 mL MeOH durchgeführt. Jedes Extrakt wurde hierbei einzeln aufgefangen und mittels LSC vermessen. Die Extrakte wurden vereinigt, mit Stickstoffstrom abgedampft und mit 150 µL MeOH + 3 % FA resuspendiert. Die Probe wurde mit der Radio-UHPLC-HRMS-Methode (siehe Kapitel 3.1.1) vermessen.

Mit dem Rückstand wurde eine Säure-Hydrolyse durchgeführt. Dazu wurden aus jedem Probenrückstand 0,4 g eingewogen und 5 mL 37 %ige HCl dazugegeben. Die Proben wurden für drei Stunden bei 105 °C in einem Trockenschrank erhitzt und anschließend mithilfe von MeOH in ein 15 mL-PP-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und unter Stickstoffstrom abgedampft. Die Proben wurden in 8 mL H₂O + 5 % FA mittels eines Vortex-Schüttlers gelöst. Anschließend erfolgte ein Hexan-Reinigungsschritt und eine HLB-Prime SPE. Die Durchführung erfolgte analog zur anfangs durchgeführten Aufreinigung. Die finale vereinigte Probe wurde ebenfalls mit der Radio-UHPLC-HRMS-Methode entsprechend Kapitel 3.1.1 vermessen. Für die Untersuchung der Metabolite wurde das Programm Compound Discoverer genutzt (siehe Abschnitt 3.1.3.3). Die festen Probenrückstände wurden mittels eines Oxidizers vermessen. Dazu wurden jeweils 50 mg Probe eingewogen und für drei Minuten verbrannt.

3.1.2 ALA

ALA wurde als radioaktiver ^{14}C -Standard erworben. Die Markierung befindet sich am Carboxyl-C-Atom. Wichtige Daten zu dem radioaktiven Standard sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: spezifische Daten des ^{14}C -ALA-Standards

Spezifische Daten	
Markierung	[1- ^{14}C]
Lösungsmittel	Ethanol
Spezifische Aktivität	55 mCi/mmol
Strukturformel mit Angabe der radioaktiven Markierung	

Für die Untersuchung möglicher Abbauprodukte wurde eine Radio-UHPLC-HRMS mit zwischengeschaltetem Radiodetektor entwickelt. Die Parameter für die chromatographische Trennung sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: chromatographische Parameter für die entwickelte ¹⁴C-ALA-Methode mit einer C18-Säule

UHPLC-System	Acquity Ultra Performance UHPLC, Waters Acquity Binary Solvent Manager Acquity Sample Manager Acquity Column Heater		
Trennsäule	Waters Acquity UHPLC BEH 1,7 µm, 130 Å, 100 x 2,1 mm		
Säulentemperatur	55 °C		
Injektionsvolumen	20 µL		
Flussrate	0,35 mL/min		
Mobile Phase (ESI positiv und negativ)	A H ₂ O:MeOH (95:5, v/v) + 5 mM NH ₄ Ac B MeOH + 5 mM NH ₄ Ac		
Gradient (ESI positiv und negativ)	Zeit [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
	0	100	0
	10	0	100
	13	0	100
	15	100	0
	16	100	0

Aufgrund der unpolaren Struktur der ALA wurde eine C18-Säule gewählt. Die Parameter der Einstellungen des Radiodetektors und die HRMS-Einstellungen entsprechen denen in Tabelle 6 bzw. Tabelle 7.

Für die Untersuchung der Metabolite der ALA nach der Verdauung mussten im ersten Schritt geeignete Extraktionsverfahren entwickelt werden. Aufgrund der sehr geringen Aktivitäten in den einzelnen Proben-Matrices des ¹⁴C-ALA-Schweins, mussten einige Matrices ausgeschlossen werden. Untersucht wurden die Leber- und Exkrement-Proben, da diese die höchste Aktivität aufwiesen. Die sehr geringen Aktivitäten machten die Verwendung von Standard-Methoden aus der Literatur nicht möglich. Es mussten mehrere Aufkonzentrierungsschritte durchgeführt werden. Für die Methodenentwicklung der Extraktionsverfahren wurden nicht-radioaktive Schweineproben mit dem ¹⁴C-ALA-Standard dotiert und aufgearbeitet. Die entwickelten Methoden sind dadurch auf die Ausgangssubstanz spezifiziert und nicht

auf die unbekannt Metabolite. Ziel der Methodenentwicklung war es, den zugesetzten ^{14}C -Standard möglichst quantitativ zu extrahieren. Aufgrund der vielen durchgeführten Experimente sind im Nachfolgenden nur die finalen Methoden beschrieben. Die entwickelten Methoden wurden anschließend auf die Proben des ^{14}C -ALA-Schweins angewandt.

3.1.2.1 ALA in der Matrix Leber

Um eine geeignete Extraktionsmethode zu entwickeln, wurde eine Schweineleber (bezogen über einen Metzger) homogenisiert und zu drei Aliquotes mit je 1 g eingewogen. Das Ziel der Aufkonzentrierung war es, 1 g Leber-Probe in 100 μL Lösungsmittel aufzunehmen. Die Proben wurden mit 100 μL des ^{14}C -ALA-Standards (6,7 kBq/mL) dotiert. Für die Extraktion wurden das semipolare Lösungsmittel Ethylacetat und QuEChERS-Salze gewählt. Dazu wurden im ersten Schritt 2 mL H_2O zu den Proben gegeben und anschließend 5 mL Ethylacetat ergänzt. Als Antioxidationsmittel wurden 100 μL einer 0,3 mg/mL- Butylhydroxytoluol-Lösung (BHT) zugegeben. Die Proben wurden für fünf Minuten auf einem Vortex-Mixer geschüttelt. Nachfolgend wurden 2,5 g QuEChERS-Salze (DisQuE™ Citrat Mix: 1 g Trinatriumcitrat-Dihydrat, 0,5 g Dinatriumhydrogencitrat-1,5 H_2O , 1 g NaCl, 4 g MgSO_4) zugegeben und die Proben erneut für 60 Minuten auf einem Vortex-Mixer geschüttelt. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Diese Extraktionsschritte wurden insgesamt zweimal wiederholt. Die Wiederfindungsrate der Aktivität wurde mittels LSC bestimmt. Die Extrakte wurden vereinigt bis zur Trockene unter Stickstoffstrom abgedampft und in 100 μL MeOH: H_2O (50:50, v/v) gelöst. Von der finalen Probe wurden 10 μL für eine LSC-Messung entnommen.

Die entwickelte Methode wurde auf die ^{14}C -ALA-Leber-Proben angewandt. Die Aktivität in den Proben wurde mittels eines Oxidizers bestimmt. Dazu wurden dreimal je 50 mg getrocknete Probe eingewogen und verbrannt. Die gewonnenen Extrakte konnten mittels Radio-UHPLC-HRMS gemessen werden. Für die vollständige Bilanzierung wurden die Probenrückstände getrocknet und ebenfalls mittels Oxidizer vermessen. Dazu wurden dreimal je 50 mg Probe eingewogen und verbrannt.

3.1.2.2 ALA in der Matrix Exkremente

Für die Methodenentwicklung wurden nicht-radioaktive Exkrement-Proben aus der Fütterungsstudie gewählt, da diese die Matrix am besten repräsentierten. Es wurden drei Aliquotes zu je 1 g eingewogen. Die Proben wurden mit 100 μL des ^{14}C -ALA-Standards (6,7 kBq/mL) dotiert. Im ersten Schritt wurden 2 mL H_2O den Proben hinzugegeben und anschließend 5 mL Ethylacetat hinzugefügt. Als Antioxidationsmittel wurden 100 μL einer 0,3 mg/mL-BHT-Lösung zugegeben. Die Proben wurden für fünf Minuten auf einem Vortex-Mixer geschüttelt. Nachfolgend wurden 2,5 g QuEChERS-Salze (DisQuE™ Citrat Mix) zugegeben und die Proben erneut für 60 Minuten auf einem Vortex-Mixer geschüttelt. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Diese Extraktionsschritte wurden zweimal wiederholt. Die Wiederfindungsrate der Aktivität wurde mittels LSC bestimmt. Die Extrakte wurden vereinigt bis zur Trocknung unter Stickstoffstrom abgedampft und in je 200 μL MeOH:H₂O (50:50, v/v) gelöst. Anschließend wurden die Extrakte für 5 Minuten bei 13.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und von der finalen Probe wurden 10 μL für eine LSC-Messung entnommen.

Mit der entwickelten Methode wurde dreimal 1 g der radioaktiven Exkrement-Proben aufgearbeitet. Die Aktivität in den Proben wurde mittels eines Oxidizers bestimmt. Dazu wurden dreimal je 50 mg Probe eingewogen und verbrannt. Die gewonnenen Extrakte konnten mittels Radio-UHPLC-HRMS gemessen werden. Mit dem Rückstand wurde eine Extraktion mit 8 mL MeOH durchgeführt. Die Proben wurden für 60 Minuten auf einem Vortex-Mixer geschüttelt, anschließend wurde eine LSC-Messung durchgeführt. Diese Extraktion wurde einmal wiederholt. Die Proben wurden erneut abgedampft und in 200 μL MeOH:H₂O (50:50, v/v) gelöst. Eine Messung der Proben mittels Radio-UHPLC-HRMS war aufgrund der Trübung der Proben nicht möglich. Für die vollständige Bilanzierung wurden die Probenrückstände getrocknet und ebenfalls mittels Oxidizer vermessen. Dazu wurden dreimal je 50 mg Probe eingewogen und verbrannt.

3.1.3 Chemikalien und Geräte

Die in diesem Versuchsteil verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Chemikalien für die Untersuchungen von ^{14}C -Tyrosin und ^{14}C -ALA nach der Verdauung

Chemikalien	Hersteller	Spezifikation
^{14}C -L-Tyrosin	ARC	Radiochem. Reinheit: 99,1% Spezif. Aktivität: 480 mCi/mmol
^{14}C - α -Linolensäure	ARC	Radiochem. Reinheit: 99,8% Spezif. Aktivität: 55,6 mCi/mmol
Acetonitril	Th. Geyer, Chemsolute	$\geq 99,95\%$
Ameisensäure	Thermo Fisher Chemical	LC-MS Grade
Ammoniak	Merck	25 %
Ammoniumacetat	Sigma Aldrich	$\geq 99\%$
AquaSafe 500+ (LSC)	Zinsser Analytic	k.a.
Ethylacetat	Th. Geyer, Chemsolute	$\geq 99,8\%$,
Hexan	Th. Geyer, Chemsolute	$\geq 95\%$
Methanol	J.T.Baker®	$\geq 99,8\%$
Methyl-tert-butylether	Honeywell, Riedel-de-Haën	$\geq 99,7\%$
QuEChERS, DisQuE (Sodium Citrat Pouch)	Waters	k.A.
Rapsöl	Huilerie Bio, Bram, Frankreich	Bio-Rapsöl nativ; Ernte 2019
Supersolve-X (LSC)	Zinsser Analytic	k.A.
UHQ Wasser	Purelab Ultra System (ELGA)	18,2 M Ω /cm ²
Ultima Gold™	Perkin Elmer	k. A

Des Weiteren sind alle Geräte und Verbrauchsmaterialien, die in diesem Versuchsteil verwendet wurden, in Tabelle 11 und Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 11: Liste der verwendeten Geräte für die Untersuchungen von ^{14}C -Tyrosin und ^{14}C -ALA nach der Verdauung

Gerät	Hersteller und Modell
Feinwaage	Mettler Toledo AX 204 Delta Range
Halogentrockner	Mettler Toledo HB 43-S
Kolbenhubpipette	Eppendorf
Liquid Scinitillation Counter	Hidex 600 SL
Multischüttler	IKA Vibrax VXR basic
Sample Oxidizer	Packard 307
Schwingmühle	Retsch MM 400
Schüttelbank	Gerhardt Laboshake LS 500
Schüttler	IKA Vortex 4 basic
Stickstoffverdampfer	Biotage TurboVap LV
Trockenschrank	Heraeus Instrument T6060
Totvolumenpipetten	Gilson
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Super RK digital
Waage	Sartorius L420 P+
Zentrifuge	VWR Megastar 1.6 R
Zentrifuge	VWR Microstar 12

Tabelle 12: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien von ^{14}C -Tyrosin und ^{14}C -ALA nach der Verdauung

Artikel	Hersteller
Braunglas 1,5 mL, Kurzgewinde	Lab Logistics Group
Combusto Pad	Zinsser Analytic
Einmalspritzen 2 m	Braun
Mikroeingang 300 μL	Klaus Trott GmbH
Mikroreaktionsgefäß, 1,5 mL	Eppendorf
pH-Teststreifen MColor pHast 7,5–14	Macherey Nagel
pH-Teststreifen pH Fix 0–6	Macherey Nagel
Pipettenspitze 100 μL ; 5 mL	Starlab Tip One
Pipettenspitze 1000 μL	Greiner Bio-One
Pipettenspitze (Totvolumen): 10 μL , 50 μL , 250 μL , 1000 μL	Gilson
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen, 15 mL	Greiner Bio-One
Polypropylen- Zentrifugenröhrchen, 50 mL	Sarstedt
Oasis PRiME HLB (500 mg, 6cc) Kartuschen	Waters
Oasis MCX (500 mg, 6cc) Kartuschen	Waters

3.2 Verbleib von Lebensmittelinhaltsstoffen nach Lebensmittelverarbeitungsprozessen

Um den Verbleib der zwei ausgewählten Nährstoffe ^{14}C -Tyrosin und ^{14}C -ALA während der Erhitzung in Rapsöl zu untersuchen wurden Versuche mit den radioaktiven Substanzen durchgeführt.

Anschließend wurde der Verbleib von ^{14}C -Aspartam nach Lebensmittelverarbeitungsprozessen untersucht. Hierfür wurde ebenfalls der radioaktive Standard unterschiedlichen Lebensmittelmatrices zugesetzt um potentielle Abbauprodukte identifizieren zu können.

3.2.1 Tyrosin

Um den Verbleib von Tyrosin bei einem simulierten Frittier-Prozess zu untersuchen, wurde ^{14}C -Tyrosin-dotiertes Rapsöl in einem geschlossenen Glas-Vial erhitzt. In einer Doppelbestimmung wurden jeweils 2 g Rapsöl in ein 10 mL-Headspace-Vial eingewogen und 30 μL einer Stammlösung mit 1.250 kBq/mL ^{14}C -Tyrosin zugegeben. Die Proben wurden in einem Umluftbackofen für 30 Minuten bei 170 °C erhitzt. Zusätzlich wurden entsprechende Leerwertproben, bestehend aus nicht-dotiertem Öl, erhitzt.

Um das Verhalten von ^{14}C -Tyrosin ohne Öl-Matrix zu untersuchen, wurden 500 μL H_2O mit 40 μL einer Stammlösung mit 500 kBq/mL ^{14}C -Tyrosin dotiert. Der Ansatz wurde in einem mit Alufolie verschlossenen LC-Vial 30 Minuten bei 130 °C in einem Umluftbackofen erhitzt.

3.2.1.1 Probenaufarbeitung

Um eine vollständige Bilanzierung zu ermöglichen, wurden die Öl-Proben vor der Extraktion mittels LSC vermessen. Dazu wurden in einem 6 mL-LSC-Vial 950 μL Aceton vorgelegt und 50 μL des dotierten Öls zugegeben. Die Vials wurden mit 4 mL Ultima Gold™ versetzt, verschlossen, kurz geschüttelt und per LSC vermessen.

Die Extraktion von möglichen Abbauprodukten erfolgte mit einer sauren, wässrigen Extraktion und einer anschließenden QuEChERS-Extraktion (engl. quick, easy, cheap, effective, rugged, safe). Zunächst wurde das Öl in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 4 mL UHQ-Wasser + 3 % FA versetzt, um mögliche polare Substanzen zu extrahieren. Die Proben wurden für 15 Minuten auf einem Vortex-Mixer geschüttelt und anschließend für 10 Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert. Mittels einer Glas-Pasteurpipette wurde die untere wässrige Phase abgenommen und die Extraktion erneut durchgeführt. Die vereinigten wässrigen Extrakte wurden mittels LSC gemessen. Die Extrakte wurden im Stickstoffstrom bei 40 °C bis ungefähr 100 μL eingengt und in 1000 μL MeOH resuspendiert. Es erfolgte ein Ausfrieren für mindestens drei Stunden bei -25 °C, um mögliche ölige Rückstände zu entfernen und so eine Verschmutzung des LC-MS-Systems zu vermeiden. Die Proben wurden anschließend bei -10 °C und 4.700 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Extrakte wurden erneut im Stickstoffstrom bei 40 °C bis zur Trockene eingengt. Eine Probe, von der Doppelbestimmung, wurde in 200 μL

ACN und die andere Probe in 200 μ L H₂O + 3 % FA aufgenommen. Dadurch war die Möglichkeit gegeben, die Probe einerseits mit einer ZIC-HILIC-Säule zu messen (Probe in ACN) und andererseits mit einer C18-Säule (Probe in H₂O + 3 % FA). Von den finalen Proben wurden 10 μ L für eine LSC-Messung entnommen und die Ausbeute überprüft.

Um mögliche unpolare Abbauprodukte zu extrahieren, wurde mit dem Öl-Rückstand eine QuEChERS-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde die Probe mit 4 mL ACN und 2 mL H₂O + 3 % FA vermischt und es wurden 2 g QuEChERS-Salze (DisQuE™ Citrat Mix) zur Phasentrennung zugegeben. Anschließend wurde die Probe für 20 Minuten auf einem Vortex-Mixer geschüttelt. Nachfolgend wurde die Probe für 10 Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert und für mindestens drei Stunden bei -20 °C eingefroren. Nach erneuter Zentrifugation (5 Minuten, -10 °C, 4.700 rpm) wurde der obere organische Überstand mittels Pasteurpipette abgenommen. Die Extraktion wurde mit 4 mL ACN wiederholt, die Überstände wurden vereint und mittels eines Stickstoffstroms bei 40 °C bis zur Trockene eingedampft. Abschließend wurde eine Probe in 200 μ L ACN und die zweite Probe in 200 μ L H₂O + 3 % FA aufgenommen. Von den Proben wurden ebenfalls 10 μ L entnommen und die Ausbeute mittels LSC überprüft. Der matrixfreie Ansatz mit ¹⁴C-Tyrosin dotiertem H₂O benötigte keine weitere Probenaufarbeitung.

3.2.1.2 Radio-UHPLC-HRMS-Messungen

Die Messung der Öl-Extraktionen erfolgte zunächst mittels flüssigchromatischer Trennung mit einer ZIC-HILIC-Säule. Die anschließende Detektion geschah unter Einsatz eines Radiodetektors und eines Orbitrap-Massenspektrometers. Die genauen Parameter sind in 3.1.1 beschrieben.

Zusätzlich erfolgte eine Messung der Proben mit einer C18-Säule (Acquity UPLC, Waters), um Abbauprodukte zu erfassen, die keine oder geringe Wechselwirkungen mit der zwitterionischen Phase der ZIC-HILIC aufweisen. Die chromatographischen Parameter sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Chromatographische Parameter für die Messung des ¹⁴C-Tyrosin-dotierten Rapsöls für die Erfassung der Abbauprodukte mit einer C18-Säule

UHPLC-System	Acquity Ultra Performance UHPLC, Waters Acquity Binary Solvent Manager Acquity Sample Manager Acquity Column Heater		
Trennsäule	Acquity UHPLC BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 100 mm, Waters		
Säulentemperatur	55 °C		
Injektionsvolumen	20 µL		
Flussrate	0,35 mL/min		
Mobile Phase (ESI positiv und negativ)	A H ₂ O:MeOH (95:5, v/v) + 5 mM NH ₄ Ac B MeOH + 5 mM NH ₄ Ac		
Gradient (ESI positiv und negativ)	Zeit [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
	0	100	0
	10	0	100
	13	0	100
	15	100	0
	16	100	0

Die Parameter für die Detektion mittels Radiodetektor und Massenspektrometrie sind in Kapitel 3.1.1 aufgelistet.

Der dotierte wässrige Ansatz wurde ebenfalls mit den in Tabelle 13 aufgeführten Parametern gemessen.

3.2.1.3 Identifizierung potenzieller Abbauprodukte

Um potenzielle Abbauprodukte identifizieren zu können, ist das spezifische Isotopenmuster des ¹⁴C-Standards von entscheidender Bedeutung. Mit der Software Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) wurden die Radio-UHPLC-Chromatogramme des ¹⁴C-Tyrosin-Standards ausgewertet und das spezifische Isotopenmuster berechnet. In Tabelle 14 sind die entsprechenden Summenformeln im ESI-positiven Modus mit der zugehörigen Masse und Intensität dargestellt. Die rechte Spalte stellt die normierten Intensitäten dar. Die Berechnung ist beispielhaft für das ¹⁴C₈-Isotop in der Gleichung

angegeben. Dabei wird die Fläche des $^{14}\text{C}_9$ -Isotops durch die Fläche des $^{14}\text{C}_8$ -Isotops geteilt und somit die normierte Intensität ermittelt. Die Berechnung der anderen ^{14}C -Isotope erfolgte auf dieselbe Weise.

$$\frac{238482}{193488} * 100 = 81,13$$

Tabelle 14: Isotopenmuster des ^{14}C -Tyrosin-Standards

Summenformel (ESI positiv)		Ion M+H (gemessene Masse)	Intensität (Fläche)	Intensität (normiert)
$^{14}\text{C}_9$	$\text{H}_{12} \text{N} \text{O}_3$	200,11045	238482	100,00
$^{14}\text{C}_8 \text{ } ^{12}\text{C}$	$\text{H}_{12} \text{N} \text{O}_3$	198,10724	193488	81,13
$^{14}\text{C}_7 \text{ } ^{12}\text{C}_2$	$\text{H}_{12} \text{N} \text{O}_3$	196,10402	85409	35,81
$^{14}\text{C}_6 \text{ } ^{12}\text{C}_3$	$\text{H}_{12} \text{N} \text{O}_3$	194,10076	27075	11,35
$^{14}\text{C}_5 \text{ } ^{12}\text{C}_4$	$\text{H}_{12} \text{N} \text{O}_3$	192,09755	6117	2,57
$^{14}\text{C}_4 \text{ } ^{12}\text{C}_5$	$\text{H}_{12} \text{N} \text{O}_3$	190,09413	346	0,15

Für die Suche nach dem spezifischen Isotopenmuster in den Proben wurde die Software Compound Discoverer (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Es handelt sich um eine qualitative Datenverarbeitung, bei der das Programm die Massenspektren nach spezifischen Isotopenmustern, die vom Benutzer vorgegeben werden, durchsucht [100]. Zuerst wird eine Schnellsuche durchgeführt, um die gewählten Parameter zu überprüfen und gegebenenfalls anzupassen. Die Parameter für die Schnellsuche der ^{14}C -Tyrosin-Proben sind in Tabelle 15 dargestellt. Das Programm registriert jene Massen, die das spezifische Isotopen-Muster aufweisen, addiert die Intensitäten und generiert daraus einen Peak.

Tabelle 15: Parametereinstellungen für die Software Compound Discoverer – Schnellsuche ¹⁴C-Tyrosin-Proben

Parameter	Einstellung	
Create Analog Trace	General Settings	
	Trace Type	Analog
	RT Offset [min]	0
	PDA Settings	
	Total Scan	False
	Spectrum Maximum	False
	Wavelength Range	True
	Min. Wavelength	190
	Min. Wavelength	800
Select Spectra	General Settings	
	Precursor Selection	Use MS(n-1) Precursor
	Provide Profile Spectra	Automatic
	Spectrum Properties Filter	
	Lower RT Limit	0
	Upper RT Limit	0
	First Scan	0
	Last Scan	0
	Lowest Charge State	0
	Highest Charge State	0
	Min. Precursor Mass	0 Da
	Max. Precursor Mass	5000 Da
	Total Intensity Threshold	0
	Minimum Peak Count	1
	Scan Event Filters	
	Min. Collision Energy	0
	Min. Collision Energy	1000
	Scan Type	any
	Peak Filters	
	S/N Threshold (FT-only)	1,5

Align Retention Times	General Settings	
	Alignment Model	Adaptive curve
	Maximum Shift [min]	2
	Mass Tolerance	5 ppm
Create Pattern Trace	General Settings	
	Isotope Ratios	custom pattern*
	Mass Tolerance	5 ppm
	Intensity Tolerance [%]	30
	MS Order	MS1
	Polarity	- /+
	Custom Label	14 C

In Tabelle 16 ist das spezifische Isotopenmuster (custom pattern*) für die Suche der unbekannt Abbauprodukte aufgeführt.

Tabelle 16: Spezifisches Isotopenmuster ¹⁴C-Tyrosin-Abbauprodukte

Massenverschiebung	Intensität [%]
0,00000	35,81
2,00321	81,13
4,00643	100,00

Nach dem Überprüfen der Parameter für die Schnellsuche kann eine erweiterte Suche nach unbekannt Abbauprodukten gestartet werden. Bei der erweiterten Suche werden von jenen Massen, die das spezifische Isotopenmuster aufweisen, Summenformelvorschläge generiert. Die Parameter der erweiterten Suche sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Parametereinstellungen für die Software Compound Discoverer – erweiterte Suche ¹⁴C-Tyrosin-Proben

Parameter	Einstellung	
Detect Compounds	General Settings	
	Mass Tolerance	5 ppm
	Intensity Tolerance	30
	S/N Threshold	3
	Min. Peak Intensity	1000
	Ions	[M+H] ⁺ +1; [M+K] ⁺ +1; [M+Na] ⁺ +1; [M-H] ⁻ -1
	Min. Element Counts	C [14]C H
	Max. Element Counts	C50 [14]C9 H100 N10 O10
Group Compounds	Compound Consolidation	
	Mass Tolerance	5 ppm
	RT Tolerance	0.2
	Preferred Ions	[M+H] ⁺ +1; [M-H] ⁻ -1
Predict Compounds	Prediction Settings	
	Mass Tolerance	5 ppm
	Min. Element Counts	C [14]C H
	Max. Element Counts	C50 [14]C9 H100 N10 O10
	Min. RDBE	0
	Max. RDBE	40
	Min. H/C	0.1
	Min. H/C	3.5
	Max. Candidates	10
	Pattern Matching	
	Intensity Tolerance [%]	30
	Intensity Threshold [%]	0.1
	S/N Threshold	3
	Use Dynamic Recalibration	True

Für die Strukturaufklärung wurden Erhitzungsexperimente mit ¹²C-Tyrosin durchgeführt. Dies ermöglichte es, wesentlich höhere Konzentrationen an Tyrosin

dotieren zu können. Dazu wurden 2 mL Rapsöl mit 50 µL einer 1 g/L ^{12}C -Tyrosin-Lösung (in H_2O) dotiert und die Probe wurde für 30 Minuten bei 170 °C erhitzt. Die Aufarbeitung der Probe erfolgte analog zu der des ^{14}C -Tyrosins (siehe Kapitel 0). Die Parameter für die Detektion mittels Massenspektrometrie sind in Kapitel 3.1.1 aufgelistet. Dabei wurden ein Full-MS und ein AIF-Spektrum (engl. all ion fragmentation) aufgenommen. Zusätzlich wurden ein t-SIM-Spektrum (engl. target-Single Ion Monitoring) und ein PRM-Fragment-Spektrum (engl. parallel reaction monitoring) aufgenommen. Mittels des t-SIM, bei dem ein eingegrenzter m/z-Bereich detektiert wird, kann eine höhere Empfindlichkeit erzielt werden [101]. Das Prinzip des PRM-Modus basiert darauf, dass die ausgewählten Vorläufer-Ionen durch den Quadrupol isoliert und in der hochenergetischen Kollisionsdissoziationszelle (HCD) fragmentiert werden. Die Fragment-Ionen werden dann im Orbitrap-Massenanalysator analysiert [102]. Die Parameter für die t-SIM- und PRM-Messung sind in Tabelle 18 eingetragen.

Tabelle 18: Parametereinstellungen für die HRMS-Messung der t-SIM- und PRM-Fragment-Daten

Massenspektrometer	Q Exactive™ Plus, Thermo Fisher Scientific	
Ionisationsquelle	Electrospray Ionisation (ESI)	
Software	Thermo Xcalibur 4.0.27.19	
Allg. Quellenparameter	Sheath gas flow rate	35
	Aux gas flow rate	10
	Sweep gas flow rate	2
	Spray voltage	3 kV
	Spray current [µA]	7,60 µA
	Capillary temperature	320 °C
	S-lens RF-level	55
	Aux gas heater temperature	350 °C
MS-Parameter	Allgemein	
	Polarity	positiv/negativ
	In-source-CID	0,0 eV
	t-SIM	
	scan range	50-400 m/z

Resolution	140 000	
AGC target	10 ⁶	
Max. injection time	200 ms	
Number of scans	1	
MSX count	3	
Isolation window	1,0 m/z	
PRM (MS2)		
Mass of fragments Ion M-H	¹⁴ C-Tyrsoin 318,11692 316,11368 314,11044	¹² C- Tyrsoin 300,08775
Resolution	10 000	
AGC target	10 ⁶	
Max. injection time	200 ms	
MSX count	3	
Isolation window	1,0 m/z	
Collision energy	Stepped NCE: 20, 35, 50	

Mittels der in Tabelle 18 aufgeführten Parameter wurden sowohl die Extrakte der ¹⁴C-Tyrosin-Öl als auch die ¹²C- Tyrosin-Öl und Leerwert-Proben der Erhitzungsexperimente vermessen. Um die Massenspektren nach charakteristischen Fragmenten zu durchsuchen wurde die Software Xcalibur genutzt.

Um weitere Strukturinformationen zu erhalten wurde eine induzierte In-Source-Fragmentierung von der extrahierten ¹⁴C-Tyrosin Öl-Probe durchgeführt. Dabei werden bereits in der ESI-Quelle Fragmente gebildet, um anschließend in der hochenergetischen Kollisionsdissoziationszelle weiter fragmentiert zu werden [103]. Die In-Source-CID (engl. collision induced dissociation) wurde dabei auf 40 eV eingestellt. Die erhaltenen Fragment-Spektren konnten anschließend mit der Datenbank des NIST (National Institute of Standards and Technology) verglichen werden.

In einem weiterführenden Experiment wurden 6 mL Rapsöl für 30 Minuten bei 170 °C erhitzt und 6 mL Rapsöl, ohne Erhitzung, mit der in Kapitel 3.1.3.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet. Die Proben konnten anschließend mit der in Tabelle 18 eingetragenen Parameter vermessen werden.

3.2.2 ALA

Um den Verbleib von ALA bei einem simulierten Frittier-Prozess zu untersuchen, wurde mit ^{14}C -ALA dotiertes Rapsöl in einem geschlossenen Glas-Vial erhitzt. Dazu wurden in einer Doppelbestimmung jeweils 2 g Rapsöl in ein 10 mL-Headspace-Vial eingewogen und 15 μL einer 670 kBq/mL-Stammlösung zugegeben. Die Proben wurden in einem Umluftbackofen für 30 und 60 Minuten bei 170 °C erhitzt. Zusätzlich wurden entsprechende Leerwertproben, bestehend aus nicht-dotiertem Öl, erhitzt.

Um eine vollständige Bilanzierung zu ermöglichen, wurden die Öl-Proben vor der Extraktion mittels LSC vermessen. Dazu wurden in einem 6 mL-LSC-Vial 950 μL Aceton vorgelegt und 50 μL des dotierten Öls zugegeben. Die Vials wurden mit 4 mL LSC-Cocktail Ultima Gold™ versetzt, verschlossen, kurz geschüttelt und per LSC vermessen. Für die Extraktion wurde eine QuEChERS-Extraktion genutzt. Dazu wurden die Probe mit 4 mL ACN und 2 mL H_2O vermischt und 2 g QuEChERS-Salze (DisQuE™ Citrat Mix) zur Phasentrennung zugegeben. Anschließend wurden die Proben für 20 Minuten auf einem Vortex-Mixer geschüttelt. Nachfolgend wurden die Proben für 10 Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert und für mindestens drei Stunden bei -20 °C eingefroren. Nach erneuter Zentrifugation (5 Minuten, -10 °C, rpm) wurde der obere organische Überstand mittels Pasteurpipette abgenommen. Die Ausbeute des Extrakts wurde mittels LSC überprüft. Die Extraktion wurde mit 4 mL ACN wiederholt, die Überstände vereint und ebenfalls mittels LSC überprüft. Mittels eines Stickstoffstroms bei 40 °C wurden die Proben bis zur Trockene eingedampft. Abschließend wurden die Proben in 200 μL MeOH:H₂O (50:50, v/v) gelöst. Von den Proben wurden ebenfalls 10 μL entnommen und die Ausbeute mittels LSC überprüft.

3.2.3 Aspartam

Mit dem ^{14}C -Aspartam wurden verschiedene Erhitzungsversuche durchgeführt um die Stabilität zu untersuchen und potentielle Abbauprodukte zu identifizieren. Diesbezüglich mussten geeignete Methoden zur Extraktion des ^{14}C -Aspartams und dessen Abbauprodukten entwickelt werden. Für die Untersuchung der Abbauprodukte wurden ein UHPLC-System mit zwischengeschaltetem Radiodetektor und ein IMS-QToF sowie ein Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap™ als Massenspektrometer verwendet.

3.2.3.1 Radio-UHPLC-HRMS-Methodenentwicklung

Um potenzielle Abbauprodukte zu untersuchen, wurde das Aspartam als ^{14}C -markierte Substanz erworben. Das ^{14}C -Aspartam trägt die radioaktive Markierung im Phenylring. Wichtige Daten zum radioaktiven Standard sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: spezifische Daten zu ^{14}C -Aspartam

Spezifische Daten	
Markierung	[Phenylalanin- ^{14}C (U)]
Lösungsmittel	Ethanol: H ₂ O (50:50, v/v)
Spezifische Aktivität	100 mCi/mmol

Um potenzielle Abbauprodukte untersuchen zu können, musste im ersten Schritt eine Radio-UHPLC-HRMS-Methode entwickelt und optimiert werden. Die Methodenentwicklung wurde an der VION IMS QTOF (Waters) durchgeführt und konnte auf die Q Exactive™ Plus (Thermo Fisher Scientific) übertragen werden. Als Trennsäule wurde eine C18-Säule gewählt. An der Vion IMS QTOF konnte, neben der häufig eingesetzten ESI, die UniSpray™-Ionisation verglichen werden. Beide Quellen zeichnen sich durch eine weiche Ionisierung aus, können sich aber abhängig von Analyt, Probenmatrix und Fließmittel in ihrer Empfindlichkeit unterscheiden. Aufgrund der einfacheren Handhabung wurde die für die finale Methode die ESI-Quelle gewählt. Die chromatographischen Parameter der finalen Methode sind in Tabelle 20 eingetragen.

Tabelle 20: Chromatographische Parameter für die entwickelte ¹⁴C-Aspartam-Methode mit einer C18-Säule

UHPLC-System	Acquity Ultra Performance UHPLC, Waters Acquity Binary Solvent Manager Acquity Sample Manager Acquity Column Heater		
Trennsäule	Acquity UHPLC BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 100 mm, Waters		
Säulentemperatur	55 °C		
Injektionsvolumen	10 µL		
Flussrate	0,35 mL/min		
Mobile Phase (ESI positiv und negativ)	A MeOH + 5 mM NH ₄ AC		
	B H ₂ O + 5 mM NH ₄ AC		
Gradient (ESI positiv und negativ)	Zeit [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
	0	95	5
	10	0	100
	22	0	100
	22,1	95	5
	25	95	5

Die Spezifikationen des Radiodetektors sind in Tabelle 6 aufgeführt. In Tabelle 21 und Tabelle 22 sind die HRMS-Parameter für die Untersuchung der potenziellen Abbauprodukte an der VION IMS QTOF bzw. an der Orbitrap Q Exactive™ Plus eingetragen.

Tabelle 21: HRMS-Parameter für die Untersuchung der potenziellen Abbauprodukte des Aspartams an der Vion IMS QTOF

Massenspektrometer	Vion IMS QToF, Waters	
Ionisationsquelle	Electrospray Ionisation (ESI)	
Software	Waters UNIFI	
Allg. Quellenparameter	Analyzer Mode	Sensitivity
	Capillary Voltage	0,5 kV
	Source Temperature	120 °C
	Desolvation Temperature	450 °C
	Cone gas flow	50 l/h
	Desolvation gas flow	650 l/h
MS-Parameter	Scan Parameter	
	Experiment	HDMS _e
	Scan time	0,15 s
	Mass Range	50–1000 m/z
	Collision low energy	6 eV
	Collision high energy ramp	15–40 eV

Tabelle 22: HRMS-Parameter für die Untersuchung der potenziellen Abbauprodukte des Aspartams an der Orbitrap Q Exactive™ Plus

Massenspektrometer	Q Exactive™ Plus, Thermo Fisher Scientific	
Ionisationsquelle	Electrospray Ionisation (ESI)	
Software	Thermo Xcalibur 4.0.27.19	
Allg. Quellenparameter	Sheath gas flow rate	35
	Aux gas flow rate	10
	Sweep gas flow rate	2
	Spray voltage	3 kV
	Spray current [μ A]	7,60 μ A
	Capillary temperature	320 °C
	S-lens RF-level	55
	Aux gas heater temperature	350 °C
MS-Parameter	Allgemein	
	Polarity	Positiv / negativ
	In-source-CID	0,0 eV
	FulIMS	
	scan range	60–750 m/z
	Resolution	70 000
	AGC target	10^6
	Max. injection time	200 ms
	Number of scans	1
	AIF	
	scan range	60–750 m/z
	Resolution	70 000
	AGC target	10^6
	Max. injection time	200 ms
	Collision energy	Stepped NCE: 20, 35, 50

3.2.3.2 Erhitzungsversuch Kleingebäck

Zur Untersuchung des Verbleibs von Aspartam während eines Back-Prozesses wurde ein Teig mit ^{14}C -Aspartam dotiert und erhitzt. Für den Teig wurden 30 g Mehl und 20 g Butter zu einer homogenen Masse verknetet. Anschließend wurden zu 12,2 g Teig 200 μL einer ^{14}C -Aspartam-Stammlösung (1046,4 kBq/mL) zu dotiert. Um die Aktivität des Kleingebäcks nach dem Backen zu bestimmen, wurden in einer Dreifach-Bestimmung je 50 mg Teig eingewogen und mittels Oxidizer vermessen.

Für den Backversuch wurde der Teig in eine runde Form gebracht und bei 175 °C für 15 Minuten gebacken. Zusätzlich wurde eine Leerwert-Probe angefertigt, bestehend aus dem Teig ohne dotiertes Aspartam. Dieser Versuch wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Um die Trockenmasse bzw. den Gewichtsverlust bestimmen zu können, wurden die Proben nach dem Erhitzen und Abkühlen gewogen.

Für die Extraktion der Abbauprodukte aus dem Gebäck wurde zunächst der Teig in einem PP-Röhrchen (50 mL) mithilfe eines Spatels homogenisiert. Nachfolgend wurde jeweils 1 g eingewogen. Die Löslichkeit des Aspartams ist abhängig von der Wahl des Lösungsmittels, des Wasseranteils und des pH-Wertes. Aspartam zeigt die beste Löslichkeit bei pH 2,2 in einer binären Mischung aus Methanol und Wasser [52]. Aus diesem Grund wurde für die Extraktion 1 g Teig eingewogen und es wurden 10 mL MeOH/H₂O (50:50, v/v) mit 1 % FA als Lösungsmittel hinzugegeben. Der pH-Wert dieser binären Mischung wurde überprüft und lag bei 2. Die Proben wurden anschließend für 20 Minuten geschüttelt und für 10 Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert. Um das durch die Butter enthaltene Fett abzuscheiden, wurden die Proben für zwei Stunden bei -20 °C eingefroren und nachfolgend bei -10 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Dadurch konnte die organisch-wässrige Phase abgenommen und die Aktivität mittels LSC überprüft werden. Die Extraktion und die Bestimmung der Aktivität mittels LSC wurden zweimal wiederholt. Anschließend wurden die organisch-wässrigen Phasen vereinigt und unter Stickstoffstrom bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 200 μL MeOH/ H₂O (50:50, v/v) gelöst. Von den finalen Proben wurden 10 μL für die Bestimmung der Aktivität entnommen und mittels LSC überprüft.

Um mögliche unpolare Abbauprodukte zu extrahieren, wurde als zweite Extraktionsmethode eine QuEChERS angewandt. Zu 1 g homogenisierten Teig

wurden 5 ml H₂O hinzugegeben. Dieser wurde nachfolgend mittels einem Vortex-Schüttler für 30 s suspendiert. Anschließend wurden 5 mL ACN zugeführt, 1 Minute auf einem Vortex-Mixer geschüttelt und etwa 2 g eines vorgefertigten, Citrat-gepufferten QuEChERS-Mixes hinzugefügt. Die Proben wurden für 20 Minuten geschüttelt, 10 Minuten bei 4.700 rpm zentrifugiert und zwei Stunden bei -20 °C eingefroren. Anschließend wurden die Proben bei -10 °C für 10 Minuten zentrifugiert und die organische Phase abgenommen. Die Aktivität wurde mittels einer LSC-Messung überprüft. Die Extraktion und Bestimmung der Radioaktivität wurden ein weiteres Mal wiederholt. Die Extrakte wurden anschließend vereinigt und unter Stickstoffstrom abgedampft. Der Rückstand wurde in 200 µL MeOH/H₂O (50:50, v/v) gelöst und ebenfalls mittels einer LSC-Messung untersucht. Von den finalen Proben wurden 10 µL für die Bestimmung der Aktivität entnommen und mittels LSC überprüft.

3.2.3.3 Erhitzungsversuch Rapsöl

Um den Einfluss eines Frittier-Prozesses auf den Verbleib von Aspartam zu untersuchen, wurde Rapsöl mit ¹⁴C-Aspartam dotiert und erhitzt. Hierfür wurden 2 g Rapsöl in ein HSGC-Vial eingewogen und mit 20 µL einer ¹⁴C-Aspartam Stammlösung (1046,4 kBq/mL) versetzt. Daraus resultierte eine Gesamtaktivität pro Vial von 20,9 kBq. Die Proben wurden bei 170 °C und 190 °C für jeweils 15, 30 und 60 Minuten in einem Konvektomaten erhitzt. Mit jeder radioaktiv markierten Probe wurde eine Leerwert-Probe, bestehend aus Rapsöl ohne ¹⁴C-dotiertes Aspartam, angefertigt. Nach dem Erhitzen und Abkühlen wurden die Proben für die weitere Analytik in ein 15 mL-PP-Röhrchen überführt. Im ersten Schritt wurde die Aktivität mittels LSC bestimmt. Hierfür wurden 980 µL Aceton in ein LSC-Vial vorlegt, 20 µL der Öl-Probe hinzu pipettiert und mit 4 mL UltimaGold™ versetzt.

Im ersten Schritt wurden zur Öl-Probe 4 mL MeOH/H₂O (50:50, v/v) hinzugegeben und diese für 20 Minuten geschüttelt. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten zentrifugiert (4.700 rpm). Der organisch-wässrige Überstand konnte abgenommen und die Aktivität mittels LSC bestimmt werden. Der organisch-wässrige Extraktionsschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt und es wurde ebenfalls die Aktivität bestimmt. Anschließend wurden die vereinigten Überstände unter Stickstoffstrom abgedampft. Der Extrakt wurde nachfolgend in 200 µL MeOH/H₂O (50:50, v/v) gelöst und die

Aktivität dieser Lösung mittels LSC bestimmt. Dazu wurden 10 µL entnommen und vermessen.

Mit dem Öl-Rückstand wurde anschließend eine QuEChERS-Extraktion durchgeführt. Hierfür wurden 2 mL H₂O dem Öl hinzugeben und für 30 s auf einen Vortex-Mixer geschüttelt. Zu der Suspension wurden 4 mL ACN zugegeben und ebenfalls für 30 s geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 g eines vorgefertigten, Citratgepufferten QuEChERS-Mixes. Die Proben wurden für 20 Minuten geschüttelt, abzentrifugiert (10 Minuten bei 4.700 rpm) und für 2 Stunden bei -20 °C eingefroren. Im Anschluss wurden die Proben bei -10 °C für 10 Minuten zentrifugiert, die organische Phase abgenommen und die Aktivität mittels einer LSC-Messung überprüft. Die QuEChERS-Extraktion und Überprüfung der Aktivität wurden ein weiteres Mal wiederholt. Die Proben wurden anschließend unter Stickstoffstrom bis zur Trockene abgedampft und der Rückstand in 200 µL MeOH/H₂O (50:50, v/v) gelöst. Die finalen Proben wurden ebenfalls auf ihre Aktivität mittels LSC-Messung untersucht. Hierfür wurden 990 µL MeOH in einem LSC-Vial vorgelegt, 10 µL des Extraktes hinzugegeben und mit 4 mL LSC-Cocktail Aquasafe 500+ versetzt. Nach der Extraktion wurden die Öl-Rückstände ebenfalls mittels LSC vermessen. Dazu wurden 900 µL Aceton in einem LSC-Vial vorgelegt, 100 µL des Öl-Rückstandes hinzugegeben und mit 4 mL LSC-Cocktail SuperSolveX versetzt.

3.2.3.4 Erhitzungsversuch Kaffee

Ziel des Versuches war es, die Stabilität von Aspartam in einem Heißgetränk (Kaffee) zu untersuchen, um somit Rückschlüsse auf die Verwendung von Aspartam als Süßungsmittel in Kaffee zu erlangen. Wichtig war hierbei die realitätsnahe Durchführung. Hierzu wurden in einem Zentrifugenröhrchen 10 mL aufgebrühter Kaffee in einem Wasserbad von 200 mL zum Kochen gebracht. Unmittelbar nach dem Kochen wurde die Heizquelle entfernt und es wurden 100 µL der ¹⁴C-Aspartam-Stammlösung (1046,4 kBq/mL) hinzugegeben und zum Auskühlen gestellt. Ein Aliquot von 1 mL wurde entnommen, abzentrifugiert (10 Minuten bei 4.700 rpm) und in ein LC-Vial überführt. Mittels LSC wurde die Aktivität der Probe überprüft. Hierfür wurden 900 µL H₂O in einem LSC-Vial vorgelegt, 100 µL der Probe hinzugegeben und mit 4 mL LSC-Cocktail Aquasafe 500+ versetzt.

Um zu untersuchen, ob das Erhitzen in einer Mikrowelle einen Einfluss auf die Stabilität von Aspartam hat, wurde das Experiment erneut durchgeführt. Hierfür wurden 5 mL Kaffee gewählt und mit 100 μL der ^{14}C -Aspartam-Stammlösung dotiert. Nach dem Auskühlen wurde 1 mL Kaffee entnommen. Die restlichen 4 mL Kaffee verblieben im Zentrifugenröhrchen und wurden zum Abkühlen in einem Erlenmeyerkolben mit 150 mL H_2O gestellt. Die Probe wurde anschließend für 40 s bei 1.000 Watt in einer Mikrowelle erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben zentrifugiert (10 Minuten bei 4.700 rpm) und mittels LSC vermessen.

3.2.3.5 Identifizierung potenzieller Abbauprodukte

Die gewonnenen Extrakte aus den Erhitzungsexperimenten wurden mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen, um mögliche Abbauprodukte zu identifizieren. Die Parameter für die Messung sind Kapitel 3.2.1 zu entnehmen.

Um potenzielle Abbauprodukte identifizieren zu können, musste im ersten Schritt das spezifische Isotopenmuster des ^{14}C -Aspartam-Standards ermittelt werden. Hierzu wurde ein ^{14}C -Aspartam-Standard mit einer Aktivität von 25 kBq/mL in MeOH/ H_2O (50:50, v/v) hergestellt und mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen. Die Suche nach dem spezifischen Isotopenmuster in den Proben wurde mit dem Programm Compound Discoverer durchgeführt. Die Parameter für die Schnellsuche entsprachen denen der Tabelle 15. Das spezifische Isotopenmuster (custom pattern*) für die Suche der unbekanntenen Abbauprodukte ist in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23: spezifisches Isotopenmuster Aspartam

Massenverschiebung	Intensität [%]
0,00000	100
2,00321	85,2
4,00643	33,5

Die Parameter für die erweiterte Suche wurden entsprechend angepasst und sind in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Parametereinstellungen Compound Discoverer – erweiterte Suche ¹⁴C-Aspartam

Parameter	Einstellung	
Detect Compounds	General Settings	
	Mass Tolerance	5 ppm
	Intensity Tolerance	30
	S/N Threshold	3
	Min. Peak Intensity	1000
	Ions	[M+H] ⁺ +1; [M+K] ⁺ +1; [M+Na] ⁺ +1; [M-H] ⁻ -1
	Min. Element Counts	C [14]C H
	Max. Element Counts	C50 [14]C H100 N10 O10
Group Compounds	Compound Consolidation	
	Mass Tolerance	5 ppm
	RT Tolerance	0.2
	Preferred Ions	[M+H] ⁺ +1; [M-H] ⁻ -1
Predict Compounds	Prediction Settings	
	Mass Tolerance	5 ppm
	Min. Element Counts	C [14]C H
	Max. Element Counts	C50 [14]C H100 N10 O10
	Min. RDBE	0
	Max. RDBE	40
	Min. H/C	0.1
	Min. H/C	3.5
	Max. Candidates	10
	Pattern Matching	
	Intensity Tolerance [%]	30
	Intensity Threshold [%]	0.1
	S/N Threshold	3
	Use Dynamic Recalibration	True

Identifizierung und Quantifizierung des Abbauproduktes DKP

Anhand der Software Compound-Discoverers konnte eine Summenformel für das Abbauprodukt P2, (2S-cis)-(-)-5-Benzyl-3,6-Dioxo-2-Piperazin-Essigsäure (DKP), gefunden werden. Dieses Abbauprodukt ist in der Literatur beschrieben und konnte somit als Standardsubstanz bestellt werden. Mit dem DKP wurde eine Standardlösung von 100 µg/L in MeOH/H₂O (50:50, v/v) hergestellt und mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen. Um die Identifizierung zu bestätigen, wurden zu einer finalen ¹⁴C-Aspartam-Teig-Probe nachträglich 100 µL der DKP-Stammlösung mit 100 µg/L hinzudotiert und ebenfalls mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen.

Um die Menge des gebildeten Abbauproduktes zu bestimmen, wurde mit einer Matrix-matched-Kalibrierung eine Quantifizierung durchgeführt. Dazu wurde eine Teig-Leerwert-Probe aufgearbeitet. Vor dem Abdampfen der Proben unter Stickstoffstrom wurden definierte Volumina einer DKP-Standardlösung hinzudotiert. Die Herstellung der Matrix-matched-Kalibrierung ist in Tabelle 25 dargestellt. Die Proben wurden anschließend in 200 µL MeOH/H₂O (50:50, v/v) gelöst und mittels UHPLC-HRMS gemessen.

Tabelle 25: Herstellung der Matrix-matched-Kalibrierung für das Abbauprodukt DKP

Zielkonzentration [µg/L]	Konzentration Stammlösung [µg/L]	Zugesetztes Volumen [µL]	Endvolumen nach Eindampfen [µg]	Zugesetzte Menge [µg]
200	100	400	200	0,04
400	100	800	200	0,08
600	100	1200	200	0,12
800	100	1600	200	0,16
1000	100	2000	200	0,2

Aus der dadurch generierten linearen Kalibriergeraden und Peakflächen der Injektionslösungen konnte auf die Menge des gebildeten DKPs im Kleingebäck rückgeschlossen werden.

Fragmentierungsexperimente

Mit dem Programm Compound Discoverer konnte für das unbekannte Abbauprodukt eine Summenformel generiert werden. Dieser Vorschlag wurde mittels Unifi (Vion-IMS-Q-TOF) und Xcalibur (Thermo) bestätigt. Des Weiteren wurde nach den dazugehörigen Isotopenmustern gesucht und die Leerwert-Probe auf das Nichtvorhandensein dieser Massen überprüft. Da es sich um ein unbekanntes Abbauprodukt handelt und somit kein Standard zur Identifizierung vorlag, wurden gezielte Fragmentierungsexperimente durchgeführt.

Für die Strukturaufklärung wurden zusätzliche Erhitzungsexperimente mit ^{12}C -Aspartam durchgeführt um wesentlich höhere Mengen an der Substanz einsetzen zu können. Dazu wurden zu 2 mL Rapsöl 50 μL einer ^{12}C -Aspartam-Lösung (1 g/L, in H_2O) hinzudotiert und die Probe wurde ebenfalls für 30 Minuten bei 170 °C erhitzt. Die Aufarbeitung der Probe erfolgte analog zu der des ^{14}C -Aspartams (siehe Kapitel 3.2.3.3). Die Parameter für die Detektion mittels Radiodetektor und Massenspektrometrie sind in Kapitel 3.2.3.1 aufgelistet. Dabei wurde, neben dem Full-MS, auch ein AIF aufgenommen. Zusätzlich wurden ein t-SIM-Spektrum und ein PRM-Fragment-Spektrum aufgenommen. Die Parameter für die t-SIM- und PRM-Messung sind in Tabelle 26 eingetragen.

Tabelle 26: Parameter für die Fragmentierungsexperimente im PRM, t-SIM-Modus der ¹⁴C-Aspartam-extrahierten Öl-Proben

Massenspektrometer	Q Exactive™ Plus, Thermo Fisher Scientific			
Ionisationsquelle	Electrospray Ionisation (ESI)			
Software	Thermo Xcalibur 4.0.27.19			
Allg. Quellenparameter	Sheath gas flow rate	35		
	Aux gas flow rate	10		
	Sweep gas flow rate	2		
	Spray voltage	3 kV		
	Capillary temperature	320 °C		
	S-lens RF-level	55		
	Aux gas heater temperature	350 °C		
MS-Parameter	Allgemein			
	Polarity	positiv/negativ		
	In-source-CID	0,0 eV		
	t-SIM			
	Target mass	m/z pos	m/z pos	
		295,1289	293,1143	
		250,1073	248,0928	
	Resolution	140 000		
	AGC target	10 ⁶		
	Max. injection time	200 ms		
	Number of scans	1		
	MSX count	3		
	Isolation window	1.0 m/z		
	PRM (MS2)			
	Resolution	140 000		
	AGC target	10 ⁶		
	Max. injection time	200 ms		
MSX count	3			
Isolation window	1.0 m/z			
Collision energy	Stepped NCE: 20,35,50			

Mittels der in Tabelle 26 aufgeführten Parameter wurde ein Fragment-Spektrum von den ^{14}C -Aspartam-Öl, ^{12}C -Aspartam-Öl und Leerwert-Proben aufgenommen, um durch den Vergleich dieser Spektren Hinweise auf die Struktur zu erlangen.

3.2.3.6 Erhitzungsversuche wässriger Lösungen

Um die Stabilität des Aspartam-Moleküls während eines Koch-Prozesses zu untersuchen, wurden Erhitzungsexperimente in Wasser durchgeführt. Im ersten Schritt wurde eine Extrapolation durchgeführt, um zu bestimmen, wie viel Wasser bei einer Temperatur von $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Zeit verdunstet. Dazu wurden jeweils $8\text{ mL H}_2\text{O}$ in Pyrex-Gläschen pipettiert, verschlossen und für 30 Minuten, 60 Minuten, 90 Minuten, 120 Minuten und 180 Minuten in einem Konvektomaten erhitzt. Aus den daraus gewonnenen Ergebnissen wurden 10 Ansätze bestehend aus $8000\text{ }\mu\text{L H}_2\text{O}$ mit $25\text{ }\mu\text{L}$ ($1.046,4\text{ kBq/mL}$) ^{14}C -Aspartam hergestellt. Die Proben wurden in einem Konvektomaten bei 130°C gestellt und nach 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 jeweils eine Probe entnommen.

Nach dem Erhitzen wurde das Volumen der einzelnen Proben mit H_2O auf $500\text{ }\mu\text{L}$ eingestellt. Um die Aktivität zu bestimmen, wurde eine LSC-Messung durchgeführt. Dazu wurden jeweils $900\text{ }\mu\text{L H}_2\text{O}$ in ein LSC-Vial vorgelegt, $10\text{ }\mu\text{L}$ der Probe hinzugegeben und mit $4\text{ mL LSC-Cocktail Aquasafe 500+}$ versetzt. Die Proben wurden anschließend mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen.

In einem weiteren Versuch wurde die Stabilität des Aspartam-Moleküls während eines Koch-Prozesses in einer sauren wässrigen Lösung untersucht. Hintergrund dieses Experiments war es, eine Cola Light Matrix zu simulieren. Dazu wurde eine H_3PO_4 -Lösung mit $17\text{ mg/100 mL H}_2\text{O}$ hergestellt mit einem pH-Wert von 3. Dies entspricht dem H_3PO_4 -Gehalt von Cola [104]. Der Probenansatz und die Durchführung entsprechen dem Koch-Prozess. Abweichend davon wurde statt H_2O in diesem Experiment $\text{H}_2\text{O}+\text{H}_3\text{PO}_4$ verwendet. Die Proben wurden ebenfalls mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen. Für die Identifizierung eines neuen Abbauproduktes wurde der entsprechende Standard, L-Phenylalanin-Methylester, bestellt. Es wurde eine Lösung von 2 mg/L L-Phenylalanin-Methylester in $\text{H}_2\text{O}+\text{H}_3\text{PO}_4$ angesetzt und mittels

UHPLC-HRMS vermessen. Durch Abgleich der Retentionszeiten konnte das Abbauprodukt identifiziert werden.

Letztlich wurde die Stabilität von Aspartam über 24 Stunden bei unterschiedlichen Temperaturen in einer $\text{H}_2\text{O}+\text{H}_3\text{PO}_4$ -Lösung untersucht. Dazu wurden jeweils 500 μL $\text{H}_2\text{O}+\text{H}_3\text{PO}_4$ (pH 3) in ein Pyrex-Gläschen pipettiert und 25 μl (1.046,43 kBq/mL) ^{14}C -Aspartam hinzudotiert. Die Proben wurden anschließend für 24 Stunden bei 20 °C, 40 °C und 60 °C gelagert und mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen.

Identifizierung des Abbauproduktes P3 mittels NMR

Bei dem Stabilitätsversuch in H_2O zeigte sich bei einer Retentionszeit von ca. drei Minuten ein unbekanntes Abbauprodukt. Da mittels der Software Compound Discoverer hierfür kein Summenvorschlag gemacht werden konnte, wurden NMR-Messungen durchgeführt, um die Struktur aufzuklären. Im ersten Schritt musste eine geeignete Methode entwickelt werden, um ausreichende Mengen der isolierten Zielsubstanz zu erhalten.

Dazu wurden Versuche angefertigt um das gewünschte Abbauprodukt mittels SPE aufzureinigen. Hierfür wurden 8 mL H_2O mit 100 μL ^{14}C -Aspartam (1.046,43 kBq/mL) dotiert und auf 180 °C erhitzt. Anschließend wurde ein Volumen von 2 mL eingestellt. Mit dieser Probe konnten anschließend unterschiedliche SPE-Kartuschen getestet werden, um das Abbauprodukt zu isolieren. Nachfolgend kamen die Kartuschen von Phenomenex (Strata X- Polymeric Reverse Phase, 200 mg, 6 mL) und Waters (HLB-Prime, 500 mg) mit Umkehrphasen-Material zum Einsatz. Hierfür wurden die Kartuschen mit jeweils 3 mL H_2O konditioniert und 250 μL der Probe in wässriger Lösung aufgetragen. Anschließend wurde mit 6 mL Wasser mit jeweils um 5 % steigendem Methanol-Anteil gespült, jede Fraktion einzeln aufgefangen und mittels Radio-UHPLC-HRMS gemessen. Ein weiterer Ansatz war die Auftrennung der einzelnen Abbauprodukte anhand unterschiedlicher funktioneller Gruppen. Hier wurde als Anionen-Austauscher die Oasis MAX (Waters – mixed mode Anion eXchange, 500 mg)-Kartusche verwendet. Dafür wurden 250 μL der Probe mit 2 mL H_2O + 5 % NH_4OH verdünnt. Die Kartusche wurde mit 3 mL H_2O + 5 % NH_4OH konditioniert, nachfolgend wurde die Probe aufgetragen. Es folgte ein Waschschrift mit 6 mL H_2O +

5 % NH₄OH. Für die Elution wurden 6 mL MeOH verwendet und anschließend MeOH + 2 % FA. Die Fraktionen wurden einzeln gesammelt und mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen. Das Pendant zur Oasis MAX ist der Kationen-Austauscher Oasis MCX (Waters – mixed mode cation eXchange, 500 mg). Für die Oasis MCX-Kartusche wurden 200 µL der Probe in 2 mL H₂O + 2 % FA verdünnt. Die Kartusche wurde mit 3 mL H₂O + 2 % FA konditioniert und anschließend aufgetragen. Es folgte ein Waschschrift mit 6 mL H₂O + 2 % FA. Für die Elution wurden 6 mL MeOH verwendet sowie anschließend MeOH + 5 % NH₄OH. Die Fraktionen wurden einzeln gesammelt und mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen.

Als Alternative zur Aufreinigung mittels SPE wurde versucht, eine HPLC- mit Fraktionssammler zu nutzen. Im ersten Schritt wurde die entwickelte Methode mittels der UHPLC-Säule (Waters Acquity C18) an eine HPLC-Säule (Phenomenix-Luna C18) zu übertragen. Als HPLC Anlage diente hierbei das UltiMate 3000 HPLC System (ThermoFisher Scientific). Hierfür wurden die Parameter aus Tabelle 20 übernommen und das Injektionsvolumen auf 50 µL erhöht. Verunreinigungen und Salze führen zu einer Überlagerung der NMR-Signale, wodurch dieselbe Methode ohne NH₄Ac angewandt werden musste. Um eine chromatographische Trennung der einzelnen Abbauprodukte zu erzielen, wurde eine Messung mit Ameisensäure angesäuertem Fließmittel durchgeführt. Dazu wurde mittels Ameisensäure ein pH-Wert von 6 in beiden Fließmitteln eingestellt. Ebenfalls wurde dieselbe chromatographische Trennung mittels Ammoniakwasser mit einem pH-Wert von 8 untersucht. Zuletzt wurde mit derselben Methode und den Variationen aus angesäuerten und basischen Fließmittel eine Trennung mit einer C8-Säule (Phenomenix-Luna C8) untersucht.

Als alternativer Ansatz wurde die erhitzte Probe mit den drei Abbauprodukten ohne weitere Aufreinigung mittels NMR gemessen. Dazu wurden 10-mal 100 µL einer 1 mg/mL ¹²C-Aspartam-Standardlösung (Lösungsmittel H₂O) mit 8 mL H₂O versetzt. Zusätzlich wurden 10 µL einer ¹⁴C-Aspartam-Standardlösung mit 100 kBq hinzudotiert und die Proben für drei Stunden bei 130°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben vereinigt und bis zur Trockene abgedampft. Die vollständig getrocknete Probe wurde in 25 µL Dimethylsuloxid-d6 gelöst und in ein NMR-Messröhrchen überführt.

An einem 700 MHz-NMR-Spektroskop (Brucker Ascend™ 700 NMR) wurden folgende eindimensionale Versuche durchgeführt: ^1H , ^{13}C und DEPT-135 (distortionless enhancement by polarization transfer 135). Des Weiteren wurden zweidimensionale NMR Spektren aufgenommen: COSY (correlation spectroscopy), TOCSY (total correlation spectroscopy), HSQC (heteronuclear single quantum coherence) und HMBC (heteronuclear multiple bond correlation).

3.2.4 Chemikalien und Geräte

Die in diesem Versuchsteil verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 27 aufgelistet.

Tabelle 27: Liste der verwendeten Chemikalien für die Untersuchungen von ^{14}C -Substanzen in Lebensmittelverarbeitungsprozessen

Chemikalien	Hersteller	Spezifikation
^{14}C -L-Tyrosin	ARC	Radiochem. Reinheit: 99,1% Spezif. Aktivität: 480 mCi/mmol
^{14}C - α -Linolensäure	ARC	Radiochem. Reinheit: 99,8% Spezif. Aktivität: 55,6 mCi/mmol
^{14}C -Aspartam	ARC	Radiochem. Reinheit: 99,8% Spezif. Aktivität: 100 mCi/mmol
Aspartam	Sigma Aldrich	Analytical Standard Chem. Reinheit 99,8 %
Aceton, zur Rückstandsanalyse	Th. Geyer, Chemsolute®	> 99,8 %
Acetonitril	Th. Geyer, Chemsolute®	> 99,8 %
Ameisensäure	Thermo Fisher Chemicals	LC-MS Grade
Ammoniumacetat, LC-MS	Sigma Aldrich	>99,0 %
Aquasafe 500+	Zinsser Analytik	k.A

Butter	Ja, Gut von Holstein GmbH	k.A
Deuteriumoxid	Deutero GmbH	Chem. Reinheit 99,9 %
Instant Kaffeepulver – Espresso	Jacobs	k.A
Mehl, Weizen	Ja, Friesinger Mühle GmbH	Typ 450
Methanol, LC-MS	Th. Geyer, Chemsolute®	> 99,95 %
QuEChERS Citrat Mix DisQuE	Waters	0,5 g NaSesquihydrat, 1 g NaCitrat/1 g NaCl/4g MgSO ₄
Rapsöl	Huilerie Bio, Bram, Frankreich	Bio-Rapsöl nativ; Ernte 2019
Supersolve-X (LSC)	Zinsser Analytic	k.A.
L-Tyrosin	Sigma Aldrich	Analytical Standard Chem. Reinheit 99,8 %
UHQ-Wasser	Purelab Ultra system (ELGA)	≥ 18,2 MΩ/cm ²
Ultima Gold™	Perkin Elmer	k.A
Ultima Gold™ LTT	Perkin Elmer	k.A
Wasser, LC-MS	Th. Geyer, Chemsolute®	k.A

Des Weiteren sind alle Geräte und Verbrauchsmaterialien, die in diesem Versuchsteil verwendet wurden, in Tabelle 28 und Tabelle 29 aufgelistet.

Tabelle 28: Liste der verwendeten Geräte für die Untersuchungen von ¹⁴C-Substanzen in Lebensmittelverarbeitungsprozessen

Geräte	Hersteller/Modell
Feinwaage	Mettler Toledo AX 204 Delta Range
Kolbenhubpipette	Eppendorf
Konvektomat	Convotherm OES mini

Liquid Scintillation Counter	Hidex 600 SL
Liquid Scintillation Counter	Tricarb 2500 TR
Multischüttler	IKA Vibrax VXR basic
Oxidizer	Zinsser OX 700
Schüttelbank	Gerhardt Laboshake LS 500
Schüttler	IKA Vortex 4 basic
Stickstoffverdampfer	Biotage TurboVap LV
Totvolumenpipette	Gilson
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Super RK digital
Waage	Sanatorius L420 P+
Zentrifuge	VWR Megastar 1.6 R
Zentrifuge	VWR Microstar 12

Tabelle 29: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien für die Untersuchungen von ¹⁴C-Substanzen in Lebensmittelverarbeitungsprozessen

Artikel	Hersteller
Braunglas 1,5 mL, Kurzgewinde	Lab Logistics Group
HSGC Vial 20 mL und Schraubdeckel	WICOM
LSC – Vial 6 mL, 20 mL	Sarstedt
Mikroinsert 300 µL	Klaus Trott GmbH
Mikroreaktionsgefäß 1,5 mL	Eppendorf
Pasteurpipetten	Labsolute Th. Greyer
pH-Teststreifen pH Fix 0–6	Macherey Nagel
Pipettenspitze 100 µL	Starlab Tip One
Pipettenspitze 1.000 µL	Greiner Bio-One
Pipettenspitze 5 mL	Mettler Toledo
Pipettenspitze (Totvolumen frei): 10 µL, 50 µL	Gilson
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 15 mL	Greiner Bio-One
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 50 mL	Sarstedt
Pyrexgläschen	Wicom GmbH
Schraubkappen für 1,5 mL Kurzgewinde	Klaus Trott GmbH
Weißglas, 1,5 mL	Lab Logistics Group

4 Ergebnisse

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Untersuchungen des Verbleibs von ^{14}C -Tyrosin und ^{14}C -ALA nach der Verdauung dargestellt. Anschließend folgt die Schilderung der Ergebnisse der Lebensmittelverarbeitungsprozesse. Dabei wurden die beiden Lebensmittelinhaltsstoffe nach einem Erhitzungsexperiment untersucht. Ebenso wurde der Süßstoff Aspartam nach verschiedenen Erhitzungsexperimenten in unterschiedlichen Lebensmittelmatrices analysiert.

4.1 Verbleib von Lebensmittelinhaltsstoffen nach der Verdauung

Um den Verbleib von Tyrosin und ALA nach der Verdauung zu untersuchen, wurde eine Fütterungsstudie mit Schweinen durchgeführt. Den Schweinen wurden die ^{14}C -markierten Substanzen verabreicht, um sie mithilfe von Radio-Detektionsverfahren analysieren zu können. Als Minimalwert der Aktivität wurde in den Proben ein Wert von 1 kBq/g anvisiert. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass das Detektionslimit des Radiodetektors von 20 Bq pro Metabolit überschritten wird. Die Fütterungsstudie wurde in Australien an der Monash University durchgeführt und die Proben wurden anschließend für die Analyse nach Deutschland gesendet.

4.1.1 Tyrosin

Für die Detektion der Abbauprodukte wurde eine Radio-UHPLC-HRMS-Methode für das Tyrosin entwickelt. Als Trennsäule diente hier eine ZIC-HILIC. Abbildung 17 zeigt repräsentativ das Chromatogramme der finalen Methode. Dargestellt sind die Massenspuren des $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ions des ^{12}C -Tyrosin-Isotops (schwarz) und des ^{14}C -Tyrosin-Isotops (rot).

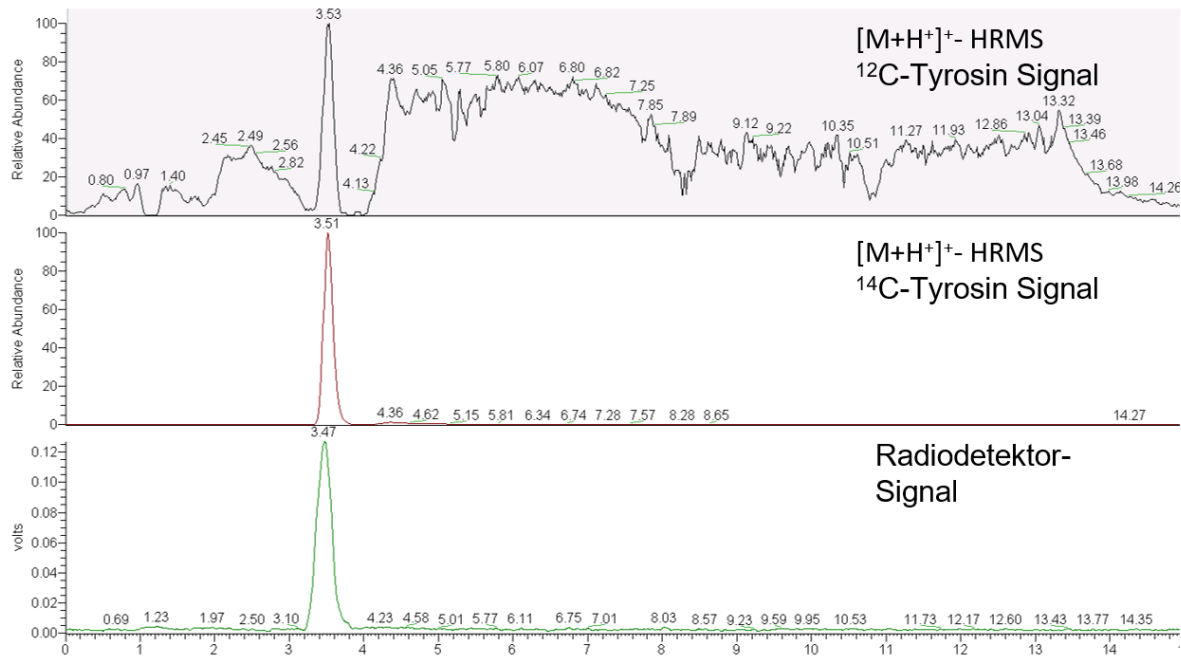


Abbildung 17: Massenspur des ¹²C- und ¹⁴C-Tyrosins sowie das Radio-Chromatogramm des ¹⁴C-Tyrosins

Bei 3,5 min sind deutliche schmale Peaks erkennbar. Der grüne Peak stellt das Radio-UHPLC-Chromatogramm des ¹⁴C-Tyrosins dar. Die Kalibriergerade ist im Anhang (Abbildung 56) dargestellt.

Der Verbleib von ¹⁴C-Tyrosin wurde in den Matrices Plasma, Darm, Gehirn und Exkrementen untersucht. Aufgrund der zu niedrigen Aktivitäten, weit unter dem Mindestwert von 1 kBq/g, wurden aufwendige Methoden entwickelt um eine Aufkonzentrierung zu erzielen (siehe Tabelle 43).

4.1.1.1 Tyrosin in der Matrix Plasma

Für die Entwicklung der Extraktionsmethode wurde Schweineplasma von der Kontrollgruppe (nicht-radioaktiv) genommen und die ¹⁴C-Tyrosin-Standardlösung hinzudotiert. Als Methode wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit MeOH + 5 % FA gewählt und es erfolgte die anschließende Reinigung mit Hexan, um mögliche Lipide zu entfernen. Mittels einer HLB-Prime-SPE konnten Matrix-Bestandteile entfernt werden. Die angesäuerte Methanol-Extraktion zeigte eine Wiederfindungsrate von $96,2 \pm 3,7 \%$. In der Hexan-Phase wurde keine Aktivität detektiert. Nach

anschließender HLB-Prime-SPE wurde eine Wiederfindungsrate von $89 \pm 2,9 \%$ bestimmt.

Für die Radioaktivität der ^{14}C -Tyrosin-Plasma-Probe der Fütterungsstudie wurde mittels LSC ein Wert von $0,49 \text{ kBq/g} \pm 0,3$ bestimmt. Dieser Wert wurde als Ausgangswert für die Wiederfindungsrate angenommen. Mit der entwickelten Methode wurde, auf Grund der geringen Probenmenge, in einer Einfachbestimmung 1 mL Plasma des ^{14}C -Tyrosin-Schweines aufgearbeitet. Die Extraktion mit MeOH + 5 % FA lieferte eine Wiederfindungsrate von 35 %, bezogen auf die insgesamt enthaltene Radioaktivität von $0,49 \text{ kBq/g}$. Nach der anschließenden Hexan-Reinigung wurde keine Aktivität gefunden. Das Eluat der nachfolgenden HLB-Prime-SPE zeigte eine Wiederfindungsrate von 28,3 %. Die Probe wurde unter Stickstoff bis zur Trockene abgedampft und in 200 μL MeOH + 3 % FA gelöst. Die Aktivität in der finalen Probe zeigte eine Wiederfindungsrate von 12 %.

Um Informationen bezüglich des Verbleibs der restlichen 65 % an Aktivität zu erlangen, wurde der verbliebene Rückstand in H_2O + 5 % FA gelöst. Hier zeigte sich eine Wiederfindungsrate von 64 %. Anschließend wurde mit dem Rückstand nach der wässrigen Extraktion eine Protein-Präzipitation mit ACN durchgeführt. In der ACN-Phase wurde keine Aktivität gefunden.

Die Bilanzierung der Aktivität von der angesäuerten methanolischen und wässrigen Extraktion ergab einen Wert von 98,7 %. Von der methanolischen Extraktion gingen 6,7 % mittels HLB-Prime-SPE verloren. Bei den restlichen 16 % handelte es sich um potentiell flüchtige Metabolite, die beim Eindampfen unter Stickstoffstrom verloren gegangen sind oder nicht mehr gelöst werden konnten. Bei den verbleibenden 12 % handelt es sich um in Methanol lösliche Metabolite. Mittels Protein-Präzipitation wurde der verbleibende Anteil der Aktivität bestimmt. Bei diesem Anteil handelt es sich um in Protein gebundenes ^{14}C -Tyrosin. Um zu überprüfen, ob das ^{14}C -Tyrosin selbst mittels ACN gefällt werden kann, wurde ein Experiment mit nicht-radioaktivem Plasma und dem hinzudotierten radioaktiven Standard durchgeführt. Der ACN-Überstand zeigte eine Wiederfindungsrate von 100 %. Somit konnte gezeigt werden, dass freies Tyrosin nicht durch die Protein-Präzipitation ACN gefällt werden kann. Die Bilanzierung der Aktivität ist zur Übersicht in Abbildung 18 dargestellt.

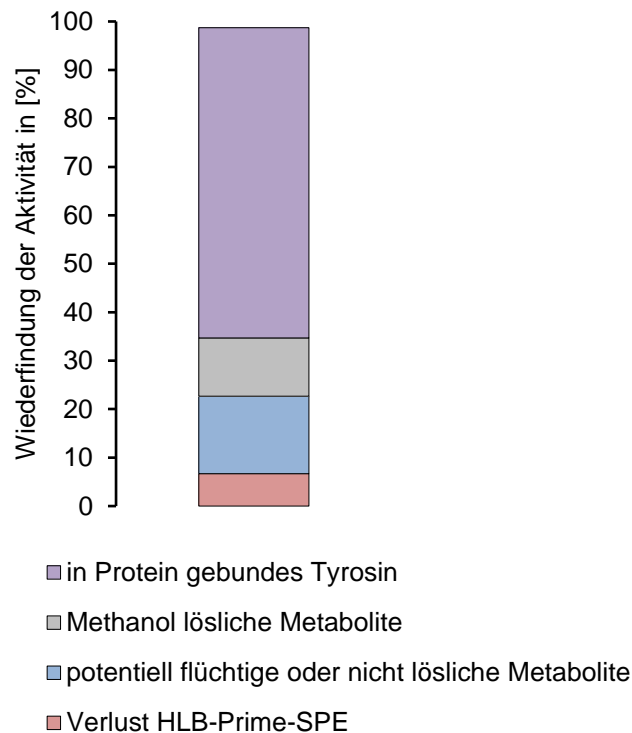


Abbildung 18: Bilanzierung der Aktivität der untersuchten ^{14}C -Tyrosin Plasma Probe

Die Probe der angesäuerten Methanol-Extraktion wurde mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen. Aufgrund der zu niedrigen Aktivität in der Probe (6 Bq/20 μL Injektionsvolumen) wurde kein Radio-Peak erfasst.

4.1.1.2 Tyrosin in der Matrix Darm

Für die Entwicklung der Extraktionsmethode wurde nicht-radioaktiver Schweinedarm aus der Kontrollgruppe homogenisiert und die ^{14}C -Tyrosin-Standardlösung hinzudotiert. Als Methode wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit MeOH + 5 % FA gewählt und eine anschließende Reinigung mit Hexan durchgeführt, um mögliche Lipide zu entfernen. Die angesäuerte Methanol-Extraktion zeigte eine Wiederfindungsrate von $98,2 \pm 4,1$ %. In der Hexan-Phase wurde keine Aktivität detektiert. Nach anschließender HLB-Prime-SPE wurde eine Wiederfindungsrate von $86 \pm 2,3$ % bestimmt.

Die Aktivität der ^{14}C -Darm-Probe aus der Fütterungsstudie wurde mittels eines Oxidizers bestimmt. Hierfür ergab sich ein Wert von 0,7 kBq/g. Dieser Wert diente als Ausgangswert für die Bestimmung der Wiederfindung. Mit der entwickelten Methode

wurde in einer Dreifachbestimmung je 1 g homogenisierter Darm aus der Fütterungsstudie aufgearbeitet. Die Extraktion mit MeOH + 5 % FA lieferte eine Wiederfindungsrate von $39,4 \pm 6,2$ %. Mittels der anschließenden Hexan-Reinigung wurde keine Aktivität bestimmt. Das Eluat der nachfolgenden HLB-Prime-SPE zeigte eine Wiederfindungsrate von $29,5 \pm 6,2$ %. Die Proben wurden unter Stickstoff bis zur Trockene abgedampft und in 200 μ L MeOH + 3 % FA gelöst und der Überstand abgenommen. Die Aktivität in den finalen Proben zeigte eine Wiederfindungsrate von $4,2 \pm 1,2$ %. Die verbliebenen Rückstände wurden in H₂O + 5 % FA gelöst. Hier zeigte sich eine Wiederfindungsrate von $32,8 \pm 5,7$ %. Nachfolgend wurde eine Protein-Präzipitation mit ACN durchgeführt. In der ACN-Phase wurden $29,6 \pm 5,3$ % an Aktivität gefunden. Die verbliebenen Rückstände wurden nach der Trocknung mittels eines Oxidizers verbrannt. In den Rückständen wurde eine Aktivität von $19,7 \pm 4,6$ % gefunden. Die Bilanzierung der Extraktion der Darm-Probe ist in Abbildung 19 dargestellt.

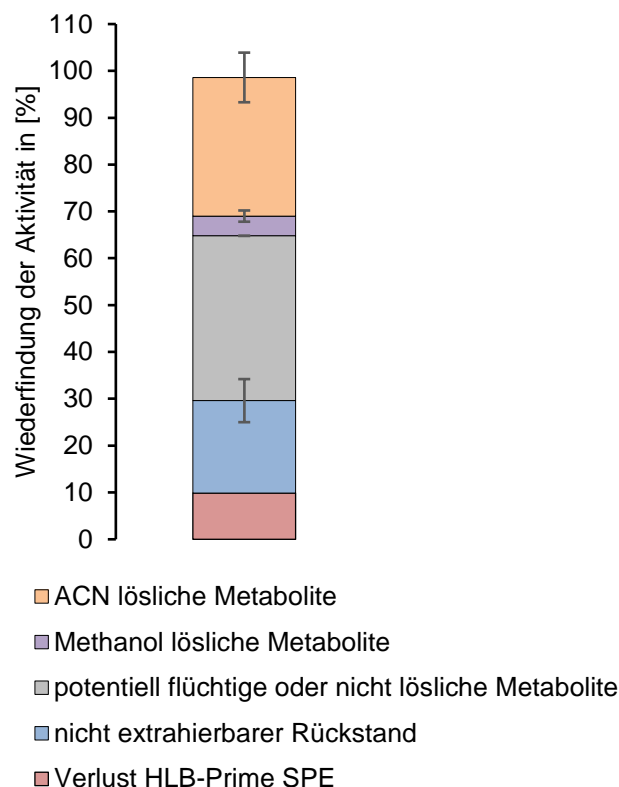


Abbildung 19: Bilanzierung der untersuchten ¹⁴C-Tyrosin Darm Proben

Mittels der MeOH- und ACN-Extraktionen konnten 72,2 % der Aktivität wiedergefunden werden. Von der methanolischen Extraktion sind 35,2 % potenziell flüchtige Metabolite, die beim Eindampfen unter Stickstoffstrom verlorengegangen sind oder sich anschließend nicht mehr gelöst haben. Bei den restlichen 4,2 % handelt es sich um in Methanol lösliche Metabolite. In der ACN-Phase wurden 29,6 % der Aktivität wiedergefunden. Hierbei handelt es sich um Metabolite, die nicht in MeOH löslich sind und auch nicht in Proteinen gebunden vorliegen, da sie nicht gefällt werden konnten.

Die Proben der angesäuerten Methanol-Extraktion wurden mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen. Aufgrund der zu niedrigen Radioaktivität in den Proben (2,8 Bq/20 µl Injektion) wurde kein Radio-Peak erfasst. Die ACN-Extrakte konnten durch die vorhandene Trübung nicht vermessen werden.

4.1.1.3 Tyrosin in der Matrix Cerebellum

Die Methodenentwicklung wurde mit einer Cerebellum-Probe aus der Kontrollgruppe durchgeführt und die ¹⁴C-Tyrosin-Standardlösung hinzudotiert. Die Extrakte der angesäuerten methanolischen Extraktion zeigten eine Wiederfindungsrate von $94,5 \pm 4,3$ %. Mit anschließender HLB-Prime-SPE wurde eine Aktivität von $87,2 \pm 6,4$ % bestimmt. Aufgrund der Amino-Funktionalität des Tyrosins und der vermuteten Neurotransmitter wurde anschließend eine MCX-SPE, basierend auf einem Kationenaustausch, durchgeführt. Mit dieser konnte eine Wiederfindungsrate von $82,5 \pm 5,1$ % bestimmt werden. Des Weiteren konnten die drei Aufarbeitungen zu einer vereint werden, sie wiesen keine Trübung auf. Mit dieser Methode war es möglich, insgesamt 3 g Cerebellum zu extrahieren und die eingeeengten Extrakte in insgesamt 200 µl MeOH + 5 % FA zu resuspendieren.

Die Aktivität der ¹⁴C-Tyrosin-Cerebellum-Probe aus der Fütterungsstudie wurde mittels eines Oxidizers bestimmt. Hierfür ergab sich ein Wert von 0,6 kBq/g. Mit der entwickelten Methode wurden in einer Dreifachbestimmung je 1 g aus der Fütterungsstudie aufgearbeitet. Die Extraktion mit MeOH + 5 % FA lieferte eine Wiederfindungsrate von $3,5 \pm 1,2$ %, bezogen auf die insgesamt enthaltene Radioaktivität von 0,6 kBq/g. Aufgrund der geringen Ausbeute wurde keine weitere

Aufarbeitung mit diesen Extrakten vorgenommen. Mit dem Rückstand wurde eine ACN-Extraktion durchgeführt. In diesen Extrakten wurde keine Aktivität gefunden. Die getrockneten Rückstände wurden mit einem Oxidizer verbrannt und es wurde eine Wiederfindungsrate von $94,5 \pm 3,7$ % bestimmt.

Mittels der angesäuerten methanolischen Extraktion und Verbrennung der Rückstände konnte die gesamte Aktivität wiedergefunden und bilanziert werden. Bei der Radio-UHPLC-HRMS-Messung wurde aufgrund der geringen Aktivität kein Radiopeak detektiert.

4.1.1.4 Tyrosin in der Matrix Exkremente

Die Entwicklung der Extraktionsmethode wurde mit Exkrement-Proben der Kontrollgruppe durchgeführt, da diese die Matrix am besten repräsentieren. Als Methode wurde eine Fest-Flüssig-Extraktion mit MeOH + 5 % FA sowie eine anschließende Reinigung mit Hexan gewählt, um mögliche Lipide zu entfernen. Die angesäuerte Methanol-Extraktion zeigte eine Wiederfindungsrate von $94,7 \pm 5,6$ %. In der Hexan-Phase wurde keine Aktivität detektiert. Nach anschließender HLB-Prime-SPE wurde eine Wiederfindungsrate von $86,3 \pm 3,7$ % bestimmt.

Die Aktivität der Exkrement-Probe aus der Fütterungsstudie wurde mit einem Oxidizer bestimmt. Hierfür ergab sich ein Wert von 15,9 kBq/g. Mit der entwickelten Methode wurden in einer Dreifachbestimmung je 1 g Exkrement-Probe aus der Fütterungsstudie aufgearbeitet. Die Extraktion mit MeOH + 5 % FA lieferte eine Wiederfindungsrate von $36,7 \pm 2,3$ %. Mit der anschließenden Hexan-Reinigung wurde keine Aktivität gefunden. Um Matrix-Bestandteile zu entfernen, wurde eine HLB-Prime-SPE durchgeführt. Das Eluat mit H₂O + 5 % FA zeigte eine Wiederfindungsrate von $3,5 \pm 1,8$ %. Um die verbliebene Aktivität aus der HLB-Prime-Kartusche zu eluieren, wurden weitere Waschschrte mit höherem Methanol-Anteil durchgeführt. Die Wiederfindungsraten der einzelnen Elutionsmittel sind in Tabelle 30 dargestellt.

Tabelle 30: Wiederfindungsraten der HLB-Eluate von den ^{14}C -Tyrosin Exkrement-Proben

Elutionsmittel	Wiederfindungsrate
H ₂ O + 5 % FA	3,5 ± 1,8 %
H ₂ O:MeOH (80:20, v/v)	2,1 ± 0,7 %
H ₂ O:MeOH (50:50, v/v)	19,3 ± 2,8 %
MeOH	7,6 ± 1,1 %
Gesamt	32,5 % ± 2,4 %

Die höchste Aktivität zeigte sich in dem Eluat H₂O:MeOH (50:50, v/v) mit 19,3 ± 2,8 %. Insgesamt konnten von der HLB 32,5 ± 2,4 % an Aktivität wiedergefunden werden. Die Proben wurden unter Stickstoffstrom bis zur Trockene abgedampft und in 200 µL MeOH + 3 % FA gelöst. In den finalen Proben wurde eine Wiederfindungsrate von 25,4 ± 1,6 % nachgewiesen. Die Proben wiesen eine sehr dunkle, aber klare Färbung auf und konnten mittels Radio-UHPLC-HRMS gemessen werden. Repräsentativ ist ein Radio-Chromatogramm der Dreifachbestimmung in Abbildung 20 dargestellt. Die Aktivität pro 20 µL Injektionsvolumen betrug 397 Bq.

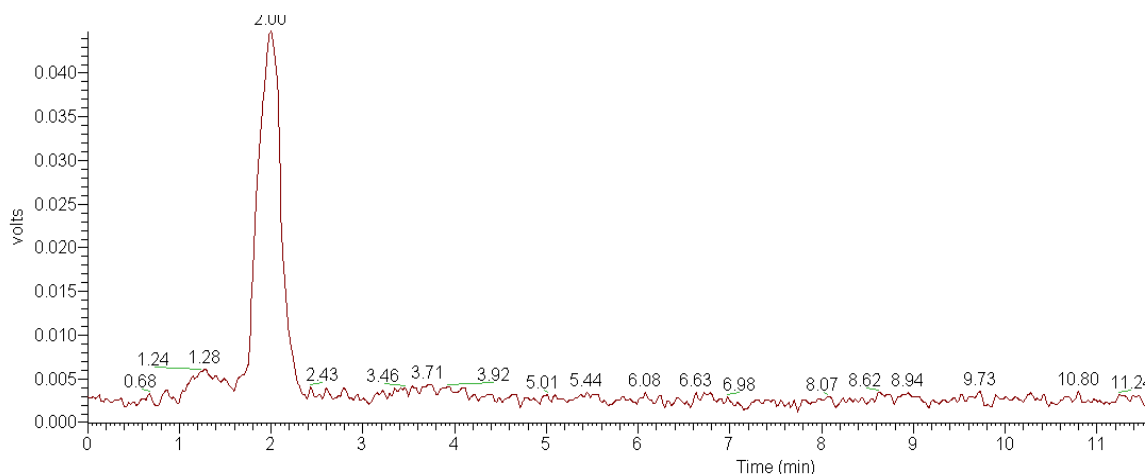


Abbildung 20: Radio-Chromatogramm der extrahierten Exkrement-Probe eines ^{14}C -Tyrosin Schweins

Bei einer Retentionszeit von zwei Minuten ist ein deutlicher Peak zu erkennen. Das ^{14}C -Tyrosin weist eine Retentionszeit von 3,5 Minuten auf. Somit handelt es sich bei dem Radio-Peak um einen Metaboliten des ^{14}C -Tyrosins. Die Proben wurden mit der Software Compound Discoverer ausgewertet und nach dem spezifischen

Isotopenmuster des ^{14}C -Tyrosins (siehe Tabelle 16) durchsucht. Sowohl die Schnellsuche als auch die erweiterte Suche lieferte keine Massen und Summenformelvorschläge für den unbekannteten Metaboliten.

Um Informationen bezüglich der verbliebenen Aktivität zu erlangen, wurde mit dem Probenrückstand eine saure Hydrolyse durchgeführt und dieser anschließend ebenfalls mit der entwickelten Methode aufgearbeitet. Mittels der angesäuerten Methanol-Extraktion konnten $51,6 \pm 5,6 \%$ an Aktivität gefunden werden. In dem Hexan-Überstand wurde keine Aktivität gemessen. Anschließend wurde eine HLB-Prime-SPE durchgeführt. Die Wiederfindungsraten der einzelnen Elutionsmittel sind in Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31: Wiederfindungsraten der HLB-Eluate von den ^{14}C -Tyrosin Exkrement-Proben nach saurer Hydrolyse

Elutionsmittel	Wiederfindungsrate
H ₂ O + 5 % FA	19,1 ± 2,5 %
H ₂ O:MeOH (80:20, v/v)	10,3 ± 1,2 %,
H ₂ O:MeOH (50:50, v/v)	7,9 ± 1,4 %,
MeOH	3,8 ± 0,8%,
Gesamt	41,1 % ± 1,1 %

Die höchste Wiederfindungsrate zeigte sich bei der Elution mit H₂O + 5 % FA mit $19,1 \pm 2,1 \%$. Die Proben wurden unter Stickstoff bis zur Trockene abgedampft und in 200 µL MeOH + 3 % FA gelöst. In den finalen Proben wurde eine Wiederfindungsrate von $32,2 \pm 2,6 \%$ nachgewiesen. Die Proben wiesen eine sehr dunkle, aber klare Färbung auf und konnten mittels Radio-UHPLC-HRMS gemessen werden. Repräsentativ ist ein Radio-Chromatogramm in Abbildung 21 dargestellt. Die Aktivität pro 20 µL Injektionsvolumen betrug 651 Bq.

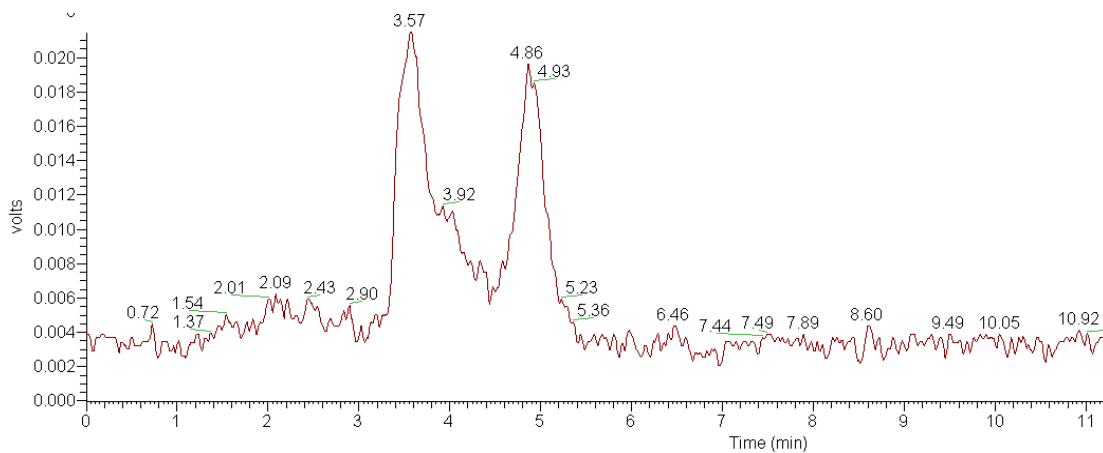


Abbildung 21: Radio-Chromatogramm der extrahierten Exkrement-Probe eines ^{14}C -Tyrosin Schweins nach saurer Hydrolyse

Bei 3,5 und 4,8 Minuten sind deutliche Peaks erkennbar. Die Proben wurden mit dem Programm Compound Discoverer analysiert. Der Peak bei 3,5 Minuten konnte als ^{14}C -Tyrosin identifiziert werden. Bei dem Peak bei 4,8 handelt es sich um einen Metaboliten des Tyrosins mit höherer Polarität. Für diesen Metaboliten lieferte sowohl die Schnellsuche als auch die erweiterte Suche mittels dem Programm Compound Discoverer keinen Massen und Summenformelvorschlag.

Für die vollständige Bilanzierung wurden die Rückstände mittels eines Oxidizers verbrannt. Als nicht-extrahierbare Rückstände wurden $21,2 \pm 6,9\%$ bestimmt. Der größte Anteil an Aktivität wurde nach der sauren Hydrolyse mit $51,6 \pm 5,6\%$ gemessen. Bei diesem Anteil handelte es sich um gebundenes ^{14}C -Tyrosin. Die angesäuerte Methanol-Extraktion lieferte eine Wiederfindungsrate von $32,5\% \pm 2,4\%$. In Abbildung 22 ist der Vergleich der Eluate der HLB-Prime-SPE nach der MeOH + 5 % FA Extraktion und der Eluate der HLB-Prime-SPE nach der Sauren Hydrolyse dargestellt.

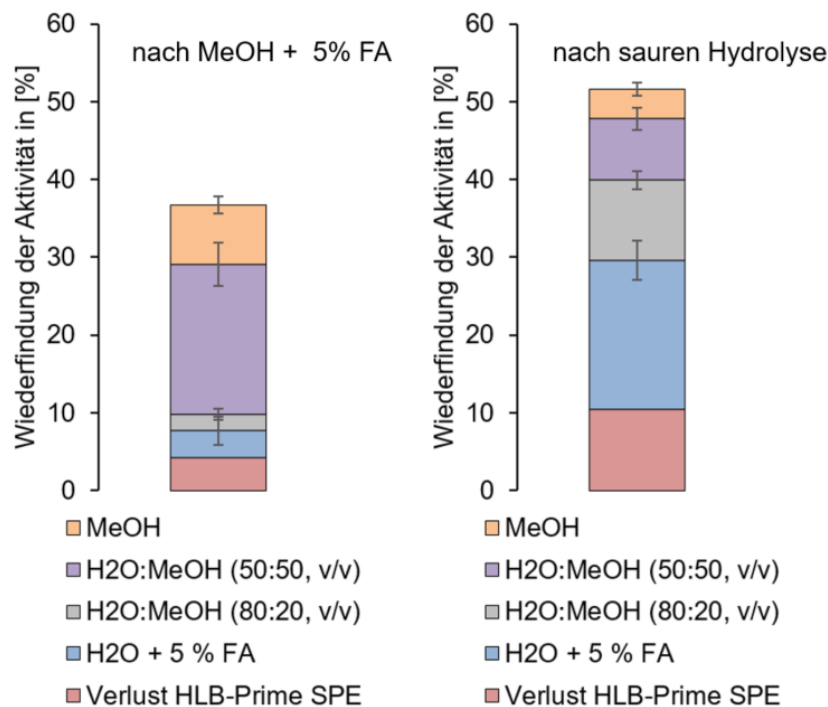


Abbildung 22: Vergleich der HLB-Prime-SPE Eluate der ¹⁴C-Tyrosin Exkrement Proben nach der MeOH + 5 % FA Extraktion und MeOH + 5 % FA Extraktion nach sauren Hydrolyse

Die anfängliche MeOH + 5 % FA Extraktion zeigte die höchste Wiederfindung bei der Extraktion mit H₂O:MeOH (50:50/ v/v). Hingegen zeigte sich nach der sauren Hydrolyse die höchste Wiederfindung bei der Elution mit H₂O + 5 % FA. Diese Beobachtung wird mittels der gefunden Radiopeaks untermauert. Der Radiopeak in Abbildung 20 repräsentiert einen Metaboliten mit verringerter Polarität und zeigt mittels der ZIC-HILIC Säule eine geringere Retention auf. In dem Radio-Chromatogramm von der sauren Hydrolyse wurde ein Peak bei 3,5 min dem ¹⁴C-Tyrsoin zugeordnet. Ein weiterer Peak bei 4,9 min stellt einen Metaboliten mit erhöhter Polarität dar.

Mit den angewandten Extraktions-Methoden konnten Radio-Peaks von den ¹⁴C-Tyrosin Exkrement Proben detektiert werden. Dennoch war eine Identifizierung der Metabolite nicht möglich, da keine Summenformelvorschläge generiert werden konnten.

4.1.2 ALA

Für die Detektion der Abbauprodukte wurde im ersten Schritt eine UHPLC-HRMS-Methode für die ALA entwickelt. Als Trennsäule diente hierbei eine C18-Säule. Abbildung 23 zeigt zur Zuordnung der Retentionszeit die Massenspur des $[M-H]^-$ Ions des ^{12}C -ALA-Isotops (schwarz) und des ^{14}C -ALA-Isotops (rot).

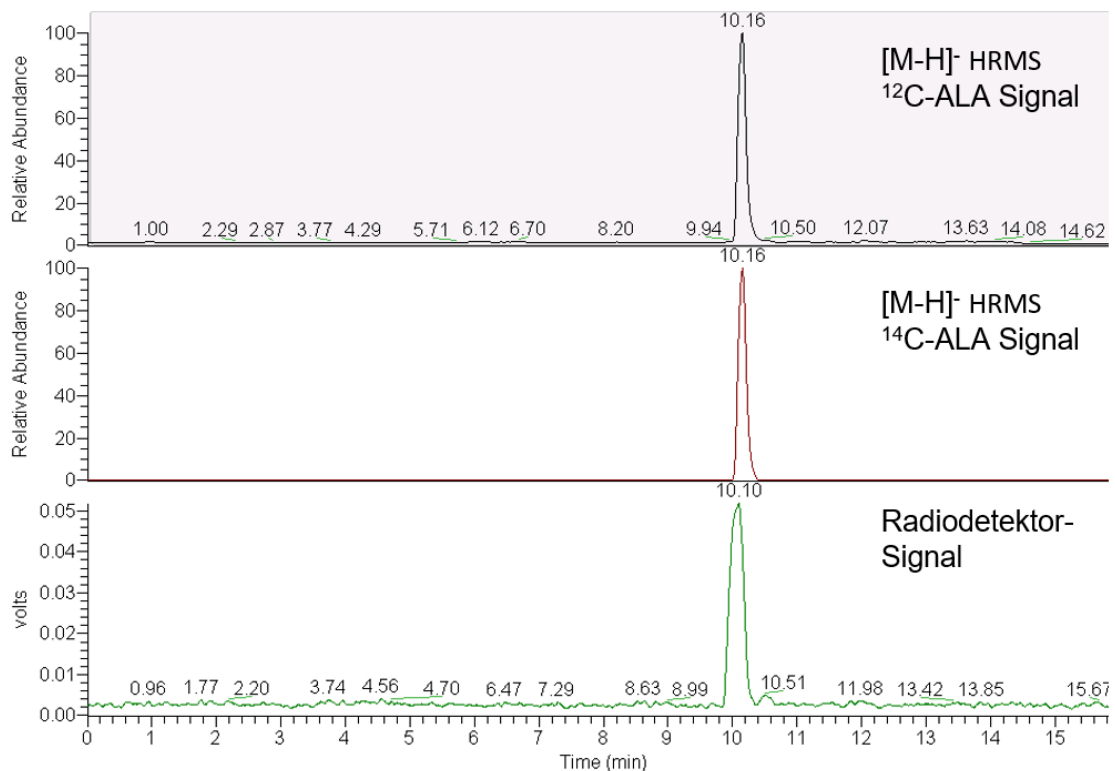


Abbildung 23: Massenspur des ^{12}C - und ^{14}C -ALA sowie das Radio-Chromatogramm des ^{14}C -ALA-Standards

Bei 10,1 min sind deutliche schmale Peaks erkennbar. Der grüne Peak stellt das Radio-UHPLC-Chromatogramm der ^{14}C -ALA dar.

Der Verbleib von ^{14}C -ALA wurde in den Matrices Leber und Exkrementen untersucht. Aufgrund der sehr geringen Aktivität in den Proben mussten die meisten Matrices vorher ausgeschlossen werden (siehe Tabelle 43 im Anhang). In den nachfolgenden Abschnitten sind die Ergebnisse der Extraktionsversuche dargestellt.

4.1.2.1 ALA in der Matrix Leber

Für die Entwicklung der Extraktionsmethode wurde Schweineleber aus der Kontrollgruppe homogenisiert und die ^{14}C -ALA-Standardlösung hinzudotiert. Als Methoden wurden eine Fest-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat und QuEChERS-Extraktion gewählt. Das Ziel der Methodenentwicklung war es, 1 g Probe in 100 μL $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (50:50, v/v) zu lösen. Die Ethylacetat- und QuEChERS-Extraktion zeigten eine Wiederfindungsrate von $96,4 \pm 5,6 \%$. Die Proben wurden abgedampft und in 100 μL $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (50:50, v/v) gelöst. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 rpm konnte ein klarer Überstand abgenommen werden. Die Ausbeute der finalen Probe betrug $85,4 \pm 4,3 \%$.

Die Aktivität in den ^{14}C -Leber-Proben wurde mittels eines Oxidizers bestimmt. Hierfür ergab sich ein Wert von 0,24 kBq/g. Mit der entwickelten Methode wurden in einer Dreifachbestimmung je 1 g homogenisierte Leber aus der Fütterungsstudie aufgearbeitet. Aufgrund der sehr geringen Aktivitäten wurden die Proben in 100 μL $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (50:50, v/v) resuspendiert. Die Extraktion lieferte eine Wiederfindungsrate von $49,2 \pm 2,9 \%$, bezogen auf eine insgesamt enthaltene Radioaktivität von 0,24 kBq/g. Die Proben wurden mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen. Die Aktivität in den Proben belief sich auf $26,9 \pm 1,4$ Bq pro 20 μl Injektionsvolumen. Aufgrund der zu geringen Aktivität wurde kein Radiopeak detektiert.

Die Leberrückstände wurden mittels eines Oxidizers vermessen. Als nicht-extrahierbare Rückstände verblieben $48,2 \pm 15,2 \%$. Aufgrund des inhomogenen Gemisches aus Leberrückständen und QuEChERS-Salzen war hier eine große Schwankung zwischen den Messwerten zu beobachten.

4.1.2.2 ALA in der Matrix Exkrement

Für die Entwicklung der Extraktionsmethode wurden Exkrement-Proben der Kontrollgruppe genommen und die ^{14}C -ALA-Standardlösung hinzudotiert. Als Methoden wurde eine Fest-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat und anschließender QuEChERS-Extraktion gewählt. Die Ethylacetat- und QuEChERS-Extraktion zeigten eine Wiederfindungsrate von $90,1 \pm 1,9 \%$. Die Proben wurden vereinigt, abgedampft und in 100 μL $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (50:50, v/v) gelöst. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 rpm

konnte ein klarer Überstand abgenommen werden. Die Ausbeute der finalen Probe betrug $83,4 \pm 2,3 \%$.

Die Aktivität in den ^{14}C -ALA-Exkrement-Proben wurde mittels eines Oxidizers bestimmt. Hierfür ergab sich ein Wert von $8,2 \text{ kBq/g}$. Mit der entwickelten Methode wurden in einer Dreifachbestimmung je 1 g Exkremente aus der Fütterungsstudie aufgearbeitet. Die Extraktion lieferte eine Wiederfindungsrate von $60,2 \pm 2,1 \%$, bezogen auf die insgesamt enthaltene Radioaktivität von $8,2 \text{ kBq/g}$. Die Proben wurden mittels Stickstoffstrom abgedampft und in $200 \mu\text{L}$ MeOH:H₂O (50:50, v/v) resuspendiert. Nach der Zentrifugation konnten klare Überstände abgenommen werden. Die finalen Proben wiesen eine Wiederfindungsrate von $52,8 \pm 1,9 \%$ auf. Die Proben wurden mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen.

Um den Verbleib der restlichen Radioaktivität zu untersuchen, wurde mit dem Rückstand eine Extraktion mit MeOH durchgeführt. Die Extraktion zeigte eine Wiederfindungsrate von $20,6 \pm 1,6 \%$ auf. Nach dem Abdampfen, dem Resuspendieren in $200 \mu\text{L}$ MeOH:H₂O (50:50, v/v) und der Zentrifugation konnten keine klaren Proben gewonnen werden. Eine Messung dieser Proben mittels Radio-UHPLC-HRMS war nicht möglich.

Die Rückstände nach den Extraktionen wurden mit einem Oxidizer vermessen. Dabei wurden $13,7 \pm 9,9 \%$ als nicht-extrahierbarer Rückstand gemessen. Aufgrund des inhomogenen Gemisches aus Exkrement-Rückständen und QuEChERS-Salzen war hier eine große Schwankung zwischen den Messwerten zu beobachten.

Die Ethylacetat-Extrakte wurden mittels Radio-UHPLC-HRMS. In Abbildung 24 ist repräsentativ ein Radio-Chromatogramm dargestellt. Die Aktivität pro $20 \mu\text{L}$ Injektion betrug 440 Bq .

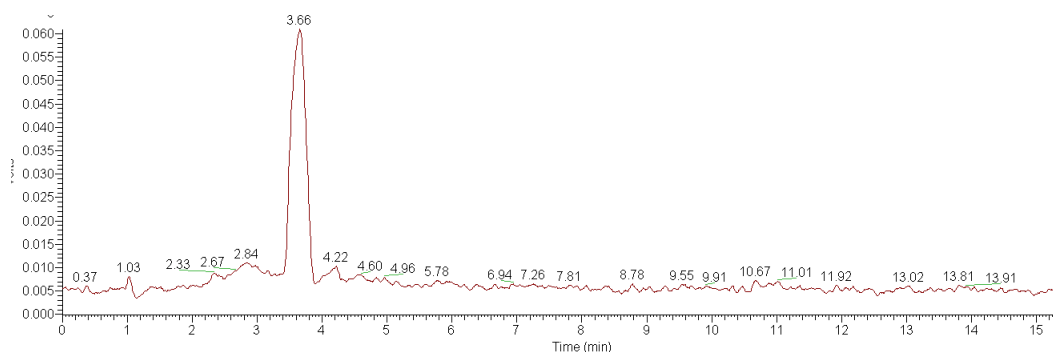


Abbildung 24: Radio-Chromatogramm der Ethylacetat-Extraktion der ^{14}C -ALA Exkrement Proben

Bei 3,6 Minuten ist ein deutlicher Radiopeak zu erkennen. Der ^{14}C -ALA-Peak weist eine Retentionszeit von neun Minuten auf. Somit handelt es sich um einen Metaboliten mit erhöhter Polarität. Die Radio-Chromatogramme und Massenspektrometer-Daten wurden mit dem Programm Compound Discoverer ausgewertet. Die Massen 188,1041 sowie 246,1458 und 230,1508 wurden in allen drei Replikaten bei der passenden Retentionszeit von $3,6 \pm 0,1$ gefunden (siehe Tabelle 44 im Anhang). Diese Massen repräsentieren das nicht-radioaktive ^{12}C -Isotop als neutrale Spezies. Mit der Software Xcalibur wurden die m/z-Verhältnisse in den Massenspektren überprüft und nach den dazugehörigen ^{14}C -m/z-Verhältnissen gesucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 32 dargestellt.

Tabelle 32: Überprüfung der ^{12}C und ^{14}C m/z Verhältnisse der ^{14}C -ALA-Exkremente mittels der Software Xcalibur

m/z Xcalibur (ESI neg.)					
Probe 1 ^{12}C m/z	Probe 1 ^{14}C m/z	Probe 2 ^{12}C m/z	Probe 2 ^{14}C m/z	Probe 3 ^{12}C m/z	Probe 3 ^{14}C m/z
187,09677	189,1002	187,09689	189,10014	187,09695	189,10020
245,13843	247,14168	245,13857	247,14182	245,13861	247,14186
229,14352	231,14677	229,14368	231,14693	229,14372	231,14697

Nach der Bestätigung des ^{12}C - und ^{14}C -Isotops in den drei Proben wurde der Lösungsmittelblank auf das Nicht-Vorhandensein dieser m/z-Verhältnisse überprüft und diese nicht gefunden. Ebenfalls wurden in den aufgearbeiteten Exkrement-

Proben der Kontrollgruppen die m/z der ^{14}C -Isotope nicht gefunden. Dadurch konnte bestätigt werden, dass es sich um drei Metabolite der ^{14}C -ALA handelt.

Mit den Programmen Compound Discoverer und Xcalibur konnten zu den gefundenen m/z-Verhältnissen Summenformelvorschläge generiert werden (siehe Tabelle 33).

Tabelle 33: Summenformelvorschläge der ^{14}C -ALA-Metabolite

^{12}C m/z (ESI neg)	^{14}C m/z (ESI neg)	Summenformel CD (neutrale Spezies)	Summenformel Xcalibur ^{12}C	Summenformel Xcalibur ^{14}C
187,09677	189,10020	$\text{C}_9 \text{H}_{16} \text{O}_4$	$\text{C}_9 \text{H}_{15} \text{O}_4$	$\text{C}_8 \text{ }^{14}\text{C} \text{H}_{15} \text{O}_4$
245,13843	247,14168	$\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_5$	$\text{C}_{12} \text{H}_{21} \text{O}_5$	$\text{C}_{11} \text{ }^{14}\text{C} \text{H}_{21} \text{O}_5$
229,14352	231,14677	$\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_4$	$\text{C}_{12} \text{H}_{21} \text{O}_4$	$\text{C}_{11} \text{ }^{14}\text{C} \text{H}_{21} \text{O}_4$

Die ALA weist eine Summenformel von $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$ mit drei C-C-Doppelbindungen an den Stellen 9, 12, 15 auf. Bei der vorgeschlagenen Summenformel $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_4$ handelt es sich um einen kurzkettigeren Metaboliten. Die Summenformeln $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_5$ und $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_4$ stellen ebenfalls kurzkettigere Metabolite dar. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Summenformelvorschläge eine höhere Anzahl an Sauerstoff-Atomen aufweisen. Aufgrund der stark Matrix belasteten Probe und geringen Mengen konnten keine aussagekräftigen Fragmentspektren generiert werden. Dadurch können keine eindeutigen Aussagen bezüglich der Strukturformeln gezogen werden.

Die entwickelte Extraktions-Methode lieferte eine Wiederfindung von 60,2 %. Mittels anschließender MeOH-Extraktion und Bestimmung der nicht extrahierbaren Rückstände war eine vollständige Bilanzierung der Aktivität möglich. Das Radio-Chromatogramm der Ethylacetat-Extraktion zeigte einen Radio-Peak für welchen Summenformelvorschläge gefunden werden konnten. Dennoch war hier eine eindeutige Identifizierung der Metabolite nicht möglich.

4.2 Verbleib von Lebensmittelinhaltsstoffen nach Lebensmittelverarbeitungsprozessen

Mit den zwei Nährstoffen von der Verdauungsstudie wurden Erhitzungsexperimente in Rapsöl untersucht. Des Weiteren wurde der Verbleib ^{14}C -Aspartam nach Lebensmittelverarbeitungsprozessen untersucht und die Stabilität in wässrigen Lösungen betrachtet.

4.2.1 Tyrosin

Um mögliche Abbauprodukte des Tyrosins nach einem simulierten Frittier-Prozess zu untersuchen, wurde in einer Doppel-Bestimmung Rapsöl mit dem ^{14}C -Tyrosin-Standard dotiert und erhitzt.

4.2.1.1 Probenaufarbeitung

Nach dem Erhitzen der Öl-Proben wurde die Aktivität mittels LSC-Messung bestimmt. Im Mittel ergab sich hierfür ein Wert von 66,4 %. Mit der sauren wässrigen Extraktion konnten 39,2 % der Aktivität gefunden werden. Nach dem Abdampfen der Proben und dem anschließenden Resuspendieren in H_2O + 3 % FA betrug die Aktivität im Mittel 25,2 %. Um mögliche unpolare Abbauprodukte zu erfassen, wurde anschließend eine QuEChERS-Extraktion durchgeführt. Mit dieser wurde eine Ausbeute von 15,7 % erzielt. Nach dem Abdampfen und dem Lösen der Probe betrug die Aktivität 11,1 %. Mit der Kombination aus sauer-wässriger Extraktion mit anschließender QuEChERS-Extraktion ließen sich im Mittel 54,9 % von der ursprünglich eingesetzten Aktivität wiederfinden.

Um das Verhalten von Tyrosin ohne Öl-Matrix zu untersuchen wurde H_2O mit ^{14}C -Tyrosin dotiert und erhitzt. Die Ausbeute nach dem Erhitzen konnte ohne weitere Probenaufarbeitung mittels LSC bestimmt werden und betrug 76,3 %.

4.2.1.2 Radio-UHPLC-HRMS-Messungen

Die Extrakte der dotierten Rapsöl-Proben wurden zunächst mit einer ZIC-HILIC-Säule gemessen, da diese für die Methodenentwicklung verwendet wurde. Repräsentativ ist das UHPLC-radio-Chromatogramm der sauren-wässrigen Extraktion in Abbildung 25 dargestellt.

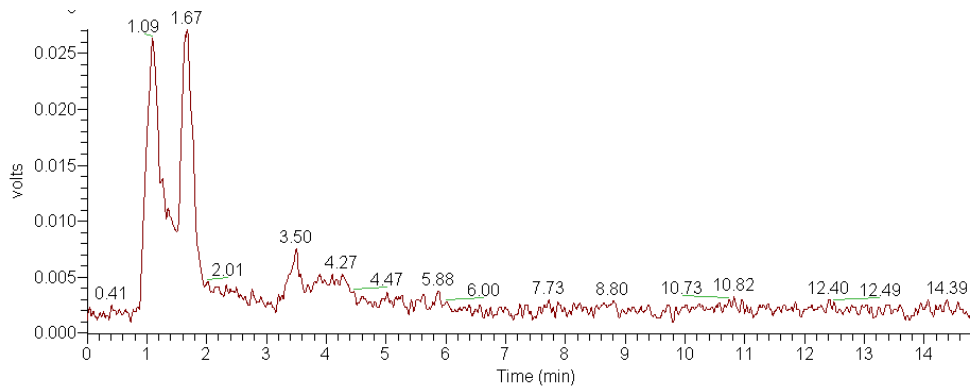


Abbildung 25: Radio-Chromatogramm der sauren-wässrigen Extraktion der dotierten ^{14}C -Tyrosin-Öl-Probe, gemessen mit einer ZIC-HILIC-Säule

Zwei intensive Peaks sind zwischen 1 und 2 Minuten erkennbar. Aufgrund der nicht ausreichenden Wechselwirkung mit der zwitterionischen Phase wurden die Proben zusätzlich mit einer C18-Säule gemessen. Das UHPLC-radio-Chromatogramm der sauren-wässrigen Extraktion ist in Abbildung 26 gezeigt.

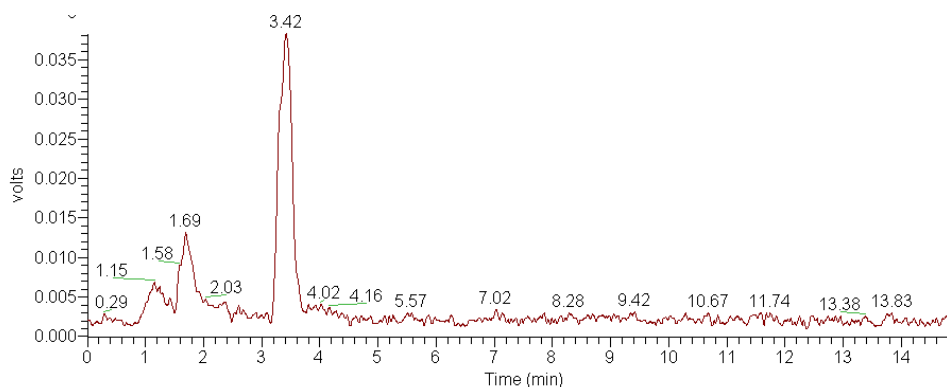


Abbildung 26: Radio-Chromatogramm der sauren-wässrigen Extraktion der dotierten ^{14}C -Tyrosin-Öl-Probe, gemessen mit einer C18-Säule

Bei 3,4 Minuten ist ein eindeutiger Peak zu erkennen. Ein weiterer Peak konnte bei 1,7 Minuten erfasst werden. Die QuEChERS-Extraktionen wurden ebenfalls mit der C18-Säule gemessen. Hierbei wurde ebenfalls ein Peak bei 3,4 Minuten detektiert (siehe Abbildung 57 im Anhang).

4.2.1.3 Identifizierung potenzieller Abbauprodukte

Um Summenformel-Vorschläge der unbekannteren Abbauprodukte zu erhalten, wurden die Proben mit dem Programm Compound Discoverer ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 34 aufgeführt.

Tabelle 34: Summenformel-Vorschläge und zugehörige m/z-Verhältnisse der gefundenen ¹⁴C-markierten Abbauprodukte, ermittelt mit dem Programm Compound Discoverer

m/z neutrale Spezies	Summenformel- Vorschlag (neutral)	m/z ESI positiv	m/z ESI negativ	Retentionszeit
195,0962	C ₂ ¹⁴ C ₇ H ₁₁ N O ₃	196,1035	194,0896	1,7 Minuten
315,1168	C ₉ ¹⁴ C ₇ H ₁₅ N O ₅	316,1244	314,1105	3,5 Minuten

Basierend auf den spezifischen Isotopenverhältnissen des ¹⁴C-Tyrosins entsprechen die m/z 195,0962 und 315,1168 der neutralen Spezies. Der Summenformelvorschlag repräsentiert das ¹⁴C₇-fach markierte Molekül. Zusätzlich wurden die Massen mit dem Programm Xcalibur überprüft und es wurde nach weiteren Isotopen gesucht. In Tabelle 35 und Tabelle 36 sind weitere Isotope der gefundenen m/z eingetragen sowie deren aus den Peakflächen berechnetes Isotopenverhältnis.

Tabelle 35: Isotope des m/z 196,10347 und das zugehörige Isotopenverhältnis

m/z ESI positiv	Summenformel- Vorschlag (ESI pos.)	Isotopenverhältnis
196,1035	C ₂ ¹⁴ C ₇ H ₁₂ N O ₃	33
198,1067	C ¹⁴ C ₈ H ₁₂ N O ₃	80
200,1091	¹⁴ C ₉ H ₁₂ N O ₃	100

Tabelle 36: Isotope des m/z 316,12436 und das zugehörige Isotopenverhältnis

m/z ESI positiv	Summenformel- Vorschlag (ESI pos.)	Isotopenverhältnis
316,1244	C ₉ ¹⁴ C ₇ H ₁₆ N O ₅	33
318,1276	C ₈ ¹⁴ C ₈ H ₁₆ N O ₅	80
320,1308	C ₇ ¹⁴ C ₉ H ₁₆ N O ₅	100

Die in Tabelle 35 gefundenen m/z-Verhältnisse entsprechen dem ¹⁴C-Tyrosin-Standard. Ebenso weist das Verhältnis des ¹⁴C₇-Isotops zu dem von ¹⁴C₈ und ¹⁴C₉ ein Verhältnis von 33:80:100 auf. Dieses Isotopenverhältnis stimmt mit dem des ¹⁴C-Tyrosin-Standards überein (siehe Tabelle 14). Die Masse 316,1243 und die dazugehörigen Isotope stellen ein unbekanntes Abbauprodukt des ¹⁴C-Tyrosins dar. Auch hier stimmt das Isotopenverhältnis von 33:80:100 mit dem des Standards überein. Da es sich um eine höhere Masse als die des Tyrosins handelt, wurde zusätzlich nach weiteren Isotopen gesucht, z.B. ¹⁴C₁₀ und ¹⁴C₁₁. Diesbezüglich konnten keine Massen identifiziert werden. Somit wurde bestätigt, dass das ¹⁴C₉-Gerüst des Tyrosins intakt geblieben ist und es sich um ein Abbauprodukt mit einer Anlagerung an das Tyrosin handelt. Darüber hinaus weist das Abbauprodukt eine geringere Polarität als die Ausgangssubstanz auf, da sich die Retentionszeit auf der C18-Säule um 1,7 Minuten erhöht hat.

Um Strukturinformationen über das unbekannte Abbauprodukt zu erhalten, wurden gezielt MS/MS-Experimente (t-SIM/PRM) mit den Extrakten der ¹⁴C-dotierten und der ¹²C-dotierten Rapsöl-Proben durchgeführt. Dabei wurde das m/z 318,1169, das dem Summenformelvorschlag C₇ ¹⁴C₉ H₁₄ N O₅ im ESI negativen Modus entspricht, fragmentiert. Zusätzlich wurden die zwei dazugehörigen Isotope mit den m/z 316,1136 und 314,1104 fragmentiert. Bei dem Extrakt der ¹²C-Tyrosin Probe wurde das m/z 300,0877 (C₁₆ H₁₄ N O₅) fragmentiert. Zusätzlich wurden der ¹⁴C-Tyrosin-Standard und eine Leerwertprobe, bestehend aus der extrahierten Rapsöl-Probe ohne dotiertes Tyrosin, mitgemessen. In Tabelle 37 sind die gefundenen Fragment-Massen im ESI-negativen Modus sowie deren Summenformelvorschläge der ¹²C- und ¹⁴C-dotierten Rapsöl-Proben eingetragen.

Tabelle 37: MS/MS-Fragment m/z-Verhältnisse (ESI neg.) der Extrakte der ¹²C- und ¹⁴C-Tyrosin-Rapsöl-Proben

¹² C-Tyrosin-Rapsöl-Probe		¹⁴ C-Tyrosin-Rapsöl-Probe	
m/z	Summenformel	m/z	Summenformel
256,0978	C ₁₅ H ₁₄ O ₃ N	-	-
		Isotop + 8* 2,0032	
		272,1237	C ₇ ¹⁴ C ₈ H ₁₄ O ₃ N
149,0480	C ₈ H ₇ O ₂ N	149,0480	C ₈ H ₇ O ₂ N
		Isotop + 2,0032	
		151,0512	C ₇ ¹⁴ C H ₇ O ₂ N

In der Leerwert-Probe wurde keine der oben aufgeführten Fragment m/z-Verhältnisse gefunden. Dadurch kann bestätigt werden, dass die Massen vom Abbauprodukt stammen und nicht von coeluerenden Bestandteilen des Rapsöls. Die Massen 256,0978 sowie 272,1237 repräsentieren das C₈-Gerüst (C₇ ¹⁴C₈ H₁₄ O₃ N) des Tyrosin-Moleküls inklusive der Anlagerung. In dem Massenspektrum der ¹⁴C-dotierten Tyrosin-Öl-Probe wurde zusätzlich die Masse 318,1170 gefunden. Die Differenz zwischen der Masse 318,1170 und 272,1237 entspricht der Massendifferenz einer ¹⁴COOH-Gruppe. Dadurch kann nachgewiesen werden, dass es zu einer Abspaltung der Säuregruppe kam und dass diese ungebunden vorlag. Weiter ist festzustellen, dass der Masse 149,0480 das zugehörige ¹⁴C₁-Isotop zugeordnet werden konnte. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass das Addukt am Stickstoff des Tyrosins gebunden war und nicht an der OH-Gruppe. Eine Zuordnung der Fragment m/z-Verhältnisse ist in Abbildung 27 dargestellt.

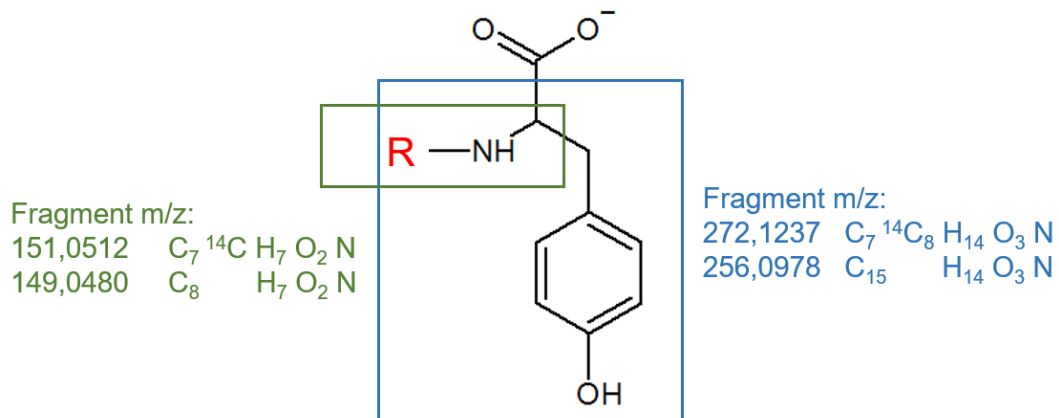


Abbildung 27: Zuordnung der Fragment m/z-Verhältnisse zu dem Abbauprodukt des Tyrosins, R stellt dabei die unbekannte Anlagerung dar

Von Masse 149,0480 mit der Summenformel C₇¹⁴C₇H₇O₂N können somit die Atome N, ¹⁴C und H₂ dem ¹⁴C-Tyrosin zugeordnet werden. Durch die Kondensationsreaktion einer OH-Gruppe mit dem Stickstoff des Tyrosins wurde die Bildung einer Amid-Bindung vermutet. Somit ergibt sich nach Abzug der dem Tyrosin zugehörigen Atome (N, ¹⁴C, H₂) und Addition eines Sauerstoffs der Säure-Gruppe die Summenformel C₇H₅O₃ mit der Masse 137,0233 (ESI neg.). Diese Masse wurde sowohl in der radioaktiven als auch in der nicht-radioaktiven Öl-Probe gefunden. Des Weiteren wurde diese Masse in der Leerwert-Probe des Öls gefunden. Somit wurde das Molekül mit der Summenformel C₇H₅O₃ als Inhaltsstoff des Rapsöls erachtet mit dem das Tyrosin reagiert hat.

Um weitere Informationen zu erlangen, wurde die extrahierte ¹⁴C-Tyrosin Öl-Probe einer hohen In-Source-CID in der Ionisationsquelle ausgesetzt. Somit bildete sich bereits in der Ionisationsquelle das Fragment 151,0512. Dieses konnte anschließend in der HCD-Zelle weiter fragmentiert werden. In Tabelle 38 sind die gefundenen m/z-Verhältnisse eingetragen. Um die m/z-Verhältnisse mit Fragmenten aus der NIST-Datenbank vergleichen zu können, wurden von der neutralen Masse die dem Tyrosin zugehörigen Atome abgezogen. Die somit erhaltenen NIST-Fragmente wurden mit der Datenbank verglichen.

Tabelle 38: In-Source-Fragmente des m/z 151,0512

m/z ESI neg.	m/z neutral	Summenformel ESI neg.	Berechnung -N -2H - ¹⁴ C + O	NIST- Fragmente
151,0698	152,0776	C ₇ ¹⁴ C H ₇ O ₂ N	152 - 14	138
122,0476	123,0554	C ₆ ¹⁴ C H ₆ O N	123 - 14	109
109,0398	110,0476	C ₅ ¹⁴ C H ₅ O N	110 - 14	96
96,0319	97,0398	C ₄ ¹⁴ C H ₄ O N	97 - 14	67

Nach Abgleich mit der Datenbank wurden drei Substanzen vorgeschlagen. Bei den drei Substanzen handelt es sich um 3-Hydroxy-Benzoessäure, Salicylsäure und 3-Furyl-Acryl-Säure (siehe Abbildung 28).

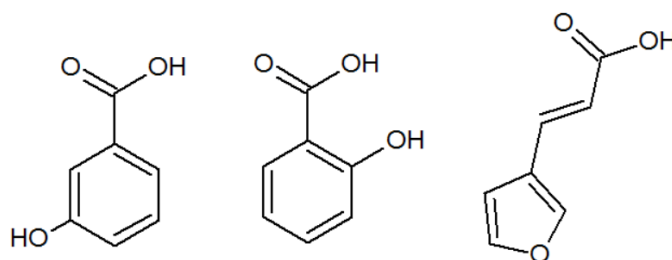


Abbildung 28: 3-Hydroxy-Benzoessäure (rechts), Salicylsäure (Mitte) und 3-Furyl-Acryl-Säure (links)

Alle drei vorgeschlagenen Substanzen enthalten eine Säure-Gruppe, die mit der Amin-Gruppe des Tyrosins eine Amid-Bindung eingehen kann. In Abbildung 29 sind die möglichen Abbauprodukte dargestellt.

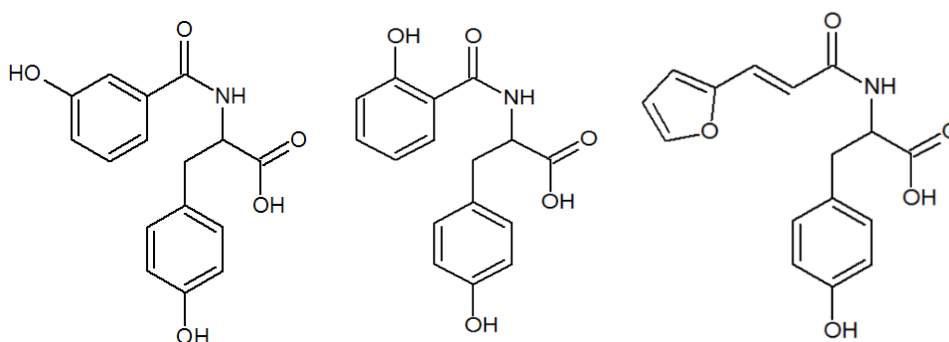


Abbildung 29: Strukturformeln der möglichen Abbauprodukte des Tyrosins nach einem Erhitzungsversuch in Rapsöl

Die Abbauprodukte repräsentieren die neutrale Spezies mit der Summenformel $C_{16}H_{15}NO_5$ bzw. mit der radioaktiven Markierung $C_7^{14}C_9H_{15}NO_5$. Dabei bleibt das Grundgerüst des Tyrosins intakt und es kommt zur Anlagerung eines Moleküls mit der Summenformel $C_6H_5O_2$. Dennoch bleibt zu betonen, dass es sich um einen möglichen Strukturvorschlag handelt.

In einem weiteren Experiment wurde die dreifache Menge an Rapsöl, ohne hinzudotiertes Tyrosin, mit der oben beschriebenen Methode extrahiert. Dabei wurden zwei Proben angesetzt: Eine wurde erhitzt, die andere nicht. In beiden Proben wurde die Masse 137,0233 mit der Summenformel $C_7H_5O_3$ (ESI neg.) mit derselben Intensität gefunden. Die Fragmentierungsexperimente zeigten in beiden Proben eine Masse von 93,0306 mit der Summenformel C_6H_5O . Die Massendifferenz von 137,0233 und 93,0306 entspricht der Abspaltung einer COO^- -Gruppe (ESI neg.). Somit konnte gezeigt werden, dass die Substanz mit der Masse 137,0233 sowohl im nicht-erhitzten als auch im erhitzten Rapsöl vorkommt und dass sie eine Säure-Gruppe aufweist.

4.2.2 ALA

Um den Verbleib der ALA nach einem simulierten Frittier-Prozess zu untersuchen, wurde der ^{14}C -markierte Standard dem Rapsöl hinzudotiert und für 30 und 60 Minuten bei 170 °C erhitzt. Da es sich um einen unpolaren Analyten handelt, wurde für die Extraktion die QuEChERS-Methode gewählt. Nach dem Erhitzen wurde das Rapsöl mittels LSC vermessen. Bei der Probe nach 30 Minuten Erhitzen zeigte sich im Mittel ein Aktivitätsverlust von 11,7 % und bei der Probe nach 60 Minuten ein Verlust von 22,1 %. Die Bilanzierung der Aktivitäten ist in Abbildung 30 dargestellt.

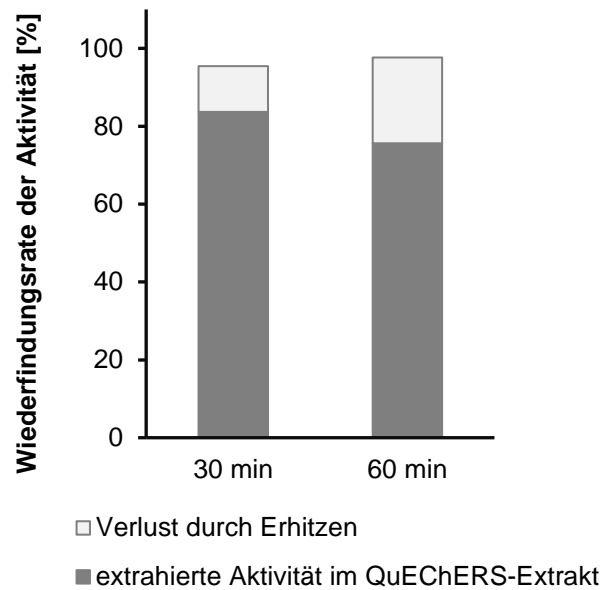


Abbildung 30: Bilanzierung der ^{14}C -ALA-Rapsöl-Proben

Mit der QuEChERS-Extraktion konnten für die Probe nach 30 Minuten im Mittel 83,7 % der eingesetzten Aktivität wiedergefunden werden und für die Probe nach 60 Minuten 75,6 %. Die Bilanzierung in Abbildung 30 zeigt, unter Berücksichtigung des Verlustes durch das Erhitzen, eine vollständige Wiederfindungsrate von annähernd 100 %. Die Radio-Chromatogramme der UHPLC-HRMS-Messung sind in Abbildung 31 dargestellt.

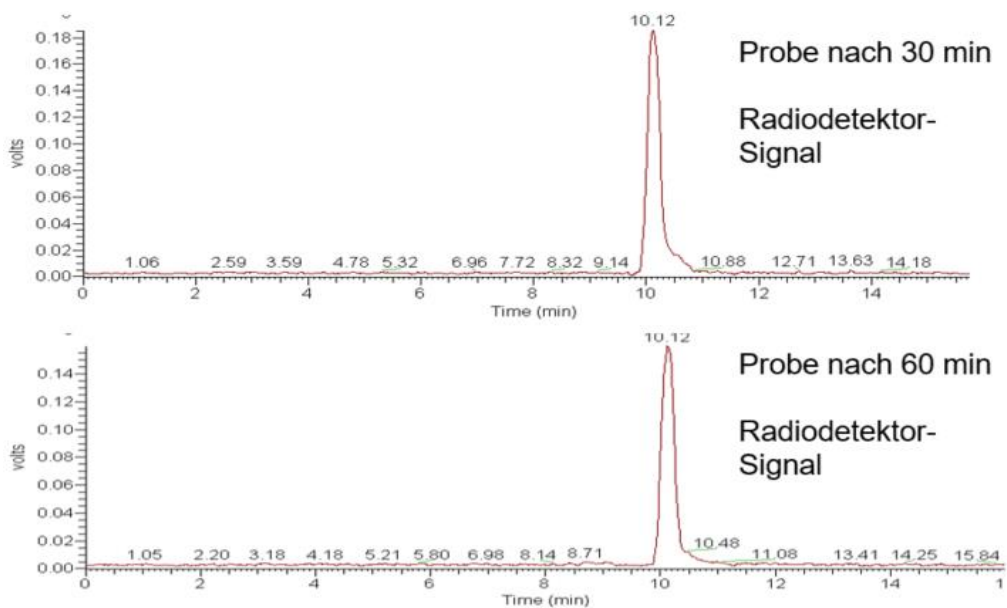


Abbildung 31: Radio-Chromatogramme der ^{14}C -ALA-Rapsöl-Proben nach 30 Minuten und 60 Minuten Erhitzen

Bei beiden Chromatogrammen sind deutliche Radiopeaks bei 10,1 Minuten zu erkennen. Aufgrund der Retentionszeit und der Daten aus den Massen-Spektren konnten diese Peaks eindeutig als ALA identifiziert werden. Beim Frittier-Prozess ist es nicht zur Bildung von Abbauprodukten gekommen, die mittels flüssigchromatographischer Trennung erfassbar sind. Aufgrund des Verlustes an Radioaktivität nach dem Erhitzen kann von der Bildung flüchtiger Abbauprodukte ausgegangen werden. Ungesättigte Fettsäuren sind nicht nur empfindlich gegenüber Luftsauerstoff (Autoxidation), sondern auch temperatursensitiv. Durch die Oxidation kommt es bei der ALA vorwiegend zur Bildung flüchtiger Aldehyde und nicht-flüchtiger Aldehyde, z. B. Acetaldehyddiethylacetal [49].

4.2.3 Aspartam

Mit dem ^{14}C -Aspartam wurden verschiedene Lebensmittelverarbeitungsprozesse durchgeführt. Die Aufzeichnung von Radio-UHPLC-HRMS-Daten ermöglichte Rückschlüsse auf potenzielle Abbauprodukte. Des Weiteren wurde Aspartam als Süßungsmittel im Kaffee untersucht. Ergänzend wurde die Stabilität in wässrigen Medien abhängig von Temperatur, pH-Wert und Zeit analysiert.

4.2.3.1 Radio-UHPLC-HRMS-Methodenentwicklung

Im ersten Schritt der Untersuchung von Aspartam in Verarbeitungsprozessen wurde eine UHPLC-HRMS-Methode entwickelt. Als Trennsäule diente hier eine C18 Säule. Abbildung 32 zeigt zur Zuordnung der Retentionszeit die Massenspur des $[\text{M}-\text{H}]^-$ Ions des ^{12}C -Aspartam-Isotops (schwarz) und des ^{14}C -Aspartam-Isotops (rot).

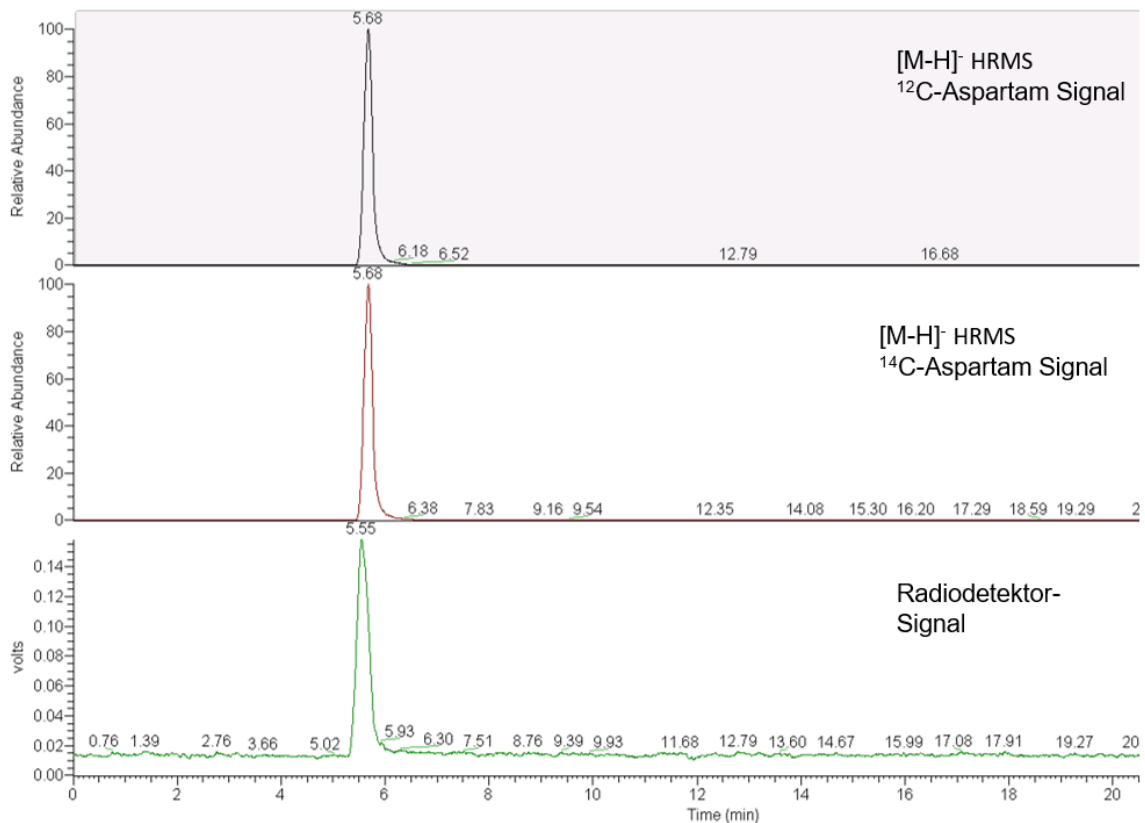


Abbildung 32: Massenspur des ¹²C- und ¹⁴C-Aspartams sowie das Radio-Chromatogramm des ¹⁴C-Aspartam-Standards

Bei 5,6 min sind deutliche schmale Peaks erkennbar. In Grün ist das Radio-Chromatogramm des ¹⁴C-Aspartam-Standards dargestellt.

4.2.3.2 Erhitzungsversuch Kleingebäck

Für die Untersuchung von Aspartam während eines Back-Prozesses wurde der ¹⁴C-markierte Standard einem Teig hinzudotiert und für 15 Minuten bei 170 °C erhitzt. Um potenzielle Abbauprodukte mittels Radio-UHPLC-HRMS untersuchen zu können, wurde im ersten Schritt eine geeignete Extraktionsmethode entwickelt.

Die verbleibende Aktivität im Kleingebäck nach dem Backen wurde in einer Dreifachbestimmung mittels eines Oxidizers bestimmt. Mit den Proben konnte anschließend eine LSC-Messung durchgeführt werden. Im Mittel konnten $86,7 \pm 4,6$ % der Radioaktivität nach dem Backen wiedergefunden werden.

Als Extraktionsmittel wurde MeOH:H₂O (50:50, v/v) + 1 % FA gewählt. Die Extraktion wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Mit angesäuerter organisch-wässriger

Extraktion wurden im Mittel $76,3 \pm 3,8$ % der eingesetzten Aktivität wiedergefunden. Des Weiteren wurde eine QuEChERS-Extraktion untersucht, um mittelpolare und unpolare Abbauprodukte zu erfassen. Mit der QuEChERS-Extraktion konnten $67,3 \pm 3$ % der ursprünglich eingesetzten Aktivität detektiert werden. In Abbildung 33 ist die Bilanzierung der Aktivität dargestellt.

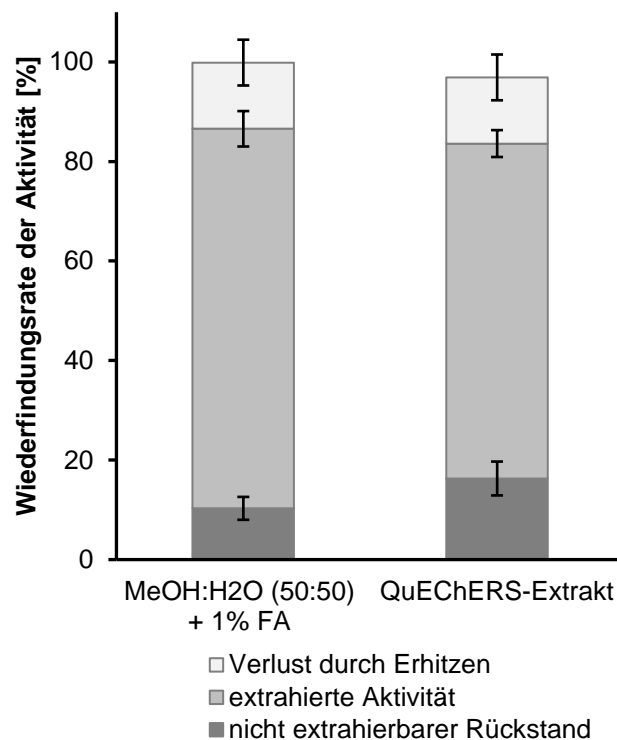


Abbildung 33: Bilanzierung der Aktivität von ^{14}C -Aspartam der extrahierten Kleingebäck-Proben in Prozent der Wiederfindungsrate (Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit zugehöriger Standardabweichung)

Aus der Bilanzierung wird ersichtlich, dass 13 % der Aktivität durch das Erhitzen verlorengegangen sind. Die Extraktion mittels MeOH:H₂O (50:50, v/v) + 1 % FA erzielte eine um 10 % höhere Wiederfindung als die QuEChERS-Extraktion. Dennoch wurden beide Extrakte weiter analysiert, um alle Abbauprodukte zu erfassen.

4.2.3.3 Erhitzungsversuch Rapsöl

Um den Verbleib von Aspartam während eines simulierten Frittier-Prozesses zu untersuchen, wurde der ^{14}C -markierte Standard zu Rapsöl hinzudotiert und für 15, 30 und 60 Minuten bei 170 °C erhitzt. Eine Kombination aus zuerst wässriger Extraktion

mit MeOH:H₂O (50:50, v/v) und anschließender QuEChERS-Extraktion diente als Extraktionsmethode. Dadurch konnten polare Substanzen durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Methanol/Wasser extrahiert werden. Mittels QuEChERS-Extraktion konnten aus der zurückgebliebenen Probe die unpolaren und mittelpolaren Produkte herausgelöst werden. Nach dem Erhitzen wurden im Mittel $76 \pm 2,1\%$ an Aktivität wiedergefunden. Mit der anfänglichen polaren Extraktionsmethode konnten von der ursprünglich eingesetzten Aktivität $64,8 \pm 0,7\%$ % detektiert werden. Die anschließende QuEChERS-Methode zeigte eine Ausbeute von $9,9 \pm 1,9\%$ %. Die Bilanzierung ist in Abbildung 34 dargestellt.

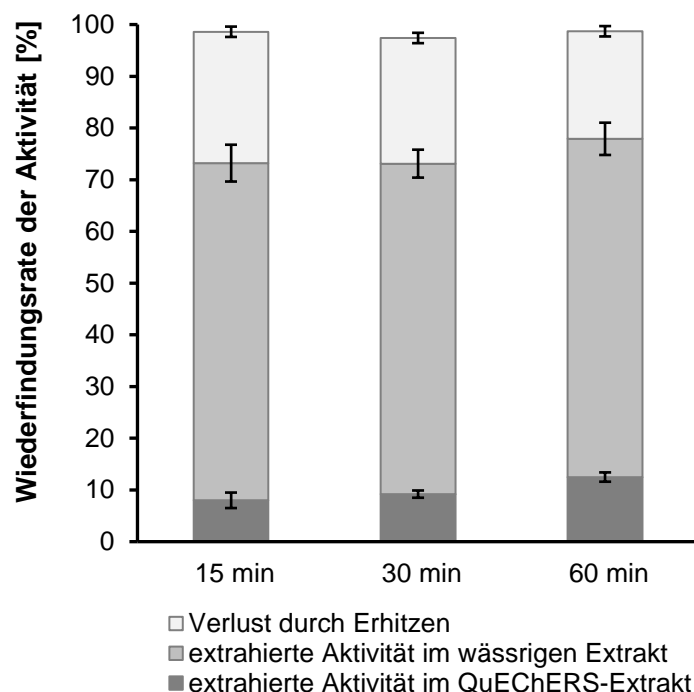


Abbildung 34: Bilanzierung der Aktivität von ¹⁴C-Aspartam der extrahierten Öl-Proben bei 170 °C für 15, 30 und 60 Minuten in Prozent der Wiederfindungsrate (Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit zugehöriger Standardabweichung)

Zwischen den Erhitzungszeiten sind keine deutlichen Unterschiede in den Wiederfindungsraten bzw. in den Aktivitätsverlusten erkennbar.

In einem weiteren Experiment wurden ¹⁴C-Aspartam-dotierte Rapsöl-Proben für 30 und 60 Minuten bei 190 °C erhitzt und mit derselben Extraktionsmethode extrahiert. Die Bilanzierung der Aktivität ist in Abbildung 35 dargestellt.

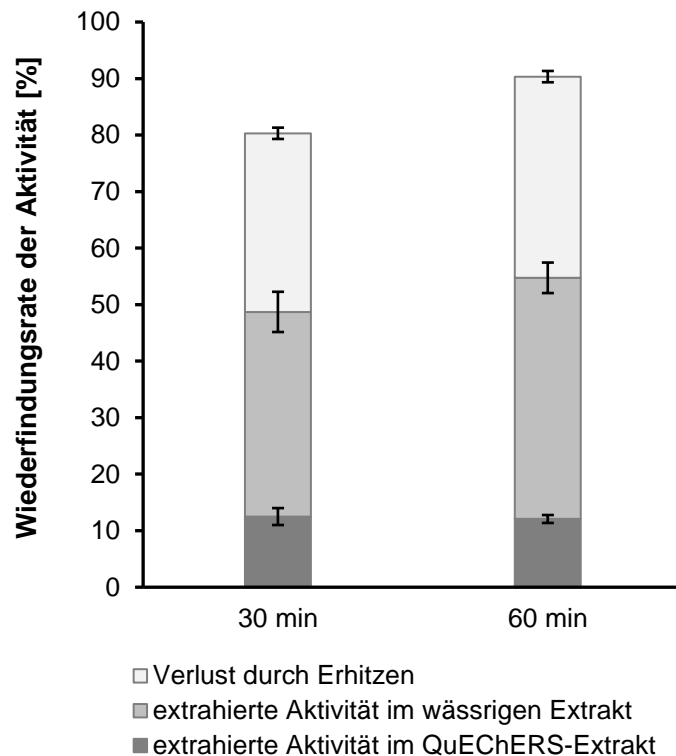


Abbildung 35: Bilanzierung der Aktivität von ^{14}C -Aspartam der extrahierten Öl-Proben bei 190 °C für 30 und 60 Minuten in Prozent der Wiederfindungsrate (Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit zugehöriger Standardabweichung).

Durch das Erhitzen bei 190 °C gingen im Mittel $33,6 \pm 1,8$ % an Aktivität verloren. Somit ist eine Zunahme von 10 % Aktivitätsverlust bei einer Temperatur von 190 °C im Vergleich zu 170 °C festzustellen. Mit der polaren Extraktionsmethode konnten $42,6 \pm 4,8$ % an Aktivität gemessen werden und mit der anschließenden QuEChERS-Methode $12,5 \pm 2,2$ %. Bei den Erhitzungstemperaturen von 170 °C und 190 °C konnte mit der polaren Extraktionsmethode ein höherer Anteil an Aktivität extrahiert werden. Die Öl-Rückstände wurden mittels LSC vermessen. Dabei wurden bei der Probe nach 30 min $16,6 \pm 2,3$ % Aktivität detektiert und bei der Probe nach 60 min $8,2 \pm 1,8$ %.

4.2.3.4 Untersuchung potenzieller Abbauprodukte

Aus den Ergebnissen der Radio-UHPLC-HRMS-Messungen des ^{14}C -Aspartam-Standards konnte das spezifische Isotopenmuster ermittelt werden. Hierbei handelt es sich um das Verhältnis der einfach, zweifach, dreifach und nicht markierten Isotope

des Aspartam-Standards. Das $^{14}\text{C}_1$ -Isotop weist dabei die höchste Intensität auf. Werden die anderen Intensitäten der weiteren Isotope auf diese höchste Intensität normiert, ergibt sich das in Tabelle 39 dargestellte Verhältnis.

Tabelle 39: Verhältnis des Isotopenmusters des ^{14}C -Aspartam-Standards

Aspartam-Isotope	Isotopenverhältnis [%]	m/z der Isotope (ESI neg)
$\text{C}_{13} \text{ }^{14}\text{CH}_{17}\text{O}_5\text{N}_2$	100	297,13201
$\text{C}_{12} \text{ }^{14}\text{C}_2\text{H}_{17}\text{O}_5\text{N}_2$	85,2	299,13591
$\text{C}_{14} \text{ H}_{17}\text{O}_5\text{N}_2$	49,8	295,12939
$\text{C}_{11} \text{ }^{14}\text{C}_3\text{H}_{17}\text{O}_5\text{N}_2$	33,5	301,13876

Dieses spezifische Isotopenverhältnis von 100:85,2:33,5 konnte anschließend für die Auswertung der Abbauprodukte genutzt werden. Das ^{12}C -Isotop des Aspartams wurde mit einer Intensität von 49,81 % gefunden.

Für die Untersuchung der Abbauprodukte wurden alle Extrakte zunächst mit der Vion-IMS-QToF gemessen. In Abbildung 36 sind repräsentativ zwei Radio-Chromatogramme der QuEChERS- und wässrig-methanolischen-Extraktion des Erhitzungsversuchs im Teig dargestellt.

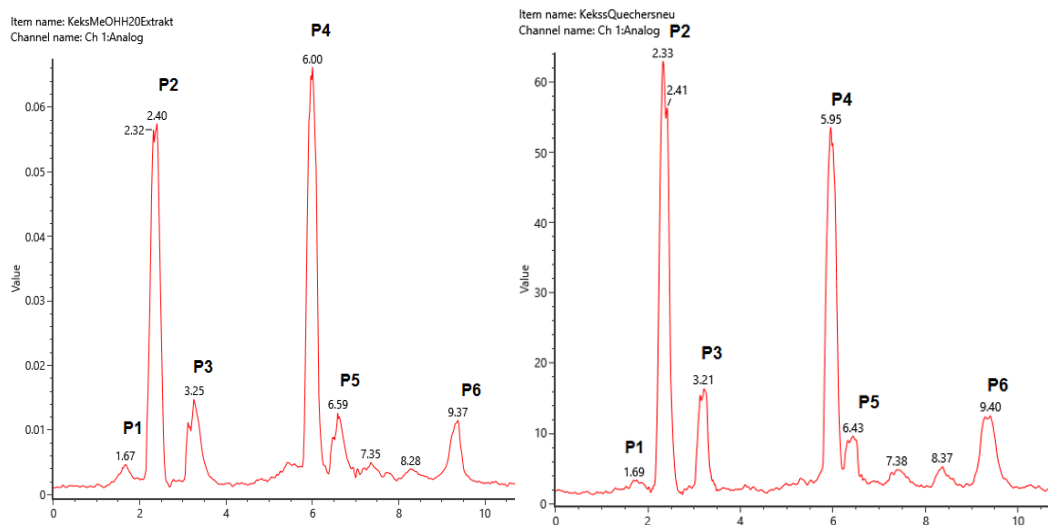


Abbildung 36: Radio-Chromatogramme der Kleingebäck-Proben (links: $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (50:50) Extraktion, rechts: QuEChERS-Extraktion)

Die Radio-Chromatogramme zeigen mehrere deutliche Peaks, wodurch die Bildung von verschiedenen Abbauprodukten bestätigt werden konnte. Der Vergleich beider Chromatogramme zeigt eine Übereinstimmung der auftretenden Peaks. Die wässrig-methanolische und die QuEChERS-Extraktion lieferten demnach dieselben Abbauprodukte. Übersichtshalber wurden die einzelnen Peaks mit P1-P6 gekennzeichnet. Der vierte Peak (P4) konnte anhand seiner Masse und Retentionszeit eindeutig als ^{14}C -Aspartam identifiziert werden.

Die wässrig-methanolischen und die QuEChERS-Extrakte der Öl-Proben wurden zunächst an der Vion-IMS-QToF gemessen. In der nachfolgenden Abbildung sind repräsentativ Radio-Chromatogramme dargestellt.

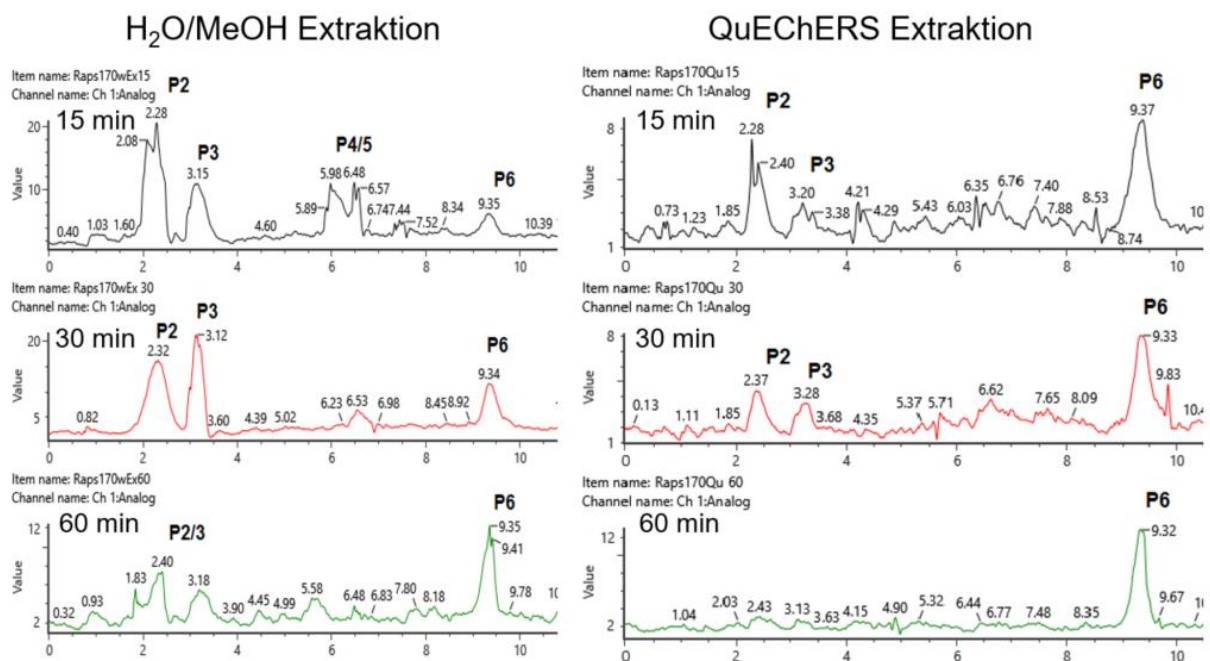


Abbildung 37: Radio-Chromatogramme der Extraktion mit H₂O/MeOH (50:50, v/v) und QuEChERS-Öl-Extraktion bei unterschiedlichen Erhitzungsdauern der Proben von 15, 30 und 60 Minuten bei 170 °C

Die Radio-Chromatogramme zeigen ebenfalls deutliche Peaks und bestätigen die Bildung von Abbauprodukten. Die Kennzeichnung von P2-P6 wurde anhand der Retentionszeit getroffen und entspricht den in Abbildung 37 aufgeführten Peaks. Der Vergleich der Radiopeaks der beiden Matrices (Kleingebäck, Rapsöl) zeigte eine Übereinstimmung der gebildeten Radiopeaks. Der Peak P4 konnte dem ^{14}C -Aspartam zugeordnet werden. Bei längerer Erhitzungsdauer ist der Aspartam-Peak nicht mehr

zu erkennen. Ebenfalls sind Unterschiede zwischen der Intensität der einzelnen Abbauprodukte bei unterschiedlicher Erhitzungsdauer zu beobachten. Das Abbauprodukt P6 wird verstärkt bei zunehmender Erhitzungsdauer gebildet. Hingegen zeigen sich die Produkte P2 und P3 bei zunehmender Erhitzungsdauer weniger deutlich bzw. bei 60 Minuten fast nicht mehr. Aufgrund der Retentionszeiten bzw. Wechselwirkung mit der C18-Säule können auch Zusammenhänge bezüglich der Polarität der Abbauprodukte geschlussfolgert werden. So ließ sich für die Produkte P2 und P3 eine polare Struktur und für das Produkt P6 eine mittelpolare bis unpolare Struktur vermuten. Verdeutlicht wurde diese Vermutung, da mittels der QuEChERS-Extraktion, die vor allem für unpolare Analyte geeignet ist, P6 am effektivsten extrahiert werden konnte. Aufgrund der polaren Struktur von P2 und P3 wurden diese mit der organisch-wässrigen Extraktion in höherem Maße extrahiert.

Beim Frittier-Versuch bei 190 °C wurden ebenfalls Abbauprodukte mit den gleichen Retentionszeiten beobachtet. Im Vergleich zu der Erhitzungstemperatur von 170 °C zeigte sich bei 190 °C eine erhöhte Bildung des Abbauprodukts P6. Bei 60 Minuten Erhitzen nehmen die Intensitäten der Produkte P2 und P3 ab. Die entsprechenden Radio-Chromatogramme sind im Anhang dargestellt (siehe Abbildung 64 und Abbildung 65).

Um weitere Informationen über die detektierten Abbauprodukte zu erlangen, wurden einige Proben der Öl-Extrakte und Kleingepäck-Extrakte mit der Orbitrap Exactive™ Plus vermessen. Die Radio-Chromatogramme gleichen denen der vorherigen Messungen an der Vion-IMS-QToF (siehe Abbildung 66 bis Abbildung 68). Die dadurch generierten Daten konnten mit der Software Compound Discoverer (Thermo Fisher Scientific) analysiert und ausgewertet werden. Dazu diente das spezifische Isotopenverhältnis des ¹⁴C-Aspartam-Standards. Die Ergebnisse sind in Tabelle 40 dargestellt.

Tabelle 40: Summenformel-Vorschläge und zugehörige m/z Verhältnisse der gefundenen ¹⁴C-markierten Abbauprodukte, ermittelt mit dem Programm Compound Discoverer

Summenformelvorschlag Neutrale Spezies	m/z: ESI positiv	m/z: ESI negativ	Retentionszeit	Peak
C ₁₂ ¹⁴ C H ₁₄ O ₄ N ₂	-	263,09055	2,3	P2
C ₁₂ ¹⁴ C H ₁₅ O ₄ N	252,11098	250,09502	9,3	P6

Die angegebenen Massen stellen die Massen der einfach ¹⁴C-markierten Substanzen dar. Für die Abbauprodukte P2 und P6 konnten Summenformelvorschläge generiert werden, die im Nachfolgenden näher untersucht wurden. Zu den Abbauprodukten P1, P3 und P5 konnten mittels dem Programm Compound Discoverer keine passenden Summenformelvorschläge gefunden werden.

Identifizierung und Quantifizierung des Abbauproduktes P2

Für das Abbauprodukt P2 wurden die Summenformel C₁₂¹⁴CH₁₃N₂O₄ und das m/z Verhältnis 263,09055 (ESI neg.) vorgeschlagen. Dies ließ das bereits in der Literatur beschriebene Abbauprodukt von Aspartam 5-Benzyl-3,6-Dioxo-2-Piperazin-Essigsäure (DKP) vermuten. Um die Vermutung weiter zu bestätigen, wurde die Leerwert-Probe auf das Nichtvorhandensein dieser Masse überprüft und bestätigt, dass diese nicht enthalten war. Eine eindeutige Identifizierung konnte anschließend mittels des DKP-Standards durchgeführt werden. Wie auch das Abbauprodukt P2 konnte der DKP-Standard nur im ESI-negativen Modus detektiert werden. Die Retentionszeit des Standards beträgt 2,4 Minuten und stimmt somit, unter Berücksichtigung der Abweichung von 0,1 min aufgrund des dazwischengeschalteten Radiodetektors, mit dem Abbauprodukt P2 überein. Einen weiteren Abgleich stellt der CCS-Wert dar, der mittels Ionenmobilität aufgenommen wurde. Der CCS-Wert des DKP-Standards stimmt mit dem Wert von P2 überein. Für die finale Identifizierung wurde eine aufgearbeitete ¹⁴C-Aspartam-Teigprobe nachträglich mit der DKP-Standardlösung dotiert und mittels Radio-HRMS vermessen. Die Ergebnisse zeigten eine deutlich höhere Peakfläche bei der DKP-dotierten Probe im Vergleich zur nicht-dotierten Probe. In Abbildung 38 ist die Bildung des Abbauproduktes 5-Benzyl-3,6-

dioxo-2-piperazin-essigsäure dargestellt. Die Hitze führt zu einer Cyclisierung des Aspartam-Moleküls und zur Abspaltung von Methanol.

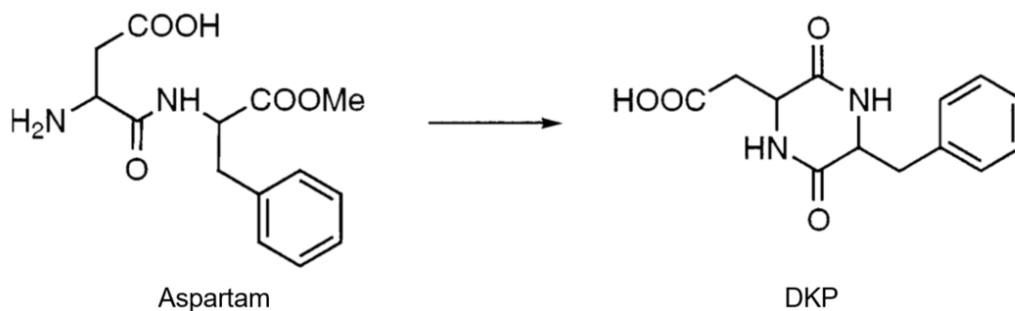


Abbildung 38: Bildungsweg des Abbauprodukts P2 bzw. DKP [105]

Um zu untersuchen, wie viel von dem eingesetzten Aspartam zu DKP cyclisiert, wurde eine Matrix-matched-Kalibrierung durchgeführt. Dazu wurde eine Teig-Leerwert-Probe mittels QuEChERS-Extraktion aufgearbeitet und dem Extrakt eine DKP-Standardlösung in unterschiedlichen Konzentrationen hinzudotiert. Über die ermittelten Peakflächen und bekannten Konzentrationen des Standards konnte anschließend eine Kalibriergerade erstellt werden (siehe Abbildung 69 im Anhang). Die Proben für die Ermittlung der Kalibriergeraden wurden zweimal vermessen, um ein präzises Ergebnis zu erhalten. In Abbildung 69 sind ergänzend die Geradengleichung und der Determinationskoeffizient eingetragen. Mithilfe der Gleichung und aus den Peakflächen des Abbauproduktes P2 kann der Gehalt des Abbauproduktes berechnet werden (siehe Tabelle 41).

Tabelle 41: berechnete Konzentration und Gehalt an DKP aus der Geradengleichung

	Berechnete Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Gehalt im Kleingebäck [$\mu\text{g/g}$]
QuEChERS-Extraktion	815	0,202

Die eingesetzte Aktivität von 20 kBq/g mit einer spezifischen Aktivität des Aspartams von 100 mCi/mmol ergab als Gehalt des Aspartams 1,65 $\mu\text{g/g}$. Unter der Annahme einer vollständigen Extraktion des DKP wurden im QuEChERS-Extrakt 12,3 % des eingesetzten Aspartams in DKP umgewandelt.

Strukturaufklärung des Abbauproduktes P6

Mithilfe des Programms Compound Discoverer wurden für das Abbauprodukt P6 die Summenformel $C_{12}^{14}CH_{15}NO_4$ (neutrale Spezies) sowie die dazugehörigen m/z-Verhältnisse 252,11098 (ESI pos.) und 250,09502 (ESI neg.) ermittelt. Die Massen entsprechen dem einfach ^{14}C -markierten Isotop. Darüber hinaus wurden die zweifach und dreifach markierten Massen mit den dazugehörigen spezifischen Isotopenverhältnissen in den Proben gefunden (siehe Tabelle 42). Die exakten Massen und Summenformeln wurden ebenfalls mittels der Vion-IMS-QToF und Q Exactive™ Plus bestätigt.

Tabelle 42: Summenformelvorschläge und m/z für das Abbauprodukt P6 mit dem entsprechenden Isotopenverhältnis

Summenformel-Vorschlag (ESI neg.)	m/z ESI neg.	Isotopenverhältnis [%]
$^{12}C_{12} \ ^{14}C \ H_{14} \ N \ O_4$	250,09526	100
$^{12}C_{11} \ ^{14}C_2 \ H_{14} \ N \ O_4$	252,09855	85
$^{12}C_{10} \ ^{14}C_3 \ H_{14} \ N \ O_4$	254,10178	49

Das Isotopenverhältnis des Abbauproduktes P6 entspricht dem Isotopenverhältnis des ^{14}C -Aspartams aus Tabelle 39. In der Leerwert-Probe wurden diese Massen nicht gefunden. Zu diesem Abbauprodukt gab es keinen passenden Vorschlag in der Literatur. Um Strukturinformationen über das unbekannte Abbauprodukt zu erhalten, wurden gezielte MS/MS-Experimente (t-SIM/PRM) durchgeführt. Das Abbauprodukt P6 zeigte sich insbesondere bei hohen Temperaturen und langer Erhitzungsdauer. Aus diesem Grund wurde ^{12}C -Aspartam in hoher Konzentration zu Rapsöl dotiert, für 60 Minuten bei 190 °C erhitzt und mit der oben beschriebenen Methode aufgearbeitet. Mit der ^{14}C -dotierten und der ^{12}C -dotierten Rapsöl-Probe wurden anschließend Fragmentierungsexperimente durchgeführt. Zusätzlich wurden der ^{12}C -Aspartam-Standard und eine Leerwert-Probe, bestehend aus der extrahierten Rapsöl-Probe ohne hinzudotiertem Aspartam, mitgemessen. Das entsprechende MS/MS-Fragment-Spektrum des nicht radioaktiven Abbauprodukts ist in Abbildung 39 dargestellt.

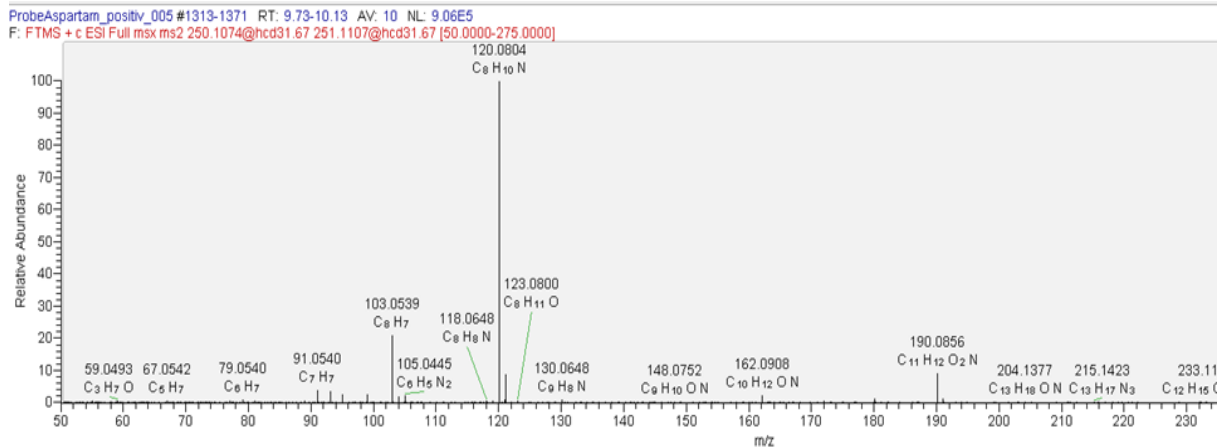


Abbildung 39: MS/MS-Fragment-Spektrum des m/z 250,1073 (ESI pos) von dem ^{12}C -Isotop ($^{12}\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_4$) des Abbauproduktes P6, aufgenommen mittels Q Exactive™ Plus

Ein besonders prominentes Fragment ist bei m/z 120,0804 (Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}$) ersichtlich. Dieses kann durch die gebildeten Fragmente im Standard erklärt werden. Das Fragment-Spektrum des ^{12}C -Aspartam Standards ist im Anhang (siehe Abbildung 70 im Anhang) dargestellt. In Abbildung 40 ist die Bildung des prominenten Fragmente 120,0804 ausgehend von dem Aspartam dargestellt.

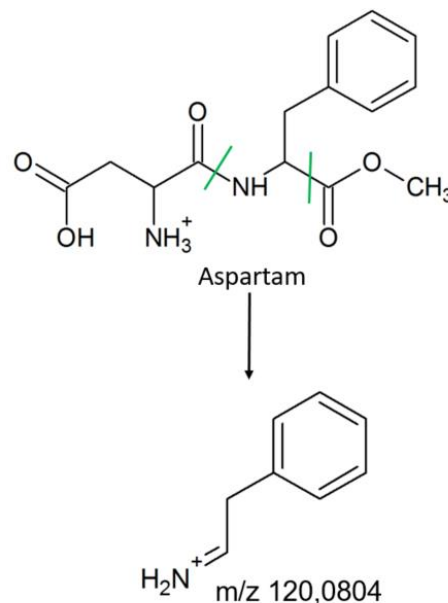


Abbildung 40: mögliche Bildung des Fragments m/z 120,0804 ausgehend von Aspartam

Das Fragment 120,0804 entsteht durch einen Bruch zwischen der Peptidbindung und der Abspaltung der Ester-Gruppe. Dieses Fragment zeigt, dass das Abbauprodukt P6 einen Phenylring an der Aminogruppe gebunden hat. Somit ist diese Struktur des Aspartam-Moleküls intakt geblieben.

Ein weiteres Fragment wurde bei 180,1012 m/z (ESI pos) mit der Summenformel $C_{10}H_{14}O_2N$ gefunden. Dieses Fragment wurde nicht im Aspartam-Standard detektiert. Anhand der Ausgangsstruktur von Aspartam können zwei Strukturvorschläge für dieses Fragment abgeleitet werden (siehe Abbildung 41).

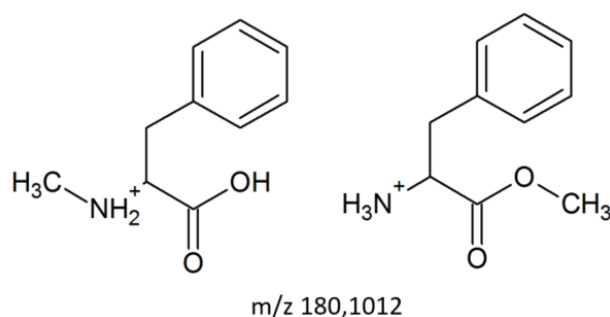


Abbildung 41: mögliche Strukturen für das Fragment mit m/z von 180,1012

Weitere Fragmente, die ebenfalls nicht im Aspartam-Standard vorkommen, sind die Fragmente bei 162,0908 (ESI pos) und 190,0856 (ESI pos) mit den zugehörigen Summenformeln: $C_{10}H_{12}O_2N$ und $C_{11}H_{12}O_2N$. Zu diesen Summenformeln wurden ebenfalls Strukturvorschläge erstellt (siehe Abbildung 42).

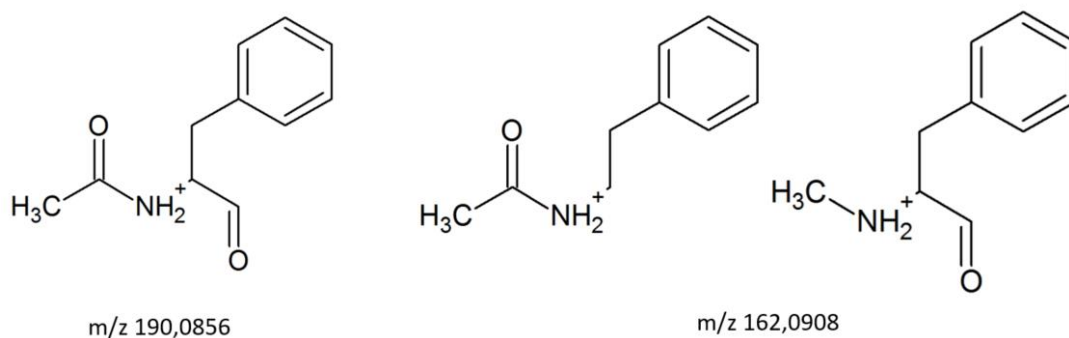


Abbildung 42: Strukturvorschläge für die Fragmente mit m/z 190,0856 und 162,0908

Aus den Strukturmöglichkeiten der einzelnen Fragmente können für das Abbauprodukt P6 und dem Summenformelvorschlag $C_{13}H_{15}NO_4$ (neutrale Spezies) vier mögliche Strukturvorschläge abgeleitet werden (siehe Abbildung 43).

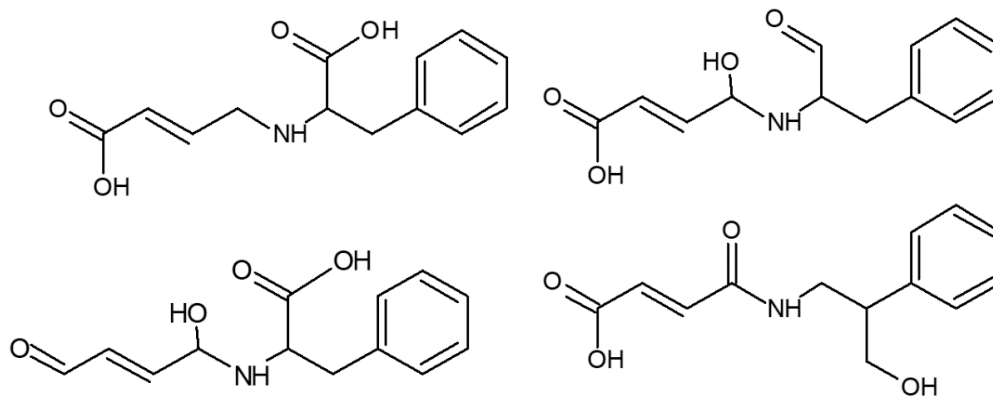


Abbildung 43: mögliche Strukturen für das Abbauprodukt P6 (Summenformel $C_{13}H_{15}NO_4$)

Die oben angeführten Strukturvorschläge entsprechen der neutralen Spezies und stimmen mit dem gemessenen m/z sowie dem Summenformelvorschlag überein.

4.2.3.5 Erhitzungsversuch Kaffee

Für die Überprüfung der thermischen Stabilität von Aspartam als Süßungsmittel in Heißgetränken wurde ein Versuch mit Kaffee durchgeführt. Dazu wurde zu einem aufgebrühten Kaffee der ^{14}C -Aspartam-Standard hinzudotiert und die Proben wurden mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen. Exemplarisch für die Messungen ist das Radio-Chromatogramm in Abbildung 44 dargestellt.

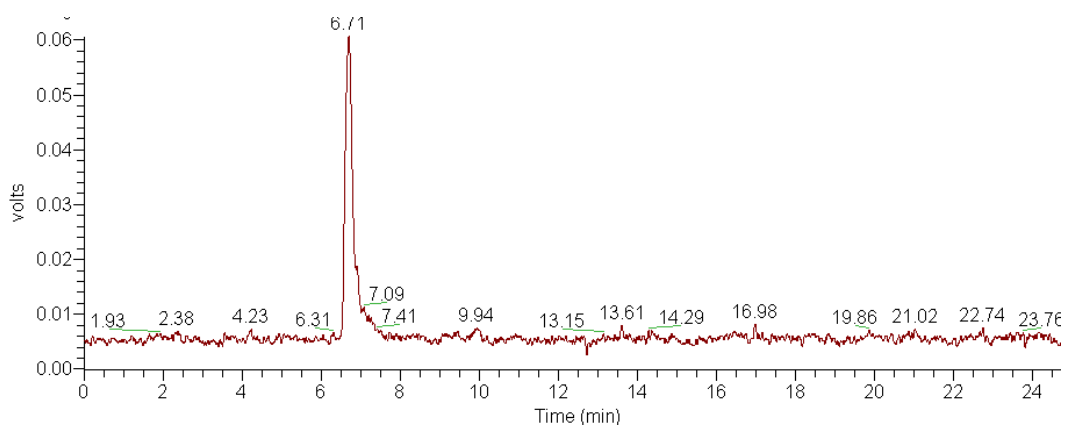


Abbildung 44: Radio-Chromatogramm des ^{14}C -Aspartams in heißem Kaffee

Ein deutlicher Radio-Peak ist bei 6,7 min zu erkennen. Durch Retentionszeit, Masse und spezifisches Isotopenverhältnis konnte dieser eindeutig dem ^{14}C -Aspartam zugeordnet werden. Die Aktivität nach dem Hinzudotieren zu heißem Kaffee wurde mittels LSC-Messung durchgeführt. Es zeigte sich kein Verlust an Radioaktivität.

Um den physikalischen Einfluss von Mikrowellen auf die Stabilität des Aspartams zu untersuchen, wurde der abgekühlte Kaffee in einer Mikrowelle erwärmt. In Abbildung 45 ist das entsprechende Radio-Chromatogramm abgebildet.

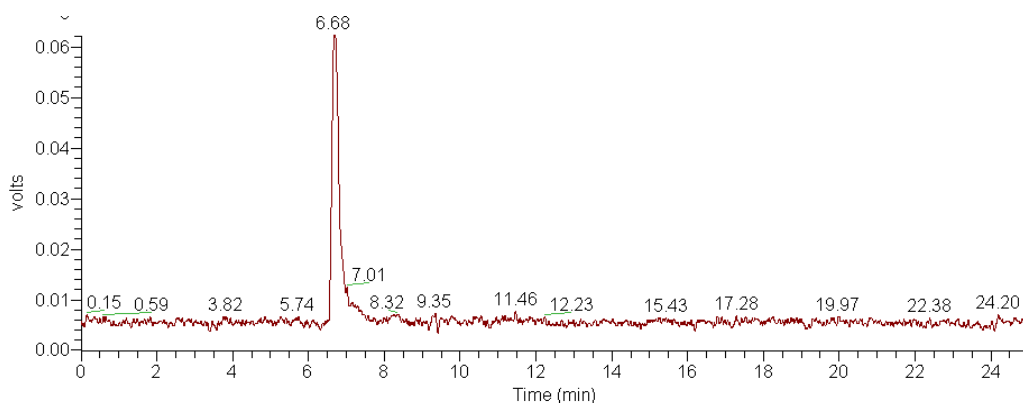


Abbildung 45: Radio-Chromatogramm des ^{14}C -Aspartams in Kaffee und der anschließenden Erwärmung in einer Mikrowelle

In der oben dargestellten Abbildung ist ebenfalls ein deutlicher Radio-Peak bei 6,7 Minuten zu sehen, der eindeutig dem ^{14}C -Aspartam zugeordnet werden konnte. Es wurde ebenfalls kein Verlust an Aktivität mittels LSC festgestellt.

Somit kam es, mit den in diesem Experiment angewandten Parametern, zu keiner nachweisbaren Degradation des ^{14}C -Aspartam-Moleküls mittels Radiodetektor.

4.2.3.6 Erhitzungsversuche in wässrigen Lösungen

Um die Stabilität des Aspartam-Moleküls während eines Koch-Prozesses zu untersuchen, wurden Erhitzungsexperimente mit Wasser durchgeführt. Dazu wurden jeweils 8 mL H_2O in Pyrex-Gläschen pipettiert, mit dem ^{14}C -Aspartam versetzt und 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten in einem Konvektomaten bei 130°C erhitzt. Zusätzlich wurde eine Referenzprobe angesetzt und nicht erhitzt. Die Proben wurden anschließend zur Bestimmung des Verbleibs der Aktivität mittels LSC

vermessen. Dabei war kein Verlust an Aktivität über die Erhitzungsdauer festzustellen. In Abbildung 46 sind die Radio-Chromatogramme nach 10 Minuten und 180 Minuten dargestellt.

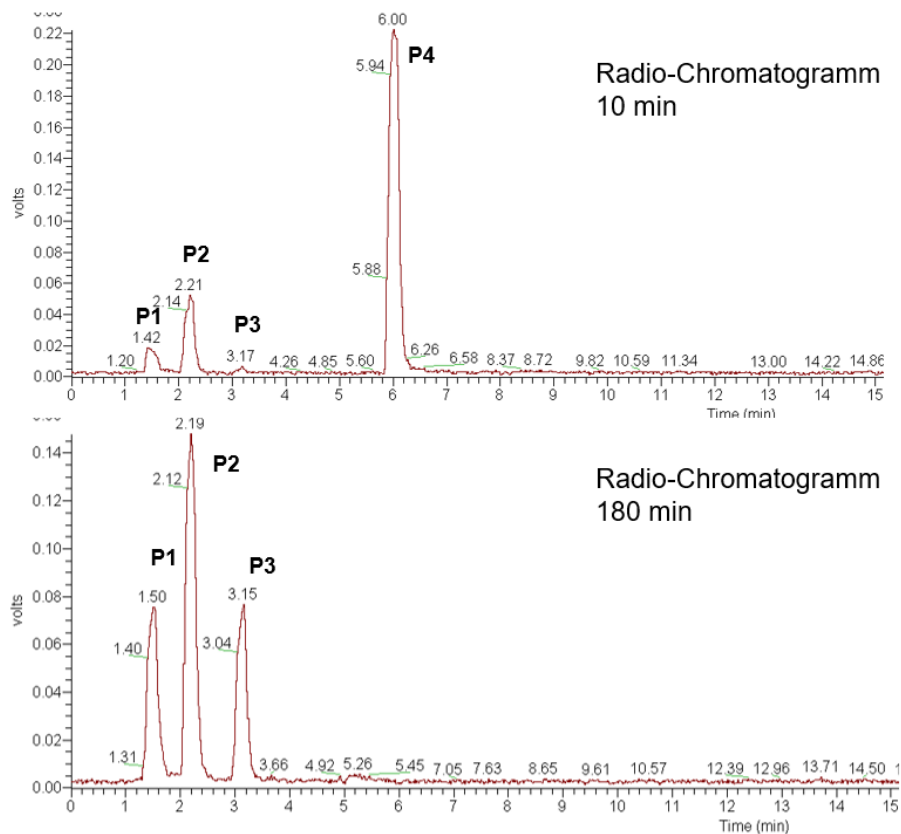


Abbildung 46: Radio-Chromatogramme des Stabilitätsversuches von ^{14}C -Aspartam in Wasser nach 10 Minuten und 180 Minuten bei $130\text{ }^{\circ}\text{C}$

In dem Radio-Chromatogramm nach 10 Minuten sind deutliche Peaks bei 1,5 sowie 2,2 und 6 Minuten ersichtlich. Bei P4 handelt es sich um Aspartam und bei P2 um das bereits in vorherigen Experimenten identifizierte DKP. Für das Abbauprodukt P1 wurde mittels Compound Discoverer die Summenformel $^{14}\text{C}^{12}\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$ (neutrale Spezies) vorgeschlagen. Diese Summenformel entspricht der Abspaltung einer Methylgruppe an der Carbonsäure-Estergruppe des Aspartams und wurde bereits in der Literatur beschrieben [14]. Beim Abbauprodukt P1 handelt es sich somit um L-Aspartyl-Phenylalanin. Mittels eines L-Aspartyl-Phenylalanin-Standards wurde dieses Abbauprodukt eindeutig identifiziert. In Abbildung 47 ist der Bildungsweg dargestellt.

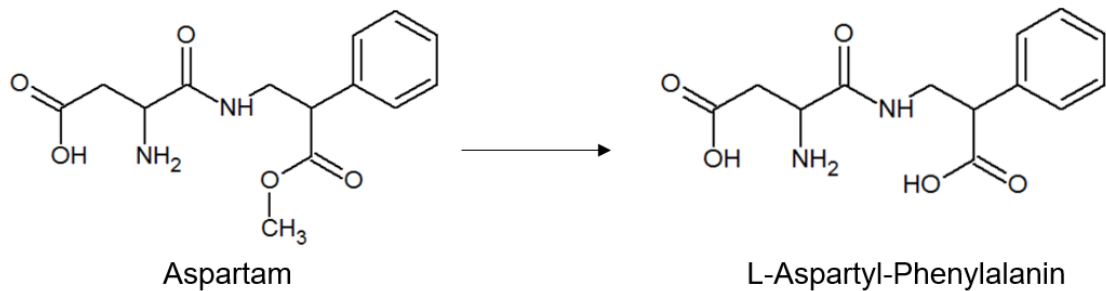


Abbildung 47: Bildungsweg des L-Aspartyl-Phenylalanins aus Aspartam

Bei der Hydrolyse des Aspartams kommt es zur Bildung von L-Aspartyl-Phenylalanin sowie zur Freisetzung von Methanol. Bei 3,2 Minuten ist das Abbauprodukt P3 ersichtlich. Für dieses konnte mittels Compound Discoverer kein Summenformel Vorschlag generiert werden. In Abbildung 48 ist der Verlauf der Bildung der Abbauprodukte über die Zeit dargestellt.

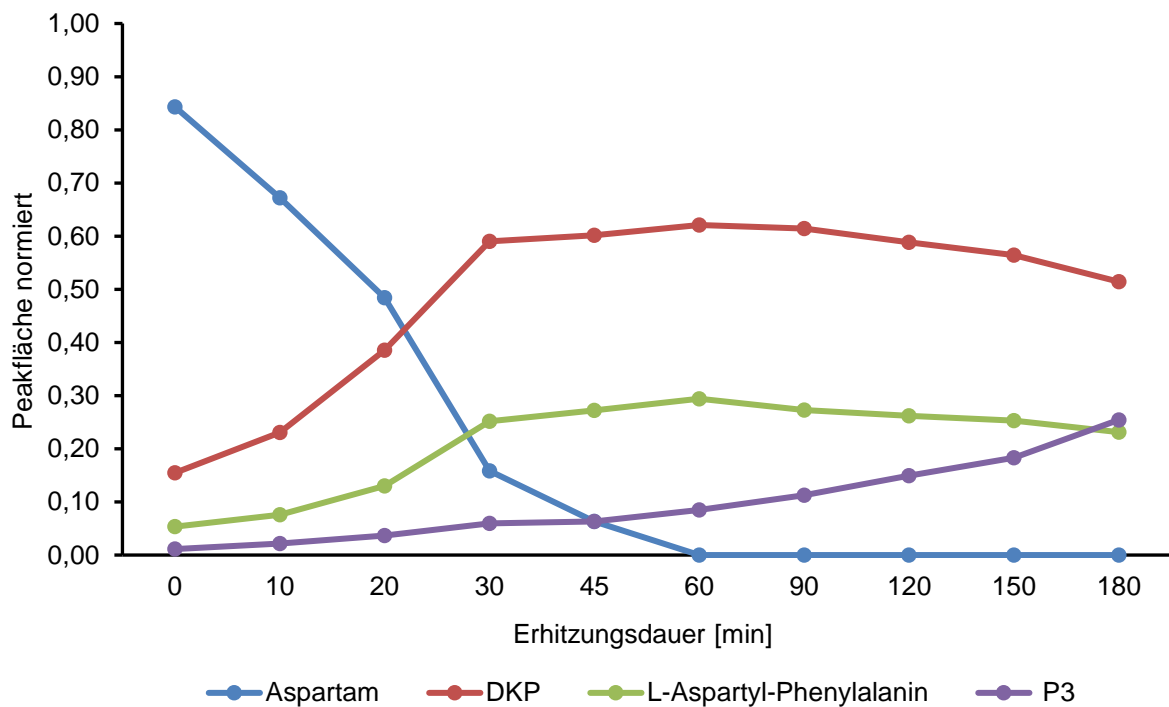


Abbildung 48: Verlauf der Bildung der Abbauprodukte des Aspartams in H₂O bei 130 °C

Auf der x-Achse ist die Erhitzungsdauer aufgetragen und auf der y-Achse sind die auf die Gesamtfläche aller Peaks normierten Peakflächen angegeben. Nach 60 Minuten Erhitzen bei 130 °C wurde kein Aspartam mehr detektiert. Zwischen 20 und 30 Minuten

ist zudem der höchste Anstieg des Abbauproduktes DKP zu beobachten. Bei 3,2 Minuten ist jedoch ein neues Abbauprodukt entstanden. Weiter ist festzuhalten, dass auch bei 0 Minuten Erhitzungsdauer die drei Abbauprodukte des Aspartams zu finden waren.

Um die Stabilität des Aspartam-Moleküls während eines Koch-Prozesses in Cola zu untersuchen, wurde eine Lösung mit $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_3\text{PO}_4$ mit einem pH-Wert von 3 angesetzt. Hintergrund dieses Experiments war es eine Cola Light Matrix zu simulieren und die Stabilität nach unterschiedlich langer Kochzeiten zu untersuchen. Die Versuchsdurchführung entsprach genau der des Wasser-Versuches. Die Proben wurden anschließend mittels LSC vermessen, um den Verbleib der Aktivität zu bestimmen. Dabei war kein Verlust an Aktivität über die Erhitzungsdauer festzustellen. In Abbildung 49 sind die Radio-Chromatogramme nach 10 Minuten und 180 Minuten dargestellt.

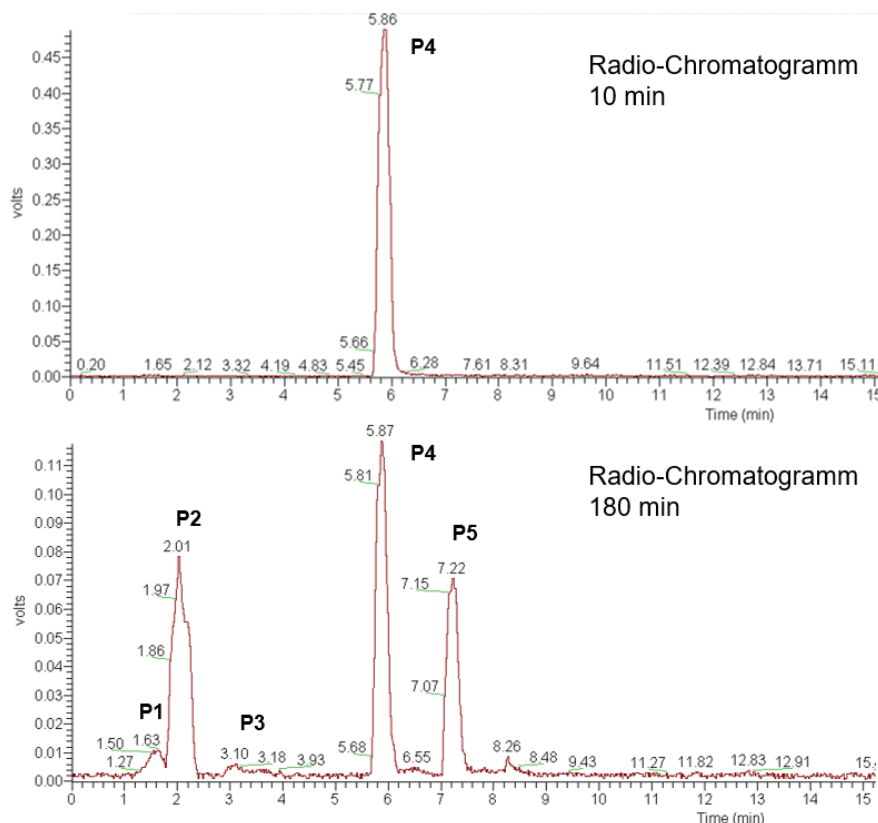


Abbildung 49: Radio-Chromatogramme des Stabilitätsversuches von ^{14}C -Aspartam in Wasser + H_3PO_4 nach 10 Minuten und 180 Minuten bei 130 °C

Beim Radio-Chromatogramm nach 10 Minuten Erhitzen ist ein deutlicher Peak erkennbar. Hierbei handelt es sich um den ^{14}C -Aspartam-Peak bei 5,9 Minuten. Nach 180 Minuten sind weitere deutliche Radiopeaks bei 2 Minuten und 7,2 Minuten zu erkennen. Beim Radiopeak bei 2 Minuten handelt es sich um das identifizierte DKP. Das Abbauprodukt P5 bei 7,2 Minuten stellt eine unbekannte Verbindung dar. Mit der Software wurde hierfür der Summenformel-Vorschlag $\text{C}_9^{14}\text{CH}_{13}\text{NO}_2$ (neutrale Spezies) generiert. Aufgrund der Summenformel und des sauren pH-Werts wurde das Hydrolyse-Produkt ^{14}C -Phenylalanin-Methylester ($\text{C}_9^{14}\text{CH}_{13}\text{NO}_2$) vermutet. Das m/z-Verhältnis 134,0441 (ESI pos) eines weiteren Hydrolyse-Produktes Asparaginsäure ($\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$) wurde im Massenspektrum detektiert. Mit den entsprechenden Standards konnte diese Vermutung bestätigt werden. Der Radiopeak bei 7 Minuten wurde eindeutig als ^{14}C -Phenylalanin-Methylester identifiziert. Das m/z 134,0041 konnte mittels Standard eindeutig der Asparaginsäure zugeordnet werden. Aufgrund der radioaktiven Markierung des ^{14}C -Standards im Phenylring ist für das Abbauprodukt Asparaginsäure kein Radiopeak im oben angeführten Chromatogramm erkennbar. In Abbildung 50 ist die Bildung der Abbauprodukte dargestellt.

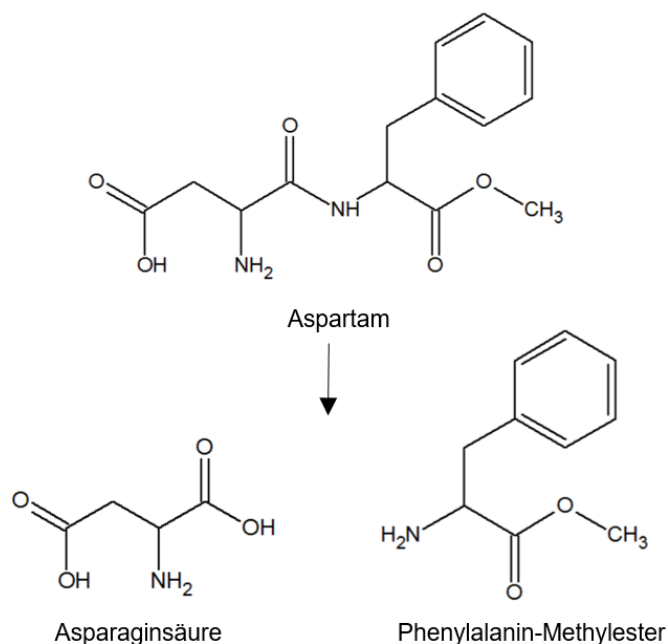


Abbildung 50: Bildung der Abbauprodukte Asparaginsäure und Phenylalanin-Methylester aus Aspartam

Es kommt zur Spaltung der Peptid-Bindung des Aspartam-Moleküls. In Abbildung 51 ist der Verlauf der Bildung der Abbauprodukte über die Zeit dargestellt.

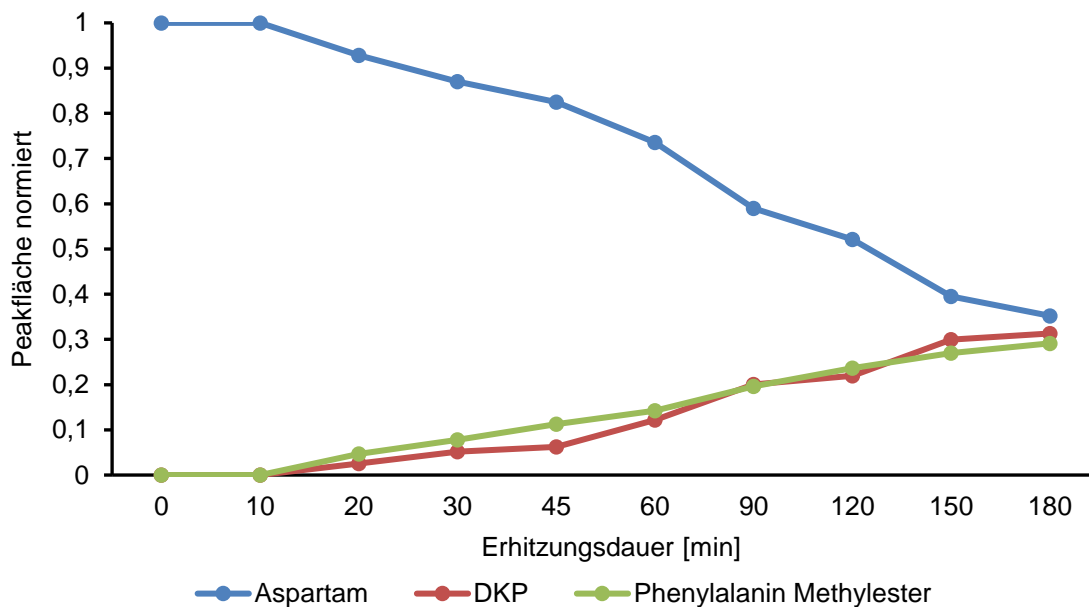
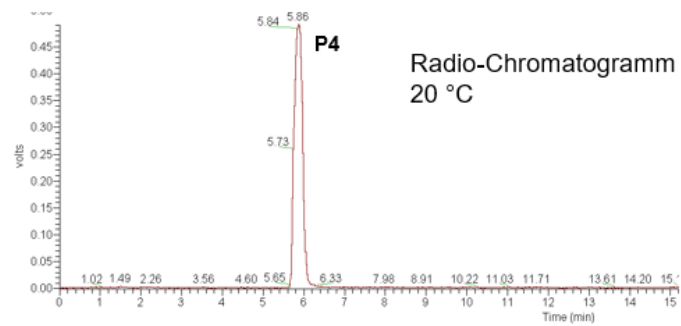


Abbildung 51: Verlauf der Bildung der Abbauprodukte des Aspartams in $H_2O + H_3PO_4$ bei 130 °C

Auf der x-Achse ist die Erhitzungsdauer aufgetragen und auf der y-Achse sind die auf die Gesamtfläche aller Peaks normierten Peakflächen angegeben. Die Bildung der Abbauprodukte beginnt ab einer Erhitzungsdauer von 10 Minuten und nimmt über die Zeit zu. Das ^{14}C -Aspartam wurde auch noch nach 180 Minuten Erhitzen detektiert. Somit kam es zu keinem vollständigen Abbau des Aspartam-Moleküls.

Letztlich wurde die Stabilität von ^{14}C -Aspartam über 24 Stunden bei 20 °C, 40 °C und 60 °C in einer Lösung mit $H_2O + H_3PO_4$ untersucht. Hintergrund dieses Versuches war die Untersuchung der Stabilität von Aspartam in einer Cola Light bei einer Temperatur von 20°C. Des Weiteren wurde die Stabilität bei höheren Temperaturen von 40°C und 60°C untersucht, da diese in einem parkenden Auto in der Sonne schnell erreicht werden [106]. In Abbildung 52 sind die drei Radio-Chromatogramme dargestellt.



P1: L-Aspartyl-Phenylalanin
 P2: DKP
 P4: Aspartam
 P5: Phenylalanin-Methylester

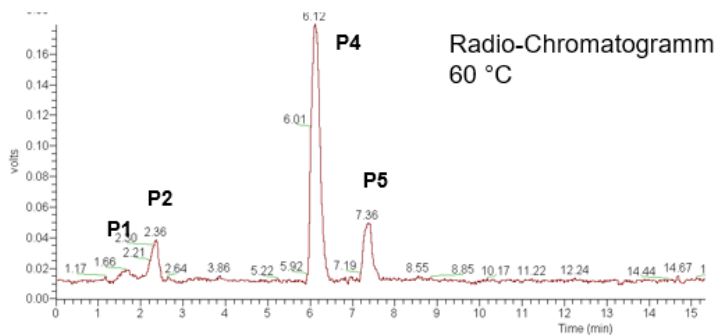
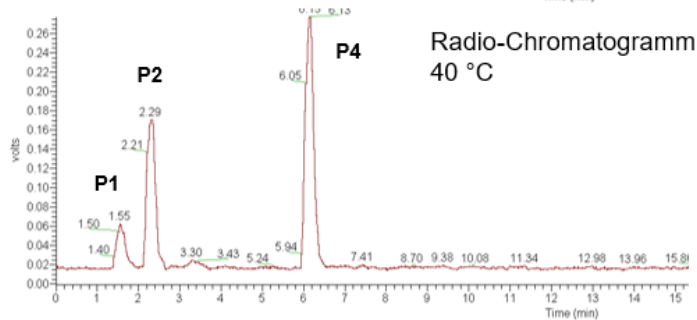


Abbildung 52: Radio-Chromatogramme des Stabilitäts-Versuch von ^{14}C -Aspartam in einer simulierten Cola Light Matrix bei 20 °C, 40 °C und 60 °C über 24 Stunden

In Abbildung 52 wird ersichtlich, dass es bei 20 °C zu keiner messbaren Bildung von Abbauprodukten kam. Bei 5,9 Minuten wurde ein klarer Peak erfasst, der dem ^{14}C -Aspartam-Peak entspricht. Bei 40 °C ist es zur Bildung der Abbauprodukte L-Aspartyl-Phenylalanin und DKP gekommen. Bei 60 °C kam es zusätzlich zur Bildung des Phenylalanin-Methylesters.

Identifizierung des Abbauproduktes P3 mittels NMR

Um das unbekannte Abbauprodukt P3 zu identifizieren, wurde eine spektroskopische Methode, NMR, herangezogen. Hierfür musste zunächst das Abbauprodukt in ausreichender Menge isoliert werden. Dabei wurde ein Wert von 200 μg Abbauprodukt angestrebt.

Als erste Möglichkeit wurde eine Anreicherung mittels verschiedener SPE-Materialien untersucht. Dabei zeigte sich bei den Umkehrphasen-Materialien Strata X (Phenomenex) und HLB Prime (Waters) keinerlei Retention. Alle drei Abbauprodukte wurden in der Fraktion der Probenaufgabe mittels Radio-UHPLC-HRMS detektiert. Die Trennung nach funktionellen Gruppen mittels eines Anionen-Austauschers zeigte eine vollständige Retention der Abbauprodukte, bei der Probenauftragung jedoch wurden alle drei gleichzeitig mittels MeOH + 2 % FA von der Kartusche eluiert. Die Trennung mittels eines Kationen-Austauschers zeigte eine Retention auf dem Kartuschen-Material. Bei der Elution mit MeOH wurden jedoch das Abbauprodukt P2 und P3 gleichzeitig vom Kartuschen-Material gewaschen.

Als nächste Möglichkeit wurde versucht, eine HPLC Methode zu entwickeln, um die gewünschte Menge des unbekannten Abbauproduktes zu fraktionieren. Dabei wurde im ersten Schritt die entwickelte Methode der UHPLC (Waters Acquity C18) auf eine HPLC (Phenomenex Luna C18) übertragen. In Abbildung 53 sind die Radio-Chromatogramme darstellt.

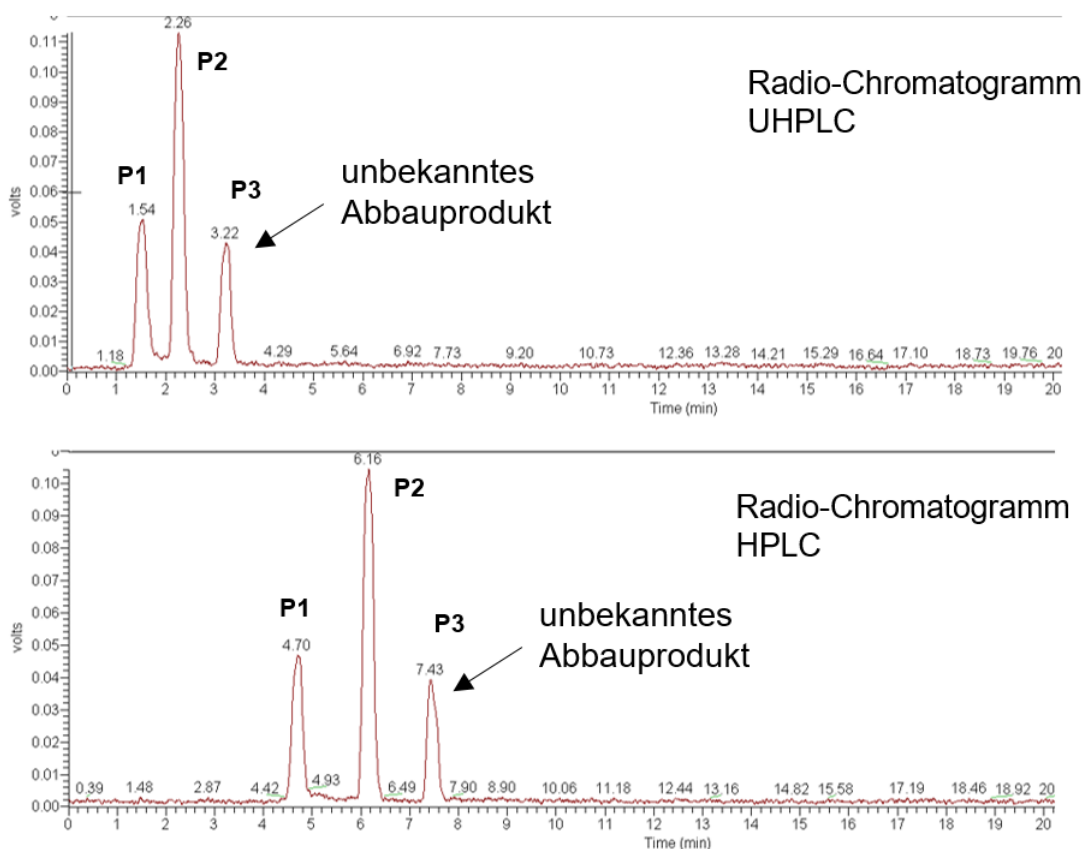


Abbildung 53: Vergleich UHPLC-C18 Säule mit einer HPLC-C18 Säule von einer ^{14}C -Aspartam H_2O Lösung

Das mittels HPLC-Säule gemessene Radio-Chromatogramm zeigte ebenfalls drei deutlich voneinander getrennte Radio-Peaks mit erhöhter Retentionszeit. Da Salze die NMR-Signale überlagern, wurde die gleiche Methode ohne NH_4Ac im Fließmittel untersucht. Bei dieser Messung wurde ein einzelner Peak bei 2,5 Minuten detektiert. Somit konnten die drei Abbauprodukte ohne Puffer im Fließmittel nicht mehr voneinander aufgetrennt werden (siehe Abbildung 72 im Anhang). Die Zusätze von Ameisensäure und Ammoniakwasser zeigten ebenfalls keine ausreichende Trennung für eine Fraktionierung (siehe Abbildung 73 und Abbildung 74 im Anhang).

Als alternative Option wurde eine NMR-Messung der nicht aufgereinigten Probe durchgeführt. Diese Option wurde in Betracht gezogen, da die anderen beiden Produkte bekannt waren. Mittels eines 700 MHz-NMR-Spektroskops wurden eindimensionale und zweidimensionale Spektren aufgenommen. Die aufgenommenen ^1H -NMR-, COSY-, HMBC- und HSQC-Spektren sind in Abbildung 75 bis Abbildung 83 im Anhang dargestellt. Für das ^{13}C -NMR- und das DEPT 135 -Spektrum reichte die Substanzmenge nicht aus. Im TOCSY wurden die Spektren durch Wasser-Rückstände zu stark für eine Interpretation überlagert.

Mittels des ^1H -NMR-Spektrums konnten starke Resonanzen dem Abbauprodukt DKP (P2) zugeordnet werden. Ebenfalls wurden Resonanzen zu dem Abbauprodukt L-Aspartyl-Phenylalanin (P1) zugeordnet. Die verbliebenen Resonanzen ließen die Strukturen von Isopropanol und *tert*-Butanol vermuten. Mittels dem COSY-Spektrum wurde für das Isopropanol eine Kopplung benachbarter Protonen nachgewiesen (siehe Abbildung 77). Im COSY-Spektrum wurden keine direkt benachbarten Protonen für das *tert*-Butanol gefunden. Da das *tert*-Butanol keine direkt benachbarten Protonen aufweist, ist dies eine weitere Bestätigung der Struktur. Mittels dem HSGC-Spektrum wurde untersucht, welche C-Atome direkt benachbart mit welchen H-Atomen sind. Abbildung 79 zeigt die Zuordnung einer ungeraden Anzahl an H-Atomen zu dem C-Atomen des *tert*-Butanol und des Isopropanols. Für die OH-Funktionen wurden keine Signale im HSGC-Spektrum gefunden (siehe Abbildung 80). Dadurch konnte bestätigt werden, dass es sich bei diesen Signalen aus den Protonen-Spektren um eine OH-Funktion handeln muss. Mittels des HMBC-Spektrums wurde eine Langstrecken-Kopplung der beiden CH_3 -Gruppen des Isopropanols gefunden (siehe Abbildung 82).

In Abbildung 83 ist die Langstrecken-Kopplung der OH-Gruppen von Isopropanol und *tert*-Butanol dargestellt.

Die Resonanzen aus den eindimensionalen und zweidimensionalen NMR-Spektren zeigten deutliche Hinweise für die Strukturen Isopropanol und *tert*-Butanol. Dennoch wurden diese Strukturen nicht als Abbauprodukte des Aspartams angenommen. Gründe hierfür waren die Retentionszeit von 3,2 Minuten auf einer C18 Säule und keine Bestätigung der Substanzen mittels der Daten der UHPLC-HRMS Messung. Im Massenspektrum wurden die Massen dieser beiden Produkte weder im ESI-positiv- noch im ESI-negativ-Modus gefunden. Somit war eine Identifizierung des Abbauproduktes P3 nicht möglich.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Verbleib ausgewählter Substanzen nach der Verdauung und verschiedenen Lebensmittelverarbeitungsprozessen untersucht. Der erste Teil befasste sich mit dem Verbleib von zwei Lebensmittelinhaltsstoffen während der Verdauung. Der zweite Teil behandelte Lebensmittelverarbeitungsprozesse. Zur besseren Übersicht werden die Ergebnisse im Folgenden in einzelnen Kapiteln diskutiert. Abschließend folgen für die jeweiligen Teile der Arbeit versuchsübergreifende Diskussionen sowie eine Einordnung der Gesamtergebnisse.

5.1 Verbleib von Lebensmittelinhaltsstoffen nach der Verdauung

In Zusammenarbeit mit der Monash-Universität in Melbourne und dem Fraunhofer Institut IME wurde eine Fütterungsstudie mit Schweinen durchgeführt. Das Vorhaben dieser Studie war die Untersuchung des Verbleibs der Ausgangssubstanzen bzw. deren Metabolite im Körper. Für die Nachverfolgung wurden ^{14}C -markierte Standards eingesetzt. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung geeigneter Probenvorbereitungsmethoden, Extraktionsverfahren sowie analytischer Methoden, um Hilfestellungen für die Identifizierung der Metabolite zu leisten.

5.1.1 Tyrosin

Die Aminosäure Tyrosin wurde in den Matrices Plasma, Darm, Cerebellum und Exkremente untersucht. Dabei erfüllten einzig die Exkrement-Proben die Anforderung in Bezug auf die Nachweisgrenze von mindestens 1 kBq/g. In den anderen Matrices wurde mittels aufwendiger Extraktionsmethoden und Aufkonzentrierungsschritte versucht, die Nachweisgrenze von 1 kBq/g zu erzielen. Die Entwicklung der Extraktionsmethode wurde jeweils mit Proben der Kontrollgruppen und hinzudotiertem ^{14}C -Tyrosin durchgeführt. Dies ermöglichte die Nachverfolgung der Radioaktivität nach jedem Extraktionsschritt. Die Extraktionsmethoden konnten jedoch nur auf die Ausgangsverbindung, das ^{14}C -Tyrosin, spezifiziert werden und nicht auf mögliche Metabolite.

Die entwickelte Extraktionsmethode für das ^{14}C -Tyrosin aus Plasma zeigt eine Wiederfindungsrate von $89 \pm 2,9\%$. Damit wurde ein zufriedenstellender Wert von über 80, wie in vergleichbarer Literatur angegeben, erreicht [107]. Im Vergleich zu Methoden aus der Literatur wurde die Wiederfindungsrate auf die einsetzte Aktivität bezogen und konnte dadurch leicht ermittelt werden. Ohne den Einsatz radioaktiver Substanzen kann die Extraktions-Effizienz mittels dem Vergleich der Peak-Flächen der pre und post dotierten Proben bestimmt werden [108]. Als Methode wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit MeOH + 5 % FA und anschließender Reinigung mit HLB-Prime-SPE gewählt. Extraktionsmethoden aus der Literatur wie Protein-Präzipitation oder einfache Flüssig-Flüssig-Extraktion mit organischen Lösungsmitteln wurden im Vorfeld untersucht, konnten aber aufgrund der Aufkonzentrierung nicht herangezogen werden [109]. Bei Anwendung der entwickelten Methode auf die ^{14}C -Tyrosin-Plasmaprobe der Schweinestudie zeigte sich eine wesentlich niedrigere Wiederfindungsrate von 28,3 %. Nach dem Abdampfen mittels Stickstoffstrom bis zur Trockene und dem Lösen in MeOH + 3 % FA fiel die Wiederfindungsrate auf 12%. Hierbei handelte es sich entweder um flüchtige Verbindungen, die während des Trocknungsprozesses verloren gingen oder um Verbindungen die sich nicht mehr beim Resuspendieren gelöst haben. Die Probe der Methanol-Extraktion konnte mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen werden. Aufgrund der zu niedrigen Aktivität von 6 Bq/20 μl Injektionsvolumen wurde kein Radiopeak erfasst. Um mögliche lipophile Metabolite zu extrahieren, wurde eine Hexan-Extraktion durchgeführt. Die Wiederfindungsrate betrug 0 %, was darauf schließen lässt, dass aus dem Tyrosin keine lipophilen Metabolite entstanden sind. Um weitere Informationen bezüglich des Verbleibs der Aktivität zu erhalten, wurde eine Fällung mit ACN durchgeführt. In der ACN-Phase wurde keine Radioaktivität nachgewiesen, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass das ^{14}C -Tyrosin in Proteine eingebaut wurde und folglich nicht extrahiert werden konnte. Um sicherzustellen, dass das ^{14}C -Tyrosin selbst nicht durch ACN ausgefällt wurde, wurde ein zusätzliches Experiment durchgeführt. Eine Plasmaprobe von einem Schwein aus der Kontrollgruppe wurde mit dem ^{14}C -Tyrosin versetzt und eine Proteinfällung mit ACN durchgeführt. Die Wiederfindungsrate nach der Proteinfällung betrug 100 %. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das ^{14}C -Tyrosin nicht durch ACN gefällt wurde und, dass das an das Schwein verfütterte ^{14}C -Tyrosin höchstwahrscheinlich in Proteine eingebaut wurde. Um Informationen über die in Methanol löslichen Metabolite zu erlangen, müsste man mindestens 4 mL Plasma

aufkonzentrieren. Aufgrund der nicht ausreichenden Probenmenge von insgesamt 3 mL Plasma war dies nicht möglich.

Als zweite Matrix wurden Darm-Proben untersucht. Die Methodenentwicklung mittels hinzudotiertem ^{14}C -Tyrosin zeigte eine zufriedenstellende Wiederfindungsrate von $86 \pm 2,3 \%$. Auch für diese Matrix konnte nicht auf bereits entwickelte Methoden aus der Literatur wie einfache Fest-Flüssig-Extraktion mit organischen Lösungsmittel zurückgegriffen werden [110]. Aufgrund der Aufkonzentrierung wurde ein weiterer Schritt mittels SPE-Aufreinigung durchgeführt. Die Anwendung der Methode auf die ^{14}C -Tyrosin-Darm-Proben der Fütterungsstudie zeigte für die Methanol-Extraktion und die SPE-Aufreinigung eine Wiederfindungsrate von $29,5 \pm 6,2 \%$. Nach dem Abdampfen mittels Stickstoffstrom bis zur Trockene und dem Lösen in MeOH + 3 % FA fiel die Ausbeute auf $4,2 \pm 1,2 \%$. Bei der mit 25,3 % verlorenen Aktivität handelte es sich wahrscheinlich um flüchtige oder nicht mehr lösliche Abbau- oder Metabolismusprodukte des Tyrosins. Dies wurde ebenfalls bei der ^{14}C -Tyrosin-Plasmaprobe beobachtet. Die Messung mittels Radio-UHPLC-HRMS zeigte aufgrund der zu niedrigen Aktivität keinen Radiopeak. Im Hexan-Extrakt wurde keine Aktivität gemessen, woraus geschlossen werden kann, dass es zu keiner Bildung von unpolaren Metaboliten gekommen ist. Mit dem verbliebenen Rückstand wurde eine Protein-Präzipitation mit ACN durchgeführt. Die Wiederfindungsrate von ca. 30 % wurde durch die Fällung nicht reduziert. Dadurch kann angenommen werden, dass ein Teil des ^{14}C -Tyrosins nicht in Proteinen gebunden war und andere Metabolite extrahiert wurden. Bei diesen Metaboliten handelte es sich um Substanzen, die mittels Methanol nicht extrahierbar waren. Aufgrund der Trübung der Proben konnten diese nicht mittels UHPLC-HRMS vermessen werden. Als nicht extrahierbarer Rückstand blieben $19,7 \pm 4,6 \%$ zurück. Hierbei handelte es sich möglicherweise um gebundenes ^{14}C -Tyrosin oder um Metabolite, die nicht in Methanol oder ACN löslich sind. Die im Vorfeld entwickelte Extraktionsmethode zeigte sich als wenig geeignet für die Anwendung auf die Darm-Proben der Fütterungsstudie. Mittels der Extraktion mit MeOH + 5 % FA konnten lediglich $4,2 \pm 1,2 \%$ an Aktivität gewonnen werden. Aufgrund der niedrigen Aktivität in den Darm-Proben, der Bildung von flüchtigen bzw. nicht löslichen Abbauprodukten und von in Protein gebundenem ^{14}C -Tyrosin war die Erfassung der Metabolite mittels radio-UPHLC-HRMS nicht möglich.

Für die Cerebellum-Proben wurde ein Extraktionsverfahren aus einer Kombination von zwei verschiedenen SPE-Kartuschen entwickelt. Die erste Kartusche diente zur Entfernung der Matrix und die zweite Kartusche arbeitete als Kationenaustauscher um das Tyrosin und mögliche Metabolite am Phasenmaterial zu retardieren. Methoden aus der Literatur wie einfache Fest-Flüssigextraktion mit organischen Lösungsmitteln konnten aufgrund der Aufkonzentrierung nicht herangezogen werden [111]. Mit der entwickelten Methode konnte für das ^{14}C -Tyrosin eine Ausbeute von $82,5 \pm 5,1 \%$ erreicht werden. Wiederfindungsraten in der Literatur zeigen Werte von über 90 [111]. Dennoch wird die Wiederfindung für die entwickelte Methode als zufriedenstellend angesehen. Bei einer Kombination von zwei SPE-Aufreinigungen wurde ein Verlust an Aktivität erwartet. Bei Anwendung auf die Cerebellum-Proben der Fütterungsstudie zeigte sich nach Extraktion mit $\text{MeOH} + 5 \%$ FA lediglich eine Wiederfindungsrate von $3,5 \pm 1,2 \%$. Anschließend wurde eine ACN-Extraktion durchgeführt bei der ebenfalls keine Aktivität gefunden wurde. Die festen Rückstände wurden mittels Oxidizer verbrannt. Hierbei wurde ein Wert von $94,5 \pm 3,7 \%$ gemessen. Hierbei handelte es sich um nicht-extrahierbare Rückstände. Dabei kann es sich um gebundenes ^{14}C -Tyrosin oder nicht in MeOH und ACN lösliche Metabolite gehandelt haben. Aufgrund der zu niedrigen Aktivitäten in den Proben wurde kein Radiopeak detektiert. Um in Methanol lösliche Metabolite zu erfassen, müssten mindestens 10 g Cerebellum-Probe in 150 μL Lösungsmittel gelöst bzw. aufkonzentriert werden. Diese Aufkonzentrierung und anschließende Identifizierung der Metabolite mittels radio-UPHLC-HRMS wäre mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht realisierbar. Bei einer so hohen Aufkonzentrierung werden nicht nur die gewünschten Analyten angereichert, sondern auch Matrixbestandteile. Resultierend entstehen Matrixeffekte bei der LC-MS Messung [112].

Als letzte Matrix wurden die Exkrement-Proben untersucht. Bei der Methodenentwicklung konnte eine zufriedenstellende Wiederfindung von $86,3 \pm 3,7 \%$ bestimmt werden. Methoden aus der Literatur wie einfache Fest-Flüssigextraktion mit organischen Lösungsmitteln konnten aufgrund der Aufkonzentrierung nicht herangezogen werden [113]. Die Anwendung auf die Exkrement-Proben der Fütterungsstudie zeigte eine Wiederfindung von $36,7 \pm 2,3 \%$. Mittels der anschließenden Hexan-Reinigung wurde keine Aktivität detektiert. Daraus kann geschlussfolgert werden kann, dass es nicht zur Bildung von unpolaren Metaboliten

gekommen ist. Mit dem Extrakt wurde eine HLB-SPE mit Waschschritten mit steigendem Methanol-Anteil durchgeführt. Der Großteil der Aktivität wurde mit H₂O:MeOH (50:50, v/v) und MeOH eluiert, was ein Hinweis darauf ist, dass es sich um einen Metaboliten von Tyrosin mit verringerter Polarität handelt. Diese Annahme konnte durch die UHPLC-HRMS-Messung bestätigt werden. Ein Radiopeak wurde mit einer Retentionszeit von 2 Minuten detektiert und zeigte somit eine geringe Retention auf der HILIC-Säule als das ¹⁴C-Tyrosin. Da der Großteil der Radioaktivität nicht extrahiert werden konnte, wurde eine Säurehydrolyse mit HCl durchgeführt. Die Wiederfindungsrate nach der Säurehydrolyse betrug $51,6 \pm 9,6$ %. Mit den Proben wurden eine MeOH-Extraktion und HLB-Aufreinigung durchgeführt, mit denen eine Ausbeute von $32,2 \pm 2,6$ % erzielt wurde. Mittels UHPLC-HRMS wurden zwei Radiopeaks detektiert. Der Radiopeak bei 3,2 Minuten konnte eindeutig als ¹⁴C-Tyrosin identifiziert werden. Für den zweiten Radiopeak bei 4,5 Minuten konnte kein Summenformelvorschlag generiert werden. Vermutlich handelt es sich hierbei um einen Metaboliten von Tyrosin mit erhöhter Polarität. Für den Radiopeak der MeOH-Extraktion konnte ebenfalls keine Summenformel vorgeschlagen werden. Ein möglicher Grund hierfür ist das spezifische Isotopenverhältnis des ¹⁴C-Tyrosins. Da es sich bei diesem ¹⁴C-Standard um ein vollständig markiertes Molekül handelte, ist bei Verkürzung der Kohlenstoffkette das Isotopen-Muster nicht mehr genau definierbar. Das Isotopen-Muster ist für die Auswertung mittels der Software Compound Discoverer entscheidend, da diese exakt nach diesen Verhältnissen sucht. Zusätzlich weist der ¹⁴C-Tyrosin Standard eine hohe spezifische Aktivität auf, da jedes C-Atom markiert ist. Die vollständige Markierung führt zu einem Verlust an Sensitivität bei der UHPLC-HRMS-Messung. Grund hierfür ist, dass wenige ¹⁴C-Moleküle benötigt werden um die gewünschte Aktivität zu erreichen. Dies erschwert ebenfalls die Identifizierung.

Die Metabolisierung von Aminosäuren erfolgt entweder in körpereigene Proteine, in der Synthese von Aminosäurederivaten (z. B. biogene Amine) oder im Abbau zu Harnstoff, CO₂ und H₂O [114]. Da keine Metabolite des ¹⁴C-Tyrosins identifiziert werden konnten, kann ein Vergleich mit bestehender Literatur nicht gezogen werden [19, 115, 116].

5.1.2 ALA

Die Omega-3-Fettsäure ALA wurde in den Matrices Leber und Exkremente untersucht. Dabei erfüllten die Exkrement-Proben die Anforderung von mindestens 1 kBq/g. Bei den Leber-Proben lag die Aktivität um den Faktor 4 zu niedrig. Die anderen Matrices mussten im Voraus ausgeschlossen werden, da ihre Aktivität mindestens um den Faktor 10 zu niedrig lag. Somit mussten aufwendige Extraktionsmethoden und Aufkonzentrierungsschritte entwickelt werden. Die Entwicklung der Extraktionsmethode wurde jeweils mit Proben der Kontrollgruppen und Hinzudotieren der ^{14}C -ALA-Standardlösung durchgeführt. Dies ermöglichte die Nachverfolgung der Radioaktivität nach jedem Extraktionsschritt, bot jedoch nur eine Spezifikation für die ^{14}C -ALA und nicht für die Metabolite.

Für die Leber-Proben wurde ein Extraktionsverfahren aus Fest-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat und QuEChERS-Extraktion entwickelt. In der Literatur werden Methoden mit Fest-Flüssig-Extraktion mit Methanol und anschließender Filterung beschrieben [117]. In den Vorversuchen zeigte sich bei Testung dieser Methode eine sehr viskose Oberphase, die anschließend mittels Filter nicht abtrennbar war. Grund hierfür war der hohe Lipidanteil der Leber [118]. Mit der entwickelten Methode wurde für die ^{14}C -ALA eine zufriedenstellende Ausbeute von $85,4 \pm 4,3 \%$ erreicht. Bei Anwendung auf die Leber-Proben der Fütterungsstudie zeigte sich nach der Ethylacetat- und QuEChERS-Extraktion eine Wiederfindungsrate von $49,2 \pm 2,9 \%$. Mittels Radio-UHPLC-HRMS wurden die Proben vermessen und es wurde kein Radiopeak detektiert. Die Aktivität der Proben lag bei $26,9 \pm 1,36 \text{ Bq}$ pro $20 \mu\text{L}$ Injektionsvolumen. Das Detektionslimit des Radiodetektors liegt bei 20 Bq pro Analyt. Möglicherweise wurde mehr als ein Metabolit mit der Extraktion isoliert, sodass die Grenze von 20 Bq für jeden Einzelnen nicht mehr erreicht wurde. Als nicht-extrahierbare Rückstände verblieben $48,2 \pm 15,2 \%$. Aufgrund des heterogenen Gemisches aus Leberrückständen und QuEChERS-Salzen war hier eine große Schwankung zwischen den Messwerten zu beobachten. Hierbei handelte es sich um Metabolite, die nicht mittels Ethylacetat löslich waren. Ethylacetat ist ein semi-polares Lösungsmittel, durch das hydrophobe Metabolite nicht gut extrahiert werden können. Für eine Extraktion spielt jedoch nicht nur die Löslichkeit der Analyten im Lösungsmittel eine Rolle, sondern auch die Affinität zur Probenmatrix [119]. Bei Leber-Proben handelt es sich um eine sehr fettreiche

Matrix, weswegen bewusst ein semi-polares Lösungsmittel gewählt wurde, um mögliche Lipid-Verunreinigungen zu vermeiden.

Als zweite Matrix wurden die Exkrement-Proben untersucht. Hierfür konnte die zuvor entwickelte Methode von den Leber-Proben übernommen werden. Die Extraktion bei der Methodenentwicklung zeigte eine zufriedenstellende Wiederfindung von $90,1 \pm 1,9 \%$. Bei Anwendung dieser Methode auf die ^{14}C -ALA-Proben aus der Fütterungsstudie zeigte sich eine Wiederfindungsrate von $60,2 \pm 2,1 \%$. Die Proben konnten mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen werden. Dabei wurde ein deutlicher Radiopeak bei 3,6 Minuten detektiert. Der ^{14}C -ALA-Peak weist eine Retentionszeit von 9 Minuten auf. Somit handelt es sich hierbei um einen Metaboliten mit erhöhter Polarität. Die Proben wurden mit den Programmen Compound Discoverer und Xcalibur ausgewertet. Dabei wurden drei Summenformeln – $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_4$, $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_4$ und $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_5$ (ESI neg) – vorgeschlagen. Bei der vorgeschlagenen Summenformel $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_4$ handelt es sich um einen kurzkettigeren Metaboliten, der an der vermutlich die C9-Doppelbindung gebrochen wurde. Die Summenformeln $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_4$ und $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_5$ stellen ebenfalls kurzkettigere Metabolite dar, die wahrscheinlich bei der C12-Doppelbindung gebrochen wurden. Die Hauptmetabolismuswege der ALA sind die β -Oxidation zu Acetyl-CoA bzw. CO_2 , die Bildung von Omega-3-Fettsäuren mit längerer Kohlenstoffkette und die Speicherung im Fettgewebe [120]. Somit war die Detektion der Metabolite mit Verkürzung vom C-Terminalen Ende eine unerwartete Beobachtung. Weiter konnte festgestellt werden, dass die Summenformelvorschläge eine höhere Anzahl an Sauerstoff-Atomen aufweisen. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass es zu einer biochemischen Oxidation der ALA gekommen ist. Eindeutige Aussagen bezüglich der Strukturformeln können nicht gemacht werden. Naheliegend ist jedoch, dass es zu einer Oxidation an den Doppelbindungen und anschließenden Bindungsbruch gekommen ist. Bei den Exkrement-Proben handelte es sich um ein Gemisch aus Kot und Urin. Um hydrophobe Stoffe über die Niere bzw. den Urin auszuschcheiden, müssen diese erst durch die Biotransformation in hydrophilere Stoffe umgewandelt werden [121]. Bei der Verabreichung der ALA an die Schweine ist ein großer Teil ausgeschieden worden. Wahrscheinlich kam es mittels Biotransformation zu einer Umwandlung der ALA in kurzkettige polare Moleküle, die mit dem Urin eliminiert wurden.

5.1.3 Versuchsübergreifende Diskussion

Bei den Untersuchungen zum Verbleib von ^{14}C -Tyrosin und ^{14}C -ALA in unterschiedlichen Schweine-Matrices zeigten sich einige Herausforderungen. Um die Proben mit Radio-UHPLC-HRMS untersuchen zu können, wurde ursprünglich ein Mindestwert an Radioaktivität von 2 kBq/g anvisiert. Das entspräche einer Verabreichung von 20 MBq an ein Schwein mit 10 kg Gesamtgewicht. Für die Studie konnten jedoch nur Jungschweine mit maximal 20 kg gewählt werden, wodurch ein neuer Mindestwert von 1 kBq/g festgelegt wurde. Bei den Proben zeigten einzig die Exkremente der ^{14}C -Tyrosin- und ^{14}C -ALA-Proben einen Wert über 1 kBq/g. Besonders bei den ^{14}C -ALA-Proben wurden um den Faktor 10 zu niedrige Aktivitäten in den Proben bestimmt. Dies ist auf die höhere Masse der ALA-Schweine von ca. 20 kg zurückzuführen. Die ALA-Gruppe erhielt ein herkömmliches Schweinefutter, das sich vor allem aus Weizen, Gerste, Lupinen und Sojamehl zusammensetzte. Bei der Tyrosin-Gruppe wurde ein hochoverhitztes Protein-Pulver dem Futter zugesetzt, um das Mikrobiom der Darmflora zu konditionieren. Aufgrund der nicht herkömmlichen Ernährung nahmen die Schweine der Tyrosin-Gruppe weniger an Gewicht zu. Ein weiterer Grund für die niedrigen Aktivitäten in den Proben ist die hohe Ausscheidung der Nährstoffe, wodurch die Anreicherung im Gewebe gering ausfiel. Einzig bei den ^{14}C -ALA- und ^{14}C -Tyrosin-Exkrement-Proben wurde der Wert von 1 kBq/g erfüllt. Bei diesen Proben wurde auch mittels Radio-UHPLC-HRMS ein Radiopeak detektiert.

Um die Metabolite identifizieren zu können, müssten grundlegende Herangehensweisen der Studie angepasst werden. Durch die Verwertung der verabreichten Substanz kommt es zu einer hohen Verdünnung der Radioaktivität im Schwein. So wird beispielsweise beim ^{14}C -Tyrosin ein Teil als CO_2 ausgeatmet, gebunden oder zu Neurotransmittern und anderen Metaboliten abgebaut. Hier müsste im Vorfeld ausreichend Expertise investiert werden, um anschließend den gewünschten Wert der Aktivität pro Gramm Probenmatrix zu erzielen.

Eine grundlegende Frage ergab sich bereits bei der Entwicklung der Extraktionsmethoden. Diesbezüglich gilt zu klären, inwieweit eine zielgerichtete Methodenentwicklung als Referenz für eine Non-Target-Analyse dienen kann. Für die Entwicklung der Extraktionsmethoden wurden nicht-radioaktive Matrices gewählt und

der jeweilige radioaktive Standard wurde hinzudotiert. Daraus resultiert, dass die Methode nur für die Ausgangsverbindung spezifiziert ist. Metabolite mit ähnlicher Struktur bzw. ähnlichen chemischen Eigenschaften, wie der Präkursor, können dadurch ebenfalls extrahiert werden – Metabolite mit anderen chemischen Parametern hingegen möglicherweise nicht. Besonders bei den Cerebellum-Proben wurde diese Problematik ersichtlich. Bei der Methodenentwicklung wurde für das ^{14}C -Tyrosin eine Ausbeute von $82,5 \pm 5,1 \%$ erzielt. Bei Anwendung dieser Methode auf die Cerebellum-Proben von der Fütterungsstudie zeigte sich lediglich eine Wiederfindungsrate von $3,5 \pm 1,2 \%$. Tyrosin gelangt über einen sogenannten Aminosäuretransporter durch die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn. Dort kann eine weitere Umwandlung in Neurotransmitter oder ein Einbau in Proteine erfolgen. Die Hauptsächliche Bildung von Neurotransmitter findet jedoch in der Darmschleimhaut statt. Über Transportkanäle können die Neurotransmitter die Blut-Hirn-Schranke überqueren [122]. Dies ergibt eine Vielzahl verschiedener Schicksale des Tyrosins im Gehirn und erklärt die niedrige Wiederfindung bei der Anwendung auf die Cerebellum-Probe der Fütterungsstudie. Eine Möglichkeit wäre es, die Proben von der Fütterungsstudie mit spezifischen Lösungsmitteln nacheinander zu extrahieren, um verschiedene Polaritätsbereiche abzudecken. Hierfür gäbe es jedoch keine Verifizierung bzw. diese Variante wäre sehr kostenintensiv. Für die Verifizierung der Extraktion müsste für jeden Polaritätsbereich eine ^{14}C -Verbindung zur Untersuchung der Ausbeute vorhanden sein. Zusätzlich ist auch die vorhandene Probenmenge in diesem Zusammenhang maßgeblich. Aufgrund der geringen Probenmengen war die Aufkonzentrierung eingeschränkt bzw. die Untersuchung mit unterschiedlichen Lösungsmittel nicht möglich.

Um unbekannte Metabolite mittels Radio-UHPLC-HRMS zu identifizieren, spielt auch die Auswahl des radioaktiven Standards eine große Rolle. Die ^{14}C -ALA ist einfach an der Carbonylgruppe markiert, wodurch nur Metabolite erfasst werden können, die noch die Carbonylgruppe enthalten. Dennoch kann das ^{12}C - zu ^{14}C -Isotopenverhältnis genutzt werden, um unbekannte Metabolite aufzuspüren und einen Summenformelvorschlag zu generieren. Bei den ^{14}C -ALA-Exkrementproben der Fütterungsstudie wurden beispielsweise die Summenformeln $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_4$, $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_4$ und $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_5$ vorgeschlagen. Der ^{14}C -Tyrosin-Standard hingegen war vollständig markiert. Dies bietet den Vorteil, dass ein genaues spezifisches Isotopenverhältnis ermittelt

werden kann. Dieses spezifische Isotopenverhältnis kann anschließend genutzt werden, um unbekannte Abbauprodukte zu entschlüsseln. Zum Beispiel konnte beim Erhitzungsversuch des ^{14}C -Tyrosins in Rapsöl die genaue Position der Anlagerung ermittelt werden. Ein Nachteil eines ^{14}C -Standards mit vollständiger Markierung ist, dass bei einer Verkürzung der Kohlenstoffkette das spezifische Isotopenverhältnis nicht mehr bekannt ist. Dies zeigte sich zum Beispiel bei den ^{14}C -Tyrosin-Exkrement-Proben. Obwohl ein Radiopeak detektiert wurde, konnte kein Summenformelvorschlag generiert werden. Dies kann daran liegen, dass das spezifische Isotopenverhältnis nicht mehr übereinstimmte, der Metabolit nicht mehr ionisiert werden konnte oder die Sensitivität im Massenspektrum zu gering war. Ein vollständig markierter ^{14}C -Standard weist eine hohe spezifische Aktivität auf, wodurch wenig Moleküle benötigt werden um eine bestimmte Aktivität zu erreichen. Dadurch sinkt die Sensitivität im Massenspektrometer. Jedoch spielen bei der Auswahl ^{14}C -markierter Substanzen auch finanzielle Kriterien eine große Rolle, da spezifische Synthesen sehr teuer sind [123]. Eine Alternative zu der ^{14}C -Markierung ist die Markierung mit überschweren Wasserstoff ^3H . Hierbei ist die Synthese einfacher und meist kostengünstiger, jedoch besteht die Gefahr, dass die Markierung schnell verloren geht [124].

Zusammenfassend konnten wichtige Erkenntnisse gewonnen und Beiträge geleistet werden, um den Verbleib von ^{14}C -Tyrosin und ^{14}C -ALA nach der Verdauung zu untersuchen. Besonders konnten die Herausforderungen wie die starke Verdünnung im Organismus der verabreichten Substanzen sowie die Limitierung der Aufkonzentrierung aufgezeigt werden. Dies bietet Hilfestellung für neue vergleichbare Studien.

5.2 Verbleib von Lebensmittelinhaltsstoffen nach Lebensmittelverarbeitungsprozessen

Der zweite Teil dieser Arbeit fokussiert sich auf die Untersuchung der Bildung möglicher Abbauprodukte bei Lebensmittelverarbeitungsprozessen. Dazu wurden die zwei Nährstoffe der Fütterungsstudie und der Süßstoff Aspartam Lebensmittelverarbeitungsprozessen ausgesetzt und die Abbauprodukte anschließend analysiert. Das Ziel hierbei war die Entwicklung geeigneter Probenvorbereitungsmethoden, Extraktionsverfahren sowie analytischer Methoden, um die Identifizierung der Abbauprodukte zu ermöglichen.

5.2.1 Tyrosin

Um mögliche Abbauprodukte des Tyrosins nach einem simulierten Frittier-Prozess zu untersuchen, wurde Rapsöl mit dem ^{14}C -Tyrosin dotiert und erhitzt. Nach dem Erhitzen der Öl-Proben wurde eine Wiederfindung von 66,4 % bestimmt. Bei den restlichen 33,6 % Anteil an Radioaktivität handelte es sich um flüchtige Abbauprodukte des ^{14}C -Tyrosins, die während des Erhitzungsprozesses verlorengegangen sind. Darüber hinaus kann es unter dem Einfluss hoher Temperaturen zu einer Decarboxylierung von Aminosäuren kommen [42]. Mittels radio-UHPLC-HRMS wurde ein Peak als ^{14}C -Tyrosin Peak identifiziert. Ebenfalls wurde ein Abbauprodukt des Tyrosins detektiert. Hierbei handelt es sich um ein Abbauprodukt mit verringerter Polarität da die Retentionszeit, im Vergleich zur Ausgangsverbindung, auf einer C18 Säule erhöht war. Für diesen Peak wurde mithilfe des spezifischen Isotopen-Musters die Summenformel $\text{C}_6^{14}\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_5$ (neutrale Spezies) vorgeschlagen. Mit gezielten MS/MS-Experimenten konnte bestätigt werden, dass das C9-Gerüst des ^{14}C -Tyrosin-Moleküls intakt geblieben ist. Diese Annahme wurde mit dem Verhältnis des Isotopen-Musters des 9-fach zu 8-fach zu 7-fach markierten ^{14}C -Moleküls bestätigt. Bei einer Verkürzung der Kohlenstoffkette des ^{14}C -Tyrosin-Moleküls ist das genaue spezifische Isotopenverhältnis nicht mehr bekannt. Mittels der Fragment-Spektren wurde ebenfalls die Abspaltung der $^{14}\text{COOH}$ -Gruppe des Abbauproduktes bestätigt. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Anlagerung am Stickstoff des ^{14}C -Tyrosins erfolgt ist und nicht an der OH-Gruppe. Hierbei ist es vermutlich durch Reaktion einer OH-Gruppe mit dem Amin des ^{14}C -Tyrosins zur Bildung einer Amid-Bindung gekommen. Belegt

wurde diese Vermutung, indem sowohl in den ^{14}C -Tyrosin-Ölproben als auch in der Leewertprobe eine passende Masse mit der Summenformel $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ (neurale Spezies) gefunden wurde. Von dieser Masse wurden ebenfalls Fragment-Spektren aufgenommen und mit einer Datenbank verglichen. Nach Abgleich mit der Datenbank wurden drei Substanzen – 3-Hydroxybenzoesäure, Salicylsäure und 3-Furylacrylsäure – vorgeschlagen. Die Salicylsäure wird hierbei als am wahrscheinlichsten erachtet, da Salicylate in Pflanzenölen vorkommen. Salicylsäure ist eine phenolische Verbindung mit antioxidativen Eigenschaften, die an der Regulierung physiologischer Prozesse in Pflanzen beteiligt ist [125]. Dennoch stellt sich die Frage wieso das Tyrosin mit einer Minorkomponente des Rapsöls reagiert hat. Wesentlich naheliegender wäre eine Reaktion mit einer Fettsäure aus dem Öl. Daher wird eine Reaktion mit Salicylsäure und Tyrosin im Rapsöl als umstritten angesehen.

5.2.2 ALA

Um den Verbleib der ALA nach einem simulierten Frittier-Prozess zu untersuchen, wurde der ^{14}C -markierte Standard Rapsöl hinzudotiert und für 30 und 60 Minuten bei $170\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Bei der Probe nach 30 Minuten Erhitzen zeigte sich im Mittel ein Verlust an Aktivität von 11,7 % und nach 60 Minuten ein Verlust von 22,1 %. Die Bilanzierung von extrahierbarem Anteil, nicht-extrahierbarem Anteil im Öl und Verlust durch das Erhitzen zeigte eine vollständige Wiederfindungsrate von 100 %. Die Proben wurden mittels Radio-UHPLC-HRMS vermessen. Bei 10,1 Minuten war ein Radiopeak zu erkennen, der eindeutig als ^{14}C -ALA-Peak identifiziert werden konnte. Aufgrund des Verlustes an Radioaktivität nach dem Erhitzen kann von der Bildung flüchtiger Abbauprodukte ausgegangen werden. Ungesättigte Fettsäuren sind nicht nur empfindlich gegenüber Luftsauerstoff (Autoxidation), sondern auch temperatursensitiv. Durch die Oxidation kommt es bei der ALA vorwiegend zur Bildung flüchtiger Aldehyde [49]. Dabei wird zwischen Autoxidation und thermischer Oxidation unterschieden. Der Mechanismus der Autoxidation basiert auf der spontanen Reaktion mit Sauerstoff aus der Atmosphäre. Bei der thermischen Oxidation ist der chemische Mechanismus derselbe, aber die Oxidationsrate ist schneller als bei der Autoxidation. Des Weiteren ist die Oxidationsrate umso höher je höher die Temperatur und

Erhitzungsdauer sind [126]. Bei dem Erhitzungs-Experiment der ^{14}C -ALA ist dies ebenfalls zu beobachten. Bei längerer Erhitzungsdauer ging mehr Aktivität verloren.

5.2.3 Aspartam

Mit dem ^{14}C -Aspartam wurden die Matrices Rapsöl, Teig und Wasser dotiert und Verarbeitungsprozessen unterzogen. Dadurch sollte der Abbau realitätsnah simuliert werden.

Für die Untersuchung von Aspartam während eines Back-Prozesses wurde der ^{14}C -markierte Standard einem Teig, bestehend aus Mehl und Butter, hinzu dotiert und für 15 min bei 170 °C erhitzt. Nach dem Erhitzen wurden im Mittel $86,7 \pm 4,6$ % der Aktivität detektiert. Bei dem verbliebenen Anteil handelte es sich somit um flüchtige Abbauprodukte. Zwei verschiedene Extraktionsmethoden wurden untersucht. Dabei zeigte die Extraktion mit MeOH:H₂O (50:50, v/v) + 1 % FA eine um 10 % höhere Wiederfindung als die QuEChERS-Extraktion. Da mittels beider Extraktionsverfahren Analyte extrahiert werden konnten, war dies ein Hinweis auf die Bildung von polaren aber auch mittel-polaren bis unpolaren Abbauprodukten.

Um den Verbleib von Aspartam während eines Frittier-Prozesses zu untersuchen, wurde der ^{14}C -markierte Standard dem Rapsöl hinzudotiert und für 15, 30 und 60 Minuten bei 170° C erhitzt. Eine Kombination aus MeOH:H₂O (50:50, v/v) Extraktion und anschließender QuEChERS-Extraktion diente als Methode der Wahl. Dadurch konnten polare Substanzen durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Methanol/Wasser extrahiert und anschließend unpolare und mittelpolare Produkte mittels QuEChERS-Extraktion aus der zurückgebliebenen Probe herausgelöst werden. Nach dem Erhitzen sind im Mittel $23,5 \pm 2$ % an Aktivität verloren gegangen. Hierbei handelte es sich ebenfalls, wie bei der Erhitzung des Teiges, um flüchtige Abbauprodukte. Zwischen den Erhitzungsdauern waren keine deutlichen Unterschiede in den Wiederfindungsarten bzw. Verlusten an Aktivität erkennbar. In einem weiteren Experiment wurden ^{14}C -Aspartam-dotierte Rapsöl-Proben für 30 und 60 Minuten bei 190 °C erhitzt und mit derselben Extraktionsmethode extrahiert. Bei einer Temperatur von 190 °C gingen um 10% mehr Aktivität verloren im Vergleich zu 170 °C. Da der ^{14}C -Standard im Phenylring markiert ist, ist dieser möglicherweise beim

Erhitzen abgespalten worden. In der Literatur ist ebenfalls die Bildung flüchtiger Abbauprodukte bei Temperaturen von über 150°C beschrieben. Hierbei kommt es zuerst zu einer Cyclisierung zu DKP und dann zur Bildung von flüchtigen Verbindungen wie zum Beispiel das Acetophenon [127]. Das Acetophenon beinhaltet den Phenylring des Aspartam-Moleküls und erklärt somit die Abnahme der Aktivität nach dem Erhitzen.

Die Radio-Chromatogramme der Kleingebäck- und Öl-Proben zeigten mehrere Radiopeaks bei gleichen Retentionszeiten. Dadurch kann geschlussfolgert werden, dass es in beiden Matrices zur Bildung der gleichen Abbauprodukte gekommen ist. Die Radiopeaks wurden zur Vereinheitlichung mit P1 bis P6 gekennzeichnet. Der Radiopeak P4 wurde als ^{14}C -Aspartam-Peak identifiziert. Die Intensitäten der Abbauprodukte variierten bei unterschiedlichen Erhitzungszeiten. Das Abbauprodukt P6 wurde verstärkt bei zunehmender Erhitzungsdauer gebildet. Hingegen zeigen sich die Produkte P2 und P3 bei zunehmender Erhitzungsdauer weniger deutlich bzw. bei 60 Minuten fast nicht mehr. Aufgrund der Retentionszeiten mit der C18-Säule können auch Zusammenhänge bezüglich der Polarität der Abbauprodukte geschlussfolgert werden. So ließ sich für die Produkte P2 und P3 eine polare Struktur vermuten und für das Produkt P6 eine mittel-bis unpolare. Verdeutlicht wurde diese Vermutung, indem mittels der QuEChERS-Extraktion, die vor allem für mittel und unpolare Analyten geeignet ist, P6 am effektivsten extrahiert werden konnte. Aufgrund der polaren Struktur von P2 und P3 wurden diese mit der organisch-wässrigen Extraktion besser gelöst.

Um weitere Informationen über die Abbauprodukte zu erlangen, wurden die Radio-UHPLC-Chromatogramme mit der Software Compound Discoverer analysiert und ausgewertet. Das Abbauprodukt P2 wurde als DKP identifiziert. DKP wurde bereits in der Literatur beschrieben. Diesbezüglich führt das Erhitzen zu einer Cyclisierung des Aspartam-Moleküls und zur Abspaltung von Methanol. Es handelt sich somit um ein cyclisches Dipeptid [52]. In Abbildung 54 ist der postulierte Reaktionsweg dargestellt.

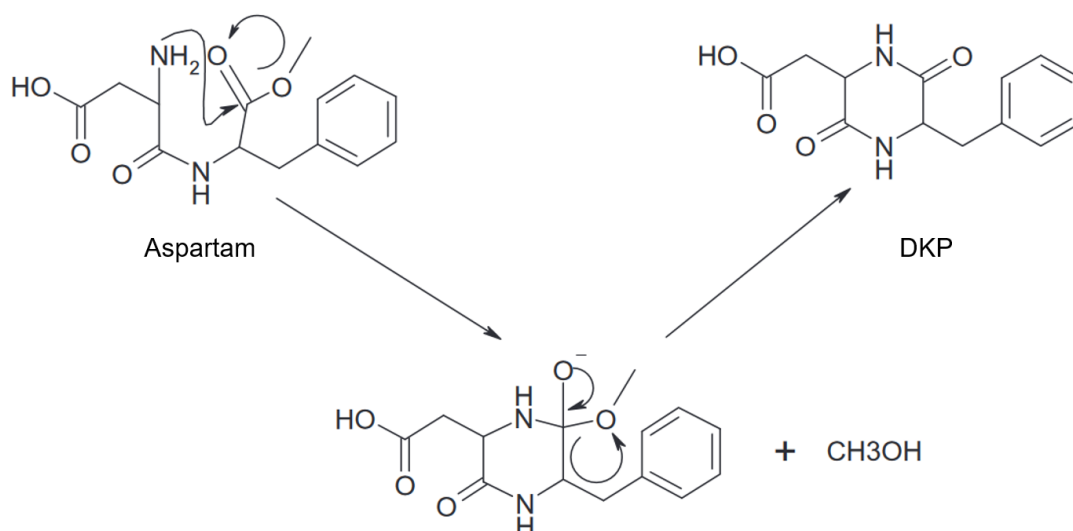


Abbildung 54: postulierter Reaktionsweg des DKP [128]

Eindeutige Daten bezüglich der Toxizität des DKP liegen in der Literatur nicht vor. Das Methanol kann jedoch aufgrund der geringen Mengen als nicht gesundheitsschädlich angesehen werden [129]. Eine eindeutige Identifizierung konnte mittels eines DKP-Standards und durch den Abgleich der Retentionszeiten durchgeführt werden. Mithilfe einer Matrix-matched-Kalibrierung wurde für das QuEChERS-Extrakt der Kleingebäck-Probe eine Quantifizierung durchgeführt. Unter der Annahme einer vollständigen Extraktion des DKP wurden im QuEChERS-Extrakt 12,3 % des eingesetzten Aspartams in DKP umgewandelt. Für das Abbauprodukt P6 wurde die Summenformel $^{12}\text{C}_{12}^{14}\text{C} \text{H}_{15}\text{NO}_4$ (neutrale Spezies) vorgeschlagen. Zu diesem Abbauprodukt wurde kein passender Vorschlag in der Literatur gefunden. Um Strukturinformationen über das unbekannte Abbauprodukt zu erhalten, wurden gezielte MS/MS-Experimente durchgeführt. Mit dem Fragment 120,0804 konnte gezeigt werden, dass das Abbauprodukt P6 einen Phenylring an der Aminogruppe gebunden hat und diese Struktur des Aspartam-Moleküls intakt geblieben ist. Für das Fragment 180,1012 m/z mit der Summenformel $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}$ (neutrale Spezies) konnten insgesamt zwei Strukturen abgeleitet werden, bei denen eine eindeutige Zuordnung nicht möglich war. Aus den Strukturmöglichkeiten der einzelnen Fragmente und den Summenformelvorschlag $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ (neutrale Spezies) ergaben für das Abbauprodukt P6 vier mögliche Strukturen. Mittels Fragmentierung ist hier keine Unterscheidung möglich, da zuerst die Carbonyl-Gruppen und Hydroxylgruppen abgespalten werden. Zielführender wären hier NMR-Messungen, sofern die

entsprechenden Mengen hergestellt und aufgereinigt werden können. Eine andere Möglichkeit wäre die Synthese dieser vier Strukturvorschläge und eine Unterscheidung mittels der Retentionszeit. Für die chromatographische Trennung könnte hier eine Säule mit PFP (Pentafluorophenyl) als Trennmaterial zum Einsatz kommen.

Für die Überprüfung der thermischen Stabilität von Aspartam als Süßungsmittel in Heißgetränken wurde ein Versuch mit Kaffee durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten keinen Abbau des Aspartam-Moleküls. Um den physikalischen Einfluss von Mikrowellen auf die Stabilität des Aspartams zu untersuchen, wurde der abgekühlte Kaffee in einer Mikrowelle erwärmt. Auch hier kam es zu keiner Bildung von Abbauprodukten. Somit kommt es durch die Erhitzung mittels Mikrowellen zu keiner Degradation des Aspartam-Moleküls. Die eingesetzte Aktivität konnte ebenfalls nach dem Erhitzen vollständig wiedergefunden werden. Um die Stabilität des Aspartam-Moleküls während eines Koch-Prozesses zu untersuchen, wurden Erhitzungsexperimente mit Wasser durchgeführt. Dazu wurde Wasser mit dem ^{14}C -Aspartam-Standard dotiert und unterschiedlich lange erhitzt. In dem Radio-Chromatogramm nach 10 Minuten sind deutliche Peaks bei 1,5, 2,2, 3,2 und 6 Minuten ersichtlich. Drei Radio-Peaks konnten mittels Retentionszeit und Standard eindeutig identifiziert werden. Beim Peak bei 6 Minuten handelt es sich um ^{14}C -Aspartam, bei 2,2 Minuten um DKP und bei 1,5 Minuten um L-Aspartyl-Phenylalanin. Beim Radio-Chromatogramm nach einer Erhitzungsdauer von 180 Minuten zeigen sich ebenfalls der DKP- und L-Aspartyl-Phenylalanin-Peak, aber bei 6 Minuten ist kein Aspartam-Peak mehr ersichtlich. Somit ist es zu einem vollständigen Abbau des Aspartam-Moleküls gekommen. Zu dem Abbauprodukt bei 3,2 Minuten (P3) konnte kein Summenformelvorschlag generiert werden. Weiter ist festzuhalten, dass auch bei 0 Minuten Erhitzungsdauer die drei Abbauprodukte des Aspartams zu finden waren. Somit ist Aspartam in wässriger Lösung bei neutralem pH-Wert leicht instabil. Im Gegensatz hierzu wurde bei dem Kaffee-Experiment keine Instabilität des Aspartams festgestellt. Dies ist auf den sauren pH-Wert des Kaffees zurückzuführen [130].

Das Experiment wurde mit Wasser + Phosphorsäure wiederholt, um saure Getränke mit künstlichen Süßstoffen, wie zum Beispiel Cola Light, zu simulieren. Beim Erhitzen

dieser angesäuerten Lösungen wurde ein weiteres Abbauprodukt bei 7,2 Minuten beobachtet. Mittels kommerziell erhältlicher Standards konnten dieses als Phenylalanin-Methyl-Ester identifiziert werden. Durch den sauren pH-Wert kam es zur Spaltung der Peptid-Bindung des Aspartams und es bildeten sich die Hydrolyse Produkte Asparaginsäure und Phenylalanin-Methyl-Ester. Bei Asparaginsäure handelt es sich um eine proteinogene Aminosäure und kann somit als nicht toxisches Abbauprodukt betrachtet werden [131]. Aminosäure-Methyl-Ester zeigen bei menschlichen Zellen myeloischen Ursprungs eine Zytotoxizität. Dennoch bleibt festzuhalten, dass die benötigte Menge von 1 g/L, um eine toxische Wirkung zu beobachten, mittels des Konsums von Aspartam nicht erreicht wird [132]. Bei niedrigen pH-Werten kommt es zu einer bevorzugten Hydrolyse der Amid-Bindung. Im Gegensatz zu den vorgenannten Versuchen ohne Säure wurde in der nicht-erhitzten Lösung kein vollständiger Abbau von Aspartam beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen die Stabilisierung von Aspartam durch Säuren, die typischerweise in den meisten Getränken vorhanden sind [133]. In einem zusätzlichen Experiment wurde die Stabilität von ^{14}C -Aspartam über 24 Stunden bei 20 °C, 40 °C und 60 °C in einem Ansatz aus Wasser mit Phosphorsäure untersucht. Der Hintergrund zu diesem Experiment war die realitätsnahe Darstellung der Umgebung, beispielsweise, wenn eine Flasche mit Cola Light an einem heißen Tag im Auto gelagert wird [106]. Bei 60 °C konnte eine Degradation des Aspartams und die Entstehung der Produkte DKP und Phenylalanin-Methyl-Ester beobachtet werden. Somit konnte gezeigt werden, dass hohe Temperaturen im Auto zu einem Abbau des Aspartams führen und es zur Bildung von Abbauprodukten kommt.

Um Strukturinformationen für das unbekannte Abbauprodukt P3 zu erlangen wurden NMR-Messungen durchgeführt. Da eine Aufreinigung des Abbauproduktes nicht möglich war, wurden die NMR-Messungen mit der nicht aufgereinigten Probe durchgeführt. Dabei zeigten die Resonanzen aus den ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren deutliche Hinweise für die Strukturen Isopropanol und *tert*-Butanol. Dennoch werden diese Strukturen nicht als Abbauprodukte des Aspartams erachtet. Der ^{14}C -Standard ist im Phenyl-Ring markiert und somit hätte es zu einer Ringspaltung kommen müssen. Das Abbauprodukt P3 zeigte sich bei höheren Temperaturen von 170 °C aber auch bei dem Kochversuch in Wasser. Bei den Versuchsbedingungen von kochendem Wasser wird eine Ringspaltung als nicht wahrscheinlich angesehen.

Das Weiteren zeigte das Abbauprodukt P3 eine Retentionszeit von 3,1 Minuten und weist somit eine weniger polare Struktur als das DKP auf. Bei *tert*-Butanol und Isopropanol handelt es sich um kleine polare Substanzen. Ebenso weisen beide Verbindungen einen Siedepunkt von ca. 80°C auf [134]. Somit müssten sie bei dem Kochen verflüchtigt sein. Vermutlich handelte es sich bei den beiden Strukturen um Verunreinigungen. Für das unbekannte Abbauprodukt P3 konnte somit kein Strukturvorschlag mittels NMR gemacht werden. Für die Identifizierung mittels NMR-Spektren lag das unbekannte Abbauprodukt entweder in zu geringen Mengen oder wurde von den Begleitstrukturen überlagert. Hierbei müsste man nochmal einen Lösungsweg finden um das unbekannte Abbauprodukt anzureichern und von der aufgereinigten Probe NMR-Messungen durchführen.

Die verschiedenen Experimente mit dem Süßstoff Aspartam zeigen, dass es, abhängig von der Erhitzungstemperatur, der Zeit und dem pH-Wert der Lösung, zur Bildung von verschiedenen Abbauprodukten kommt. In Abbildung 55 sind diese Abbauprodukte abhängig von ihrer Bildung bei saurem oder neutralem pH-Wert dargestellt.

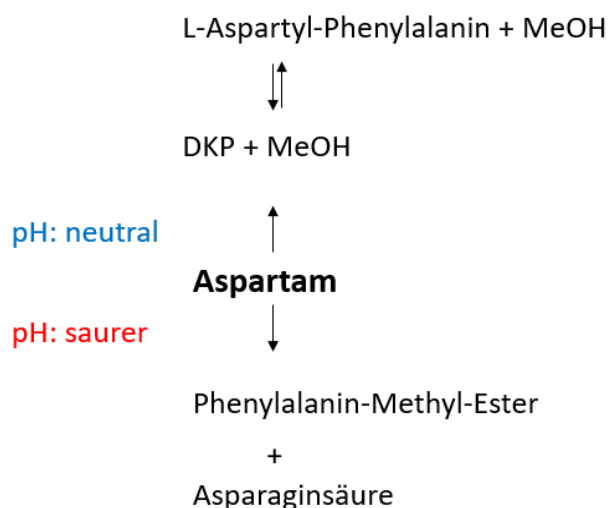


Abbildung 55: identifizierte Abbauprodukte des Aspartams, abhängig vom pH-Wert

Bei neutralem pH-Wert entstehen die Abbauprodukte DKP und L-Aspartyl-Phenylalanin, die ineinander umgewandelt werden können. Eine Rückreaktion zu Aspartam ist jedoch nicht möglich. Bei saurem pH-Wert entsteht, neben diesen Abbauprodukten, noch der Phenylalanin-Methyl-Ester und Asparaginsäure [52].

Daraus lässt sich vermuten, dass es zu einer bevorzugten Hydrolyse der Amid-Bindung bei niedrigen pH-Werten kommt. Ebenfalls kommt es bei niedrigen pH-Werten, die typischerweise in den meisten Getränken vorhanden sind, zu einer Stabilisierung von Aspartam [135]. Untermauert wurde diese Beobachtung beim Erhitzungs-Experiment in Kaffee. Hier wurde ebenfalls kein Abbau des Aspartam-Moleküls festgestellt. Der Kaffee, der für dieses Experiment verwendet wurde, wies einen pH-Wert von ca. 5 auf. Bei pH-Werten von 7 bis 10 kann das Elektronenpaar an der Aminogruppe der Asparagin-Einheit den Carbonylkohlenstoff am Phenylalanin-Methylester leicht angreifen. Unter Freisetzung von Methanol wird das Cyclisierungsprodukt DKP gebildet [136]. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es bei den in dieser Arbeit detektierten Abbauprodukten zu keiner Interaktion des Aspartams mit Matrixbestandteilen gekommen ist. Dennoch können NERs (nicht extrahierbare Rückstände), die zum Beispiel Addukte von Aspartam mit der Matrix sein können, nicht ausgeschlossen werden. Dennoch gilt Aspartam heute unter Einhaltung des Verwendungszwecks und der vorgegebenen Grenzwerte als sicherer Zusatzstoff. NutraSweet® rät jedoch ausdrücklich von der Verwendung in Lebensmitteln ab, die thermischen Belastungen ausgesetzt werden [137].

5.2.4 Versuchsübergreifende Diskussion

Bei den Untersuchungen von ^{14}C -markierten Lebensmittelinhaltsstoffen nach unterschiedlichen Verarbeitungsprozessen zeigten sich deutlich die Vorteile des Einsatzes radioaktiver Substanzen. Dadurch war es möglich die Aktivität nach jedem Extraktionsschritt zu verfolgen. Des Weiteren konnten ausreichend hohe Mengen an Aktivität hinzugegeben werden, um bekannte Abbauprodukte zu identifizieren und von unbekanntem Abbauprodukten Strukturvorschläge generieren zu können. Dies ermöglichte gezielte Fragmentierungsexperimente und die Aufnahmen von NMR-Messungen. Die Auswahl der Aminosäure bzw. der Omega-3-Fettsäure wurde hinsichtlich der Fütterungsstudie getroffen. Dennoch wurde mit diesen zwei ^{14}C -Substanzen Lebensmittelverarbeitungsprozessen durchgeführt. Hierbei konnte die Methodik des Einsatzes von ^{14}C -markierten Substanzen gezeigt werden. Bei der ALA kam es zur Bildung flüchtiger Abbauprodukte. Beim Tyrosin wurde ein Abbauprodukt mit erhöhter Polarität detektiert. Der Süßstoff Aspartam wurde aufgrund seines weit

verbreitetem Einsatz als Zuckerersatzstoff in Lebensmittel ausgewählt. Hierbei wurden sowohl bekannte als auch neue Abbauprodukte detektiert, die wichtige Informationen und Anregungen für weitere Forschung bieten. Besonders die radioaktive Markierung im Phenyl-Ring des Aspartams erwies sich als besonders nützlich für die Identifizierung der Abbauprodukte. Dadurch konnte ein exaktes Isotopen-Muster bestimmt werden, das auch bei der Abspaltung einzelner Gruppen vom Aspartam-Molekül intakt geblieben ist.

6 Ausblick

Die Ergebnisse der Fütterungsstudie dieser Arbeit zeigen die Komplexität der Entschlüsselung des Verbleibs von Lebensmittelinhaltsstoffen nach der Verdauung. Dennoch liefern sie Informationen und Anregungen für weitere Forschungsarbeiten. Basierend auf den Ergebnissen und Schwierigkeiten müsste das Design der Fütterungs-Studie noch einmal überarbeitet werden, um die Metabolite identifizieren zu können. Durch die Verwertung der verabreichten Substanz kommt es zu einer hohen Verdünnung der Radioaktivität im Schwein. Hier müsste im Vorfeld ausreichend Vorarbeit investiert werden, um anschließend den gewünschten Wert der Aktivität pro Gramm Probenmatrix zu erzielen. Es stellt sich die grundlegende Frage, inwieweit eine zielgerichtete Methodenentwicklung als Referenz für eine Non-Target-Analyse dienen kann. Eine mögliche Verbesserung wäre es, die Proben von der Fütterungsstudie mit spezifischen Lösungsmitteln nacheinander zu extrahieren, um verschiedene Polaritätsbereiche abzudecken. Ebenso würde eine gezielte Markierung zum Beispiel im Phenylring beim Tyrosin oder an der Carbonyl-Gruppe und an zwei weiteren Kohlenstoffatomen bei der ALA die Identifizierung erleichtern. Vorteil hierbei wäre, dass man nach einem exakten Isotopenmuster aus dem einfach-, zweifach, dreifach markiertem Standard berechnen kann. Ebenfalls wäre zu überlegen, eine Studie mit einer Substanz durchzuführen, die wenig oder gar nicht metabolisiert wird. Somit würde es nicht zu einer starken Verdünnung im Schwein kommen und man könnte die Methodik überprüfen. Für die Strukturaufklärung unbekannter Metabolite mittels gezielter Fragmentierungs-Experimente oder NMR bräuchte man nicht nur wesentlich höhere Mengen, sondern auch reine Probenextrakte. Daher ist von einer zu starken Aufkonzentrierung abzuraten, da dies auch zu einer Anreicherung von Matrix-Bestandteilen führt.

Die Ergebnisse der Lebensmittelverarbeitungsprozesse zeigten den großen Vorteil durch den Einsatz ^{14}C -markierter Substanzen. Dies ermöglichte die Nachverfolgung des Verbleibs der Aktivität. Die ^{14}C -ALA zeigte keine Bildung von Abbauprodukten die mittels radio-UHPLC-HRMS erfassbar waren. Bei dem ^{14}C -Tyrosin wurde ein Abbauprodukt mit einer Anlagerung an das Tyrosin identifiziert. Dennoch ist hier die Frage inwiefern die Abbauprodukte einer freien Aminosäure während eines Verarbeitungsprozesses relevant sind. Die Auswahl dieser zwei Nährstoffe wurde

hinsichtlich der Fütterungsstudie gewählt und aufgrund der hohen Kosten ^{14}C -markierter Standard wurde mit diesen weitere Experimente durchgeführt. Mittels des ^{14}C -Aspartams konnten die in der Literatur bekannten Abbauprodukte als auch unbekannte Produkte zugeordnet werden. Ausgehend von Aspartam wurden insgesamt fünf Abbauprodukte detektiert und drei davon eindeutig identifiziert. In weiteren Forschungsarbeiten wären eine Risikoanalyse und eine Betrachtung der Toxikokinetik sowie Toxikodynamik im Körper sinnvoll. Beispielsweise liegen für das bereits bekannte Abbauprodukt DKP keine eindeutigen Daten diesbezüglich vor. Durch die Instabilität des Aspartam-Moleküls in Abhängigkeit von Temperatur, Zeit und pH-Wert sollte der Einsatz dieses Süßstoffes ebenfalls noch weiter untersucht und kritisch betrachtet werden. Dies würde eventuelle Gesundheitsrisiken für Verbraucher minimieren.

7 Literaturverzeichnis

1. Augustin, M.R., M.; Stockmann, R.; Bennett, L.; Kahl, A.; Lockett, T.; Osmond, M.; Sanguansri, P.; Stonehouse, W.; Zajac, I. and Cobiac, L., *Role of food processing in food and nutrition security*. Trends in Food Science & Technology, 2016. **56**: p. 115-125.
2. Kearns, C.E., L.A. Schmidt, and S.A. Glantz, *Sugar industry and coronary heart disease research: a historical analysis of internal industry documents*. JAMA internal medicine, 2016. **176**(11): p. 1680-1685.
3. Association, A.P., *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5)*. 4 ed. 2000: American Psychiatric Pub.
4. Lakhan, S.E. and K.F. Vieira, *Nutritional therapies for mental disorders*. Nutrition journal, 2008. **7**(1): p. 2.
5. Stockmeier, C.A., *Neurobiology of Serotonin in Depression and Suicide a*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1997. **836**(1): p. 220-232.
6. Van Praag, H.M., *Depression, suicide and the metabolism of serotonin in the brain*. Journal of Affective Disorders, 1982.
7. McLean, A., et al., *The effects of tyrosine depletion in normal healthy volunteers: implications for unipolar depression*. Psychopharmacology, 2004. **171**(3): p. 286-297.
8. Bourre, J., *Dietary omega-3 fatty acids and psychiatry: mood, behaviour, stress, depression, dementia and aging*. J nutr Health aging, 2005. **9**(1): p. 31-8.
9. Schachter, J., et al., *Effects of obesity on depression: a role for inflammation and the gut microbiota*. Brain, Behavior, and Immunity, 2018. **69**: p. 1-8.
10. Sánchez-Villegas, A., et al., *Fast-food and commercial baked goods consumption and the risk of depression*. Public health nutrition, 2012. **15**(3): p. 424-432.
11. Simopoulos, A.P., *An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity*. Nutrients, 2016. **8**(3): p. 128.
12. Stanhope, K.L., *Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2016. **53**(1): p. 52-67.
13. Vetsch, W., *Aspartame: Technical Considerations and Predicted Use*. Food Chemistry 1984. **16**: p. 245-258.
14. Magnuson, B.A., et al., *Aspartame: A Safety Evaluation Based on Current Use Levels, Regulations, and Toxicological and Epidemiological Studies*. Critical Reviews in Toxicology, 2008. **37**(8): p. 629-727.
15. Löffler, G., *Basiswissen Biochemie*. 2008.
16. Goodman, B.E., *Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans*. Adv Physiol Educ, 2010. **34**(2): p. 44-53.
17. Löffler, G., *Basiswissen Biochemie*. 2008: p. 9.
18. Daubner, S.C.L., T. and Wang, S., *Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis*. Arch Biochem Biophys, 2011. **508**(1): p. 1-12.
19. Giustini, C.G., M.; Cobessi, D.; Crouzy, S.; Robin, A.; Curien, G. and Matringe, M., *Tyrosine metabolism: identification of a key residue in the acquisition of prephenate aminotransferase activity by 1beta aspartate aminotransferase*. FEBS J, 2019. **286**(11): p. 2118-2134.
20. Meister, A., *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. 2009.
21. Löffler, G., *Basiswissen der Biochemie*. 2009: Springer.

22. Sandler, M.G., V.; Asford, A. and Esmail, A., *The inhibition of tyramine oxidation and the tyramine hypertensive response ("cheese effect") may be independent phenomena*. 1980: p. 241-247.
23. Nagatsu, T., *The catecholamine system in health and disease —Relation to tyrosine 3-monooxygenase and other catecholamine-synthesizing enzymes*. 2007: p. 388-415.
24. Berke, J.D., *What does dopamine mean?* Nat Neurosci, 2018. **21**(6): p. 787-793.
25. O'Neil, A.B., M.; Itsiopoulos, C.; Castle, D.; Opie, R.; Pizzinga, J.; Brazionis, L.; Hodge, A.; Mihalopoulos, C.; Chatterton, M.; Dean, O. and Jacka, F., *A randomised, controlled trial of a dietary intervention for adults with major depression (the "SMILES" trial): study protocol*. BMC Psychiatry, 2013.
26. Ljahdali, N.a.C., F., *Impact of Maillard reaction products on nutrition and health: Current knowledge and need to understand their fate in the human digestive system*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2019. **59**(3): p. 474-487.
27. Portune, K.B., M.; Davila, A.; Tomé, D.; Blachier, F. and Sanz, Y., *Gut microbiota role in dietary protein metabolism and health-related outcomes: The two sides of the coin*. Trends in Food Science & Technology, 2016. **57**: p. 213-232.
28. Blondeau, N.L., R. H.; Bourourou, M.; Duncan, M. W.; Gorelick, P. B. and Marini, A. M., *Alpha-linolenic acid: an omega-3 fatty acid with neuroprotective properties-ready for use in the stroke clinic?* Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 519830.
29. Nagao, K.M., A. and Umeda, M., *Recent Progress in Biophysical Research of Biological Membrane Systems*. 2018: p. 327–332.
30. Schmidt, R.F.a.T., G., *Physiologie des Menschen*. 2013.
31. Xiao, C.S., P. and Lewis, G. F., *Regulation of Chylomicron Secretion: Focus on Post-Assembly Mechanisms*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2019. **7**(3): p. 487-501.
32. Stark, A.H.C., M. A. and Reifen, R., *Update on alpha-linolenic acid*. Nutr Rev, 2008. **66**(6): p. 326-32.
33. Hammond, V.J.a.O.D., V. B., *Esterified eicosanoids: generation, characterization and function*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(10): p. 2403-12.
34. Aguilera, J.M., *The food matrix: implications in processing, nutrition and health*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2019. **59**(22): p. 3612-3629.
35. Heiss, R., *Lebensmitteltechnologie*. 1996: Springer.
36. Löffler, G., *Basiswissen der Biochemie*. 2008: Springer.
37. Belitz, H., W. Grosch, and P. Schieberle, *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 2001: Springer.
38. Sansano, M.H., A.; Peinado, I. and Andres, A., *Dietary acrylamide: What happens during digestion*. Food Chem, 2017. **237**: p. 58-64.
39. Information, N.C.f.B. *Tyrosine*. 2021; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tyrosine>.
40. Kuhn, S.D., S.; Colzato, L.; Norman, K.; Gallinat, J.; Brandmaier, A. M.; Lindenberger, U. and Widaman, K. F., *Food for thought: association between dietary tyrosine and cognitive performance in younger and older adults*. Psychol Res, 2019. **83**(6): p. 1097-1106.
41. Bogner, A., *Einfluß der Hitzebehandlung - Kochen und Druckkochen - auf Aminosäurezusammensetzung und Nährwert von Rindfleisch*. 1972: p. 33-35.

42. Kato, S.K., T. and Fujimaki, M., *Thermal Degradation of Aromatic Amino Acids*. Agricultural and Biological Chemistry, 2014. **35**(13): p. 2106-2112.
43. Liska, D.J.C., C. M.; Wang, D. D. and Szpylka, J., *Maillard reaction products and potatoes: have the benefits been clearly assessed?* Food Sci Nutr, 2016. **4**(2): p. 234-49.
44. Ratnayake, W.M.a.G., C., *Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper*. Ann Nutr Metab, 2009. **55**(1-3): p. 8-43.
45. Rajaram, S., *Health benefits of plant-derived alpha-linolenic acid*. Am J Clin Nutr, 2014. **100** Suppl 1: p. 443S-8S.
46. Journal, E., *Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol*. 2010.
47. Kumarathasan, R., Rajkumar, A.; Hunter, N. and Gesser, H., *AUTOXIDATION AND YELLOWING OF METHYL LINOLENATE*. 1992: p. 109-126.
48. Fournier, V.D., F.; Juanéda, P.; Dionisi, F.; Lambelet, Pi.; Sébédio, J. and Berdeaux, O., *Thermal degradation of long-chain polyunsaturated fatty acids during deodorization of fish oil*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2006. **108**(1): p. 33-42.
49. Hădărugă, N.H., D.; P.; Tatu, C.; Ordodi, V.; Bandur, G. and Lupea, A., *Thermal stability of the linoleic acid/ α - and β -cyclodextrin complexes*. Food Chemistry, 2006. **99**(3): p. 500-508.
50. Yagasaki, M.a.H., S., *Synthesis and application of dipeptides; current status and perspectives*. Appl Microbiol Biotechnol, 2008. **81**(1): p. 13-22.
51. Behr, A.a.S., T., *Bausteine des Lebens Einführung in die Chemie nachwachsender Rohstoffe*. 2017.
52. Magnuson, B.A.B., G. A.; Doull, J.; Kroes, R. M.; Marsh, G. M.; Pariza, M. W.; Spencer, P. S.; Waddell, W. J.; Walker, R. and Williams, G. M., *Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies*. Crit Rev Toxicol, 2007. **37**(8): p. 629-727.
53. Santos, N.C.d.A., L. M.; De Luca Canto, G.; Guerra, E. N. S.; Coelho, M. S. and Borin, M. F., *Metabolic effects of aspartame in adulthood: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2018. **58**(12): p. 2068-2081.
54. van Wegberg, A.M.J.M., A.; Ahring, K.; Belanger-Quintana, A., et al., *The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment*. Orphanet J Rare Dis, 2017. **12**(1): p. 162.
55. Union, A.d.E., *Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe*. 2018.
56. Department, S.R. *Konsum von Süßungsmitteln weltweit nach Art im Jahr 2014*. 2014
21.10.2015; Available from:
<https://de.statista.com/statistik/daten/studie/475074/umfrage/konsum-von-suessungsmitteln-weltweit-nach-art/>.
57. Rycerz, K. and J.E. Jaworska-Adamu, *Review paper: Effects of aspartame metabolites on astrocytes and neurons*. Folia Neuropathologica, 2013. **51**(1): p. 10-17.
58. Choudhary, A.K. and Y.Y. Lee, *Neurophysiological symptoms and aspartame: What is the connection?* Nutritional Neuroscience, 2018. **21**(5): p. 306-316.

59. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), *Scientific Opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive*. EFSA Journal, 2013. **11**(12).
60. U.S FDA, *Aspartame: commissioner's final decision; Notice: final decision following a hearing before a public board of inquiry*. Federal Register USA, 1981. **46**(142): p. 38283–38308.
61. Rennie, M.J., *An introduction to the use of tracers in nutrition and metabolism*. Proc Nutr Soc, 1999. **58**(4): p. 935-44.
62. Cassidy, P., *The Use of Radiolabeled Compounds for Residue Method Development*. 2019.
63. Currie, L., *The Remarkable Metrological History of Radiocarbon Dating [II]*. 2004.
64. Welsh, J.S., *Beta decay in science and medicine*. Am J Clin Oncol, 2007. **30**(4): p. 437-9.
65. Zlokazov, S.B.G., V.B.; Korenkova, A.V. and Zamyatina, A.A., *Preparation of ¹⁴C by Irradiation of Aluminum Nitride in Nuclear Reactor*. 2002: p. 58-61.
66. Edler, R., *Cocktails for Liquid Scintillation Counting - Application Note by PerkinElmer*. 2015.
67. Krajcar Bronic, I.H., N.; Baresic, J. and Obelic, B., *Measurement of ¹⁴C activity by liquid scintillation counting*. Appl Radiat Isot, 2009. **67**(5): p. 800-4.
68. PerkinElmer. *Liquid Scintillation Counting*. 23.01.2021]; Available from: <https://www.perkinelmer.com/de/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/radiometric/liquid-scintillation-counting.html>.
69. Broda, R., *A review of the triple-to-double coincidence ratio (TDCR) method for standardizing radionuclides*. Applied Radiation and Isotopes, 2003. **58**(5): p. 585-594.
70. Blaurock, M.D., *Becquerel and the Discovery of Radioactivity: Early Concepts*. 1996: p. 145-154.
71. Thomson, J. *Oxidizer Application Note - A Comparison of Sample Oxidation and Solubilization Techniques*. 2002; Available from: https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_Oxidizer_Techniques_Comparison.pdf.
72. Nahar, L.O., A. and Sarker, S. D., *A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010-2019)*. Phytochem Anal, 2020. **31**(4): p. 413-457.
73. Wu, N.a.C., A. M., *Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations*. J Sep Sci, 2007. **30**(8): p. 1167-82.
74. Yanagida, T., *Inorganic scintillating materials and scintillation detectors*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2018. **94**(2): p. 75-97.
75. KG, B.T.G.C., *HPLC Radioflow Detektor LB 509 Handbuch*. 1997.
76. Thermo Fisher Scientific. *Q Exactive Orbitrap Mass Spectrometers (MS)*. 15.06.2020]; Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-systems/orbitrap-lc-ms/q-exactive-orbitrap-mass-spectrometers.html>.
77. Michalski, A., et al., *Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer*. Molecular & Cellular Proteomics, 2011. **10**(9).
78. Wasserchemische Gesellschaft : Fachgruppe in der GDCh, *Anwendung des Non-Target-Screenings mittels LC-ESI-HRMS in der Wasseranalytik*. 2019.

79. Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie. *Stichwort: Ionisationsmethoden*. 13.06.2020]; Available from: <https://dgms.eu/de/ueber-uns-dgms/das-ist-massenspektrometrie/ionisationsmethoden/>.
80. Indelicato, S.B., D. and Ceraulo, L., *Recent Approaches for Chemical Speciation and Analysis by Electrospray Ionization (ESI) Mass Spectrometry*. *Front Chem*, 2020. **8**: p. 625945.
81. Zhang, J.Y., Y. and Kong, W., *Coulomb Explosion in Nanosecond Laser Fields*. *J Phys Chem Lett*, 2020. **11**(3): p. 1100-1105.
82. Creative Proteomics. *Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer*. 18.06.2020]; Available from: <https://www.creative-proteomics.com/support/q-exactive-hybrid-quadrupole-orbitrap-mass-spectrometer.htm>.
83. Thieme Römpp Online. *Stichwort: Massenspektrometrie*. 18.06.2020]; Available from: <https://roempp.thieme.de/VNMY1>.
84. Thieme Römpp Online. *Stichwort: Elektronenspray-Ionisation*. 05.05.2020]; Available from: <https://roempp.thieme.de/QD5DY>.
85. Trommer, H. *Die Massenspektrometrie: Methodische Grundlagen und Anwendungsbeispiele aus der pharmazeutischen Forschung*.
86. Scientific, T.F., *Improved sensitivity through enhanced ion transmission using an S-Lens on the LTQ Velos linear ion trap*. *Product Support Bulletin of Mass Spectrometry, PSB*, 2009. **128**.
87. Gross, J.H., *Massenspektrometrie*. 2019: Springer.
88. Savaryn, J.P.T., T. K. and Kelleher, N. L., *A researcher's guide to mass spectrometry-based proteomics*. *Proteomics*, 2016. **16**(18): p. 2435-43.
89. Gross, J., *Massenspektrometrie*. 2013.
90. Waters Cooperations, *System Introduction Vion IMS QToF 2018*.
91. Hammond, J., et al. *Application Note: A Comparative Study of Electrospray and UniSpray Sources Using ACQUITY UPC*. 2018 12.10.2020]; Available from: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006286en.pdf>.
92. Waters Cooperations. *SQ Detector 2*. 26.10.2020]; Available from: https://www.waters.com/waters/de_DE/SQ-Detector-2---Single-Quadrupole-Detection/nav.htm?cid=134631584&locale=de_DE.
93. Lacalle-Bergeron, L.P., T.; Lopez, F. J.; Sancho, J. V.; Ortega-Azorin, C.; Asensio, E. M.; Coltell, O. and Corella, D., *Ultra-Performance Liquid Chromatography-Ion Mobility Separation-Quadrupole Time-of-Flight MS (UHPLC-IMS-QTOF MS) Metabolomics for Short-Term Biomarker Discovery of Orange Intake: A Randomized, Controlled Crossover Study*. *Nutrients*, 2020. **12**(7).
94. May, J.C.M., C. B. and McLean, J. A., *Ion Mobility Collision Cross Section Compendium*. *Anal Chem*, 2017. **89**(2): p. 1032-1044.
95. Chernushevich, I.V.L., A. V. and Thomson, B. A., *An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*. *J Mass Spectrom*, 2001. **36**(8): p. 849-65.
96. Gross, J.H., *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*. 2012: Springer Spektrum.
97. Thieme Römpp Online. *Massenspektrometrie*. 26.10.2020].
98. Zhang, Q.W., G. and Tzipori, S., *A pig model of the human gastrointestinal tract*. *Gut Microbes*, 2013. **4**(3): p. 193-200.
99. Di Palma, S.B., P. J.; Heck, A. J. and Mohammed, S., *Zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography (ZIC-HILIC and ZIC-cHILIC) provide high resolution separation and increase sensitivity in proteome analysis*. *Anal Chem*, 2011. **83**(9): p. 3440-7.

100. Scientific, T.F., *Compound Discoverer User Guide - Software Version 3.0*. 2018: p. 1-2.
101. Gallien, S.D., E. ;Crone, C.;Kellmann, M.;Moehring, T. and Domon, B., *Targeted proteomic quantification on quadrupole-orbitrap mass spectrometer*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(12): p. 1709-23.
102. Ronsein, G.E.P., N.; von Haller, P. D.; Kim, D. S.; Oda, M. N.; Jarvik, G. P.; Vaisar, T. and Heinecke, J. W., *Parallel reaction monitoring (PRM) and selected reaction monitoring (SRM) exhibit comparable linearity, dynamic range and precision for targeted quantitative HDL proteomics*. J Proteomics, 2015. **113**: p. 388-99.
103. Kim, J.S.M., M. E.; Camp, D. G., Smith, R. D. and Qian, W. J., *In-source fragmentation and the sources of partially tryptic peptides in shotgun proteomics*. J Proteome Res, 2013. **12**(2): p. 910-6.
104. Yang, Q., *Gain weight by "going diet?" Artificial sweeteners and neurobiology of sugar cravings*. Yale Journal of biology and medicine 83, 2010: p. 101-108.
105. Sabah, S.a.S., G. , *Determination of aspartame and its degradation and epimerization products by capillary electrophoresis*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 1998: p. 1089-1096.
106. Horak, J.S., I.; Wimmer, K. and Schaubberger, G., *Cabin air temperature of parked vehicles in summer conditions: life-threatening environment for children and pets calculated by a dynamic model*. Theoretical and Applied Climatology, 2016. **130**(1-2): p. 107-118.
107. Fleszar, M.G.F., P.; Zawadzki, M.; Kosyk, B. and Krzystek-Korpaczka, M., *Simultaneous LC-MS/MS-Based Quantification of Free 3-Nitro-L-tyrosine, 3-Chloro-L-tyrosine, and 3-Bromo-L-tyrosine in Plasma of Colorectal Cancer Patients during Early Postoperative Period*. Molecules, 2020. **25**(21).
108. Zhong, B.L., Y.; Idippily, N.; Petty, A.; Su, B. and Wang, B., *A quantitative LC-MS/MS method for determination of a small molecule agonist of EphA2 in mouse plasma and brain tissue*. Biomed Chromatogr, 2019. **33**(4): p. e4461.
109. Virag, D.K., M.; Drahos, L.; Edes, A. E.; Gecse, K.; Bagdy, G.; Juhasz, G.; Antal, I.; Klebovich, I.; Dalmadi Kiss, B.; Ludanyi, K., *Development, validation and application of LC-MS/MS method for quantification of amino acids, kynurenine and serotonin in human plasma*. J Pharm Biomed Anal, 2020. **180**: p. 113018.
110. Yao, Y.C., H.; Yan, L.; Wang, W. and Wang, D., *Berberine alleviates type 2 diabetic symptoms by altering gut microbiota and reducing aromatic amino acids*. Biomed Pharmacother, 2020. **131**: p. 110669.
111. Xu, H.W., Z.; Zhu, L.; Sui, Z.; Bi, W.; Liu, R.; Bi, K. and Li, Q., *Targeted Neurotransmitters Profiling Identifies Metabolic Signatures in Rat Brain by LC-MS/MS: Application in Insomnia, Depression and Alzheimer's Disease*. Molecules, 2018. **23**(9).
112. Steiner, D.K., R.; Malachova, A.; Taschl, I. and Sulyok, M., *Evaluation of Matrix Effects and Extraction Efficiencies of LC-MS/MS Methods as the Essential Part for Proper Validation of Multiclass Contaminants in Complex Feed*. J Agric Food Chem, 2020. **68**(12): p. 3868-3880.
113. Erben, V.P., G.; Schrotz-King, P. and Brenner, H., *Evaluation of different stool extraction methods for metabolomics measurements in human fecal samples*. 2020.
114. Mondanelli, G.I., A.; Carvalho, A.; Orabona, C.; Volpi, C.; Pallotta, M. T.; Matino, D.; Esposito, S. and Grohmann, U., *Amino acid metabolism as drug target in autoimmune diseases*. Autoimmun Rev, 2019. **18**(4): p. 334-348.

115. Dodd, D.S., M. H.; Van Treuren, W.; Merrill, B. D.; Hryckowian, A. J.; Higginbottom, S. K.; Le, A.; Cowan, T. M.; Nolan, G. P.; Fischbach, M. A. and Sonnenburg, J. L., *A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites*. Nature, 2017. **551**(7682): p. 648-652.
116. van Kessel, S.P.F., A. K.; El-Gendy, A. O.; Castejon, M.; Keshavarzian, A.; van Dijk, G. and El Aidy, S., *Gut bacterial tyrosine decarboxylases restrict levels of levodopa in the treatment of Parkinson's disease*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 310.
117. Dupuy, A.L.F., P.; Vigor, C.; Oger, C.; Galano, J. M.; Dray, C.; Lee, J. C.; Valet, P.; Gladine, C.; Durand, T. and Bertrand-Michel, J., *Simultaneous quantitative profiling of 20 isoprostanoids from omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids by LC-MS/MS in various biological samples*. Anal Chim Acta, 2016. **921**: p. 46-58.
118. Adolph, S.S., C.; Blaue, D.; Schoniger, A.; Gittel, C.; Brehm, W.; Fuhrmann, H. and Vervuert, I., *Lipid classes in adipose tissues and liver differ between Shetland ponies and Warmblood horses*. PLoS One, 2019. **14**(3): p. e0207568.
119. Jiyane, P.C.T., K. and Musonge, P., *Optimisation of Croton gratissimus Oil Extraction by n-Hexane and Ethyl Acetate Using Response Surface Methodology*. J Oleo Sci, 2018. **67**(4): p. 369-377.
120. Burdge, G.C., *Metabolism of alpha-linolenic acid in humans*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2006. **75**(3): p. 161-8.
121. de Sousa, I.P.S.T., M. V. and Jacometti Cardoso Furtado, N. A., *An Overview of Biotransformation and Toxicity of Diterpenes*. Molecules, 2018. **23**(6).
122. Tarlungeanu, D.C., et al., *Impaired Amino Acid Transport at the Blood Brain Barrier Is a Cause of Autism Spectrum Disorder*. Cell, 2016. **167**(6): p. 1481-1494 e18.
123. Atzrodt, J.D., V. and Loewe, C., *Synthesis of Radiolabelled Compounds for Clinical Studies*. 2017: p. 1-19.
124. Isin, E.M.E., C. S.; Nilsson, G. N.; Thompson, R. A. and Weidolf, L. , *Use of radiolabeled compounds in drug metabolism and pharmacokinetic studies*. Chem Res Toxicol, 2012. **25**(3): p. 532-42.
125. Haydari, M.M., V.; Rigano, D.; Taleei, A.; Shahnejat-Bushehri, A. A.; Hadian, J.; Sorbo, S.; Guida, M.; Manna, C.; Piscopo, M.; Notariale, R.; De Ruberto, F.; Fusaro, L. and Basile, A., *Salicylic Acid and Melatonin Alleviate the Effects of Heat Stress on Essential Oil Composition and Antioxidant Enzyme Activity in Mentha x piperita and Mentha arvensis L*. Antioxidants (Basel), 2019. **8**(11).
126. Zhang, Z.L., D. and Zhang, L., *Effect of Heating on the Fatty Acid Composition and Oxidation Products of Flaxseed Oil*. Asian Journal of Chemistry, 2013. **25**(18): p. 10082-10086.
127. Celiński, M.B., M.; Gloc, M.; Gajek, A. and Sałasińska, K., *Determination of explosion characteristics, fire behavior and thermal degradation products of aspartame*. Fire Safety Journal, 2020. **117**: p. 103208.
128. Berset, J.D.a.O., N., *Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)*. Chemosphere, 2012. **88**(5): p. 563-9.
129. Otabe, A.O., F.; Takumi, A. and Lynch, B., *Mutagenicity and genotoxicity studies of aspartame*. Regul Toxicol Pharmacol, 2019. **103**: p. 345-351.

130. Kumazawa, K.a.M., H., *Effect of pH on the Thermal Stability of Potent Roasty Odorants, 3-Mercapto-3-methylbutyl Esters, in Coffee Drink*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003: p. 8032-8035.
131. Sargaeva, N.P.L., C. and O'Connor, P. B., *Identification of aspartic and isoaspartic acid residues in amyloid beta peptides, including Abeta1-42, using electron-ion reactions*. Anal Chem, 2009. **81**(23): p. 9778-86.
132. Thiele, D.L. and P.E. Lipsky, *Spectrum of toxicities of amino acid methyl esters for myeloid cells is determined by distinct metabolic pathways*. Blood, 1992. **79**(4): p. 964-971.
133. Loftsson, T.a.B., J., *The stability of aspartme in aqueous solutions*. Acta pharaceutica Nordica, 1992: p. 329-330.
134. Amidon, G.L.Y., S. H. and Leung, S., *Solubility of nonelectrolytes in polar solvents II: solubility of aliphatic alcohols in water*. J Pharm Sci, 1974. **63**(12): p. 1858-66.
135. Cadirci, K.O.T., O.; Turkez, H. and Mardinoglu, A., *The in vitro cytotoxic, genotoxic, and oxidative damage potentials of the oral artificial sweetener aspartame on cultured human blood cells*. Turk J Med Sci, 2020. **50**(2): p. 448-454.
136. Loftsson, T.a.B., J., *The stability of aspartame in aqueous solutions*. Acta pharaceutica Nordica, 1992: p. 329-330.
137. Choudhary, A.a.P., E., *Revisiting the safety of aspartame*. Nutrition Reviews, 2017. **75**(9): p. 718-730.

8 Anhang

8.1 Ergänzende Abbildungen

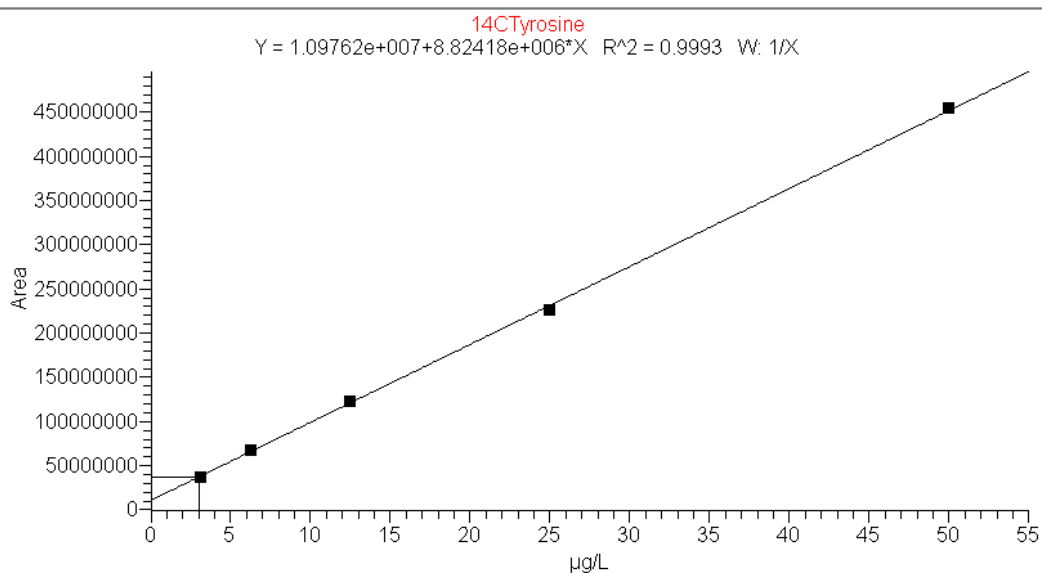


Abbildung 56: ermittelte Kalibriergerade der ¹⁴C-Tyrosin-Standard Lösungen

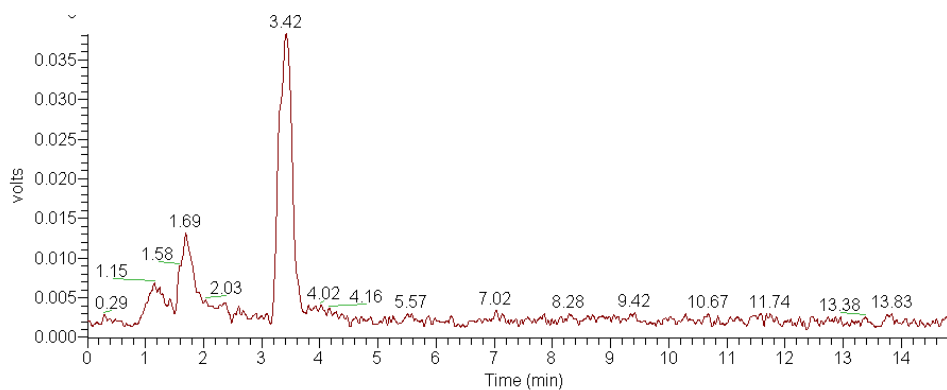


Abbildung 57: Radio-UHPLC-Chromatogramm der QuEChERS-Extraktion einer dotierten ¹⁴C-Tyrosin-Öl-Probe, gemessen mit einer C18-Säule

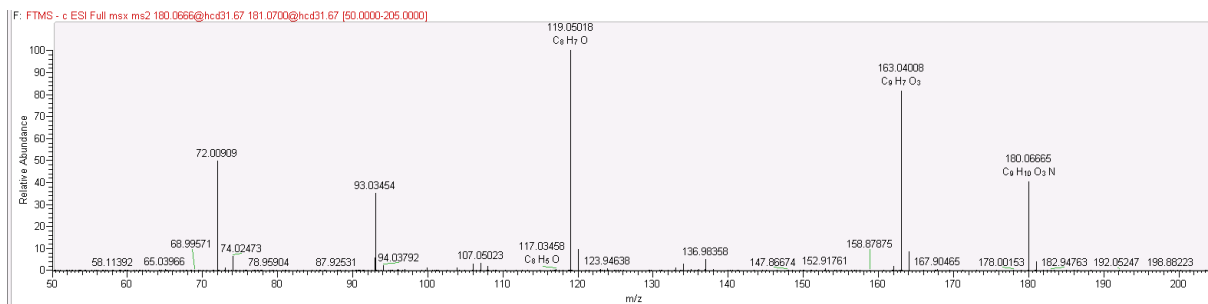


Abbildung 58: Fragmentspektrum einer ¹²C-Tyrosin-Standardlösung (1mg/L) im ESI-negativen Modus, aufgenommen mittels Q Exactive™ Plus

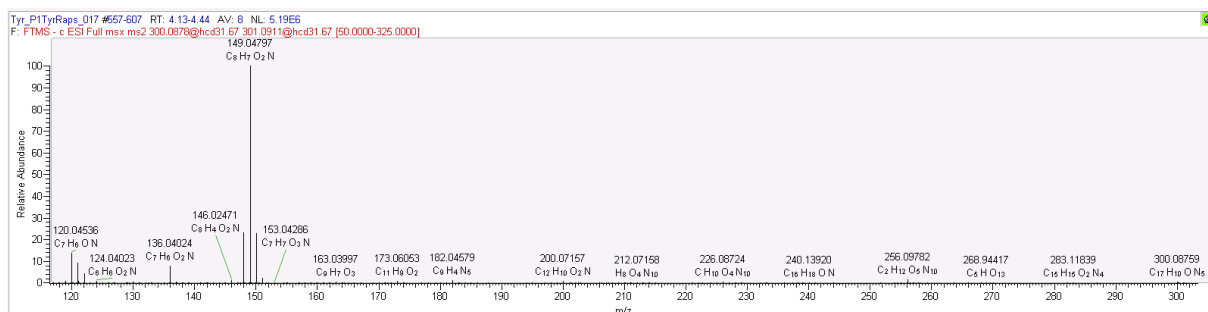


Abbildung 59: Fragmentspektrum einer erhitzten ¹²C-Tyrosin-Öl-Probe (1mg/L) im ESI-negativen Modus, aufgenommen mittels Q Exactive™ Plus

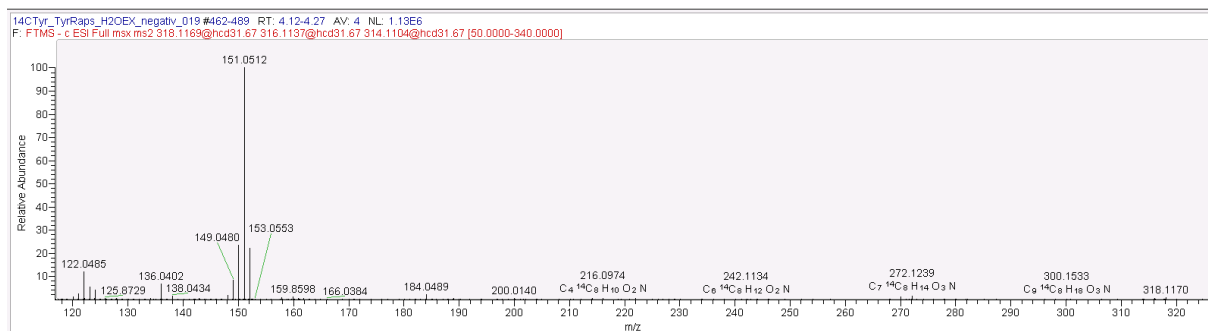


Abbildung 60: Fragmentspektrum einer erhitzten ¹⁴C-Tyrosin-Öl-Probe (1000Bq/20µL) im ESI-negativen Modus, aufgenommen mittels Q Exactive™ Plus

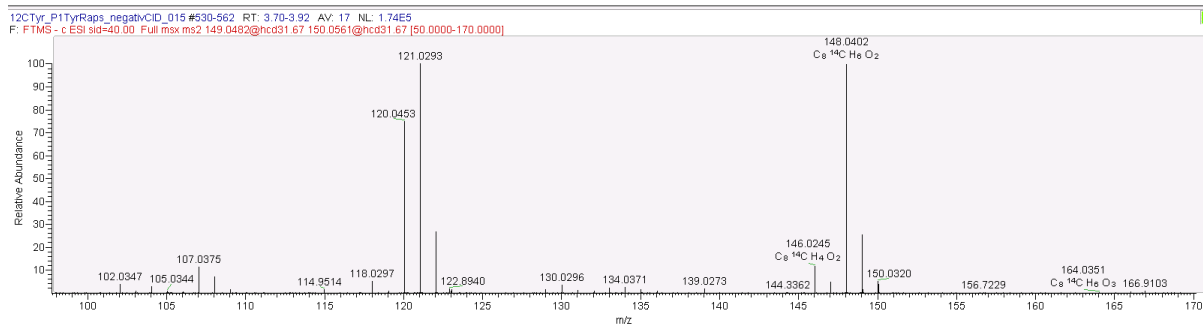


Abbildung 61: In-Source-Fragmentierung des m/z 300,08774 , aufgenommen mittels Q Exactive™ Plus

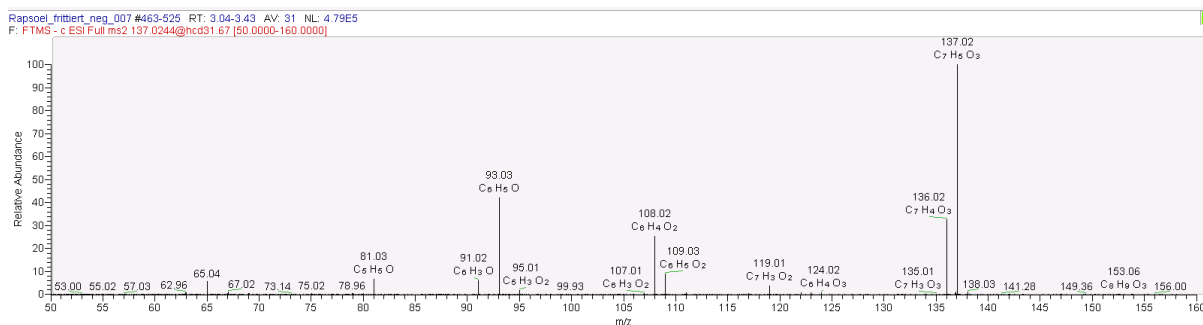


Abbildung 62: Fragmentspektrum des m/z 137,02 einer ¹²C-Tyrosin-dotierten und -erhitzten Öl-Probe , aufgenommen mittels Q Exactive™ Plus

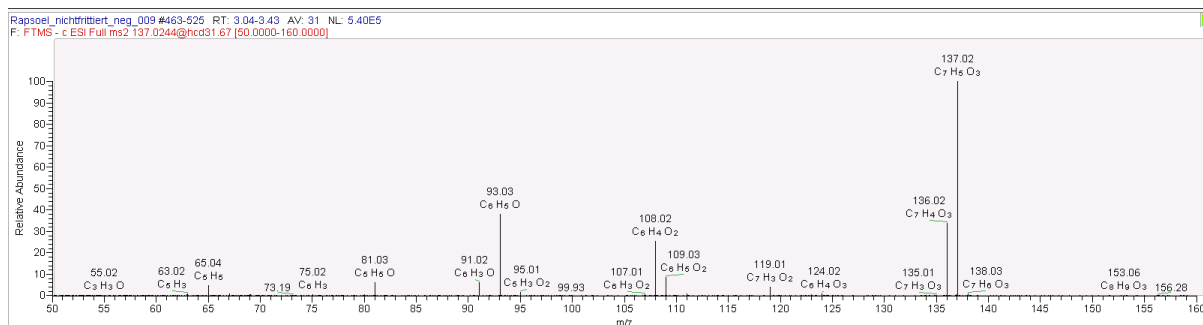


Abbildung 63: Fragmentspektrum des m/z 137,02 einer nicht erhitzten Öl-Probe , aufgenommen mittels Q Exactive™ Plus

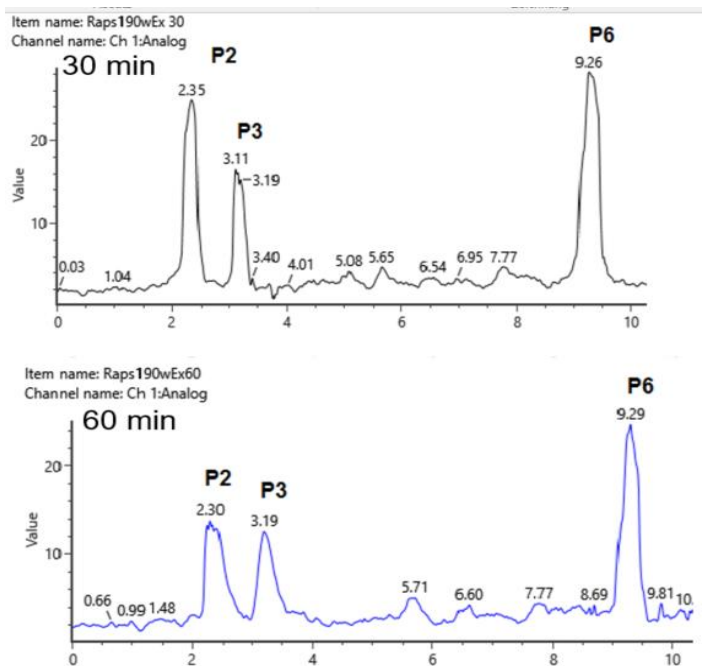


Abbildung 64: Radio-UHPLC-Chromatogramm der wässrigen-Öl-Extraktion nach 30 Minuten und 60 Minuten Erhitzungsdauer bei 190 °C

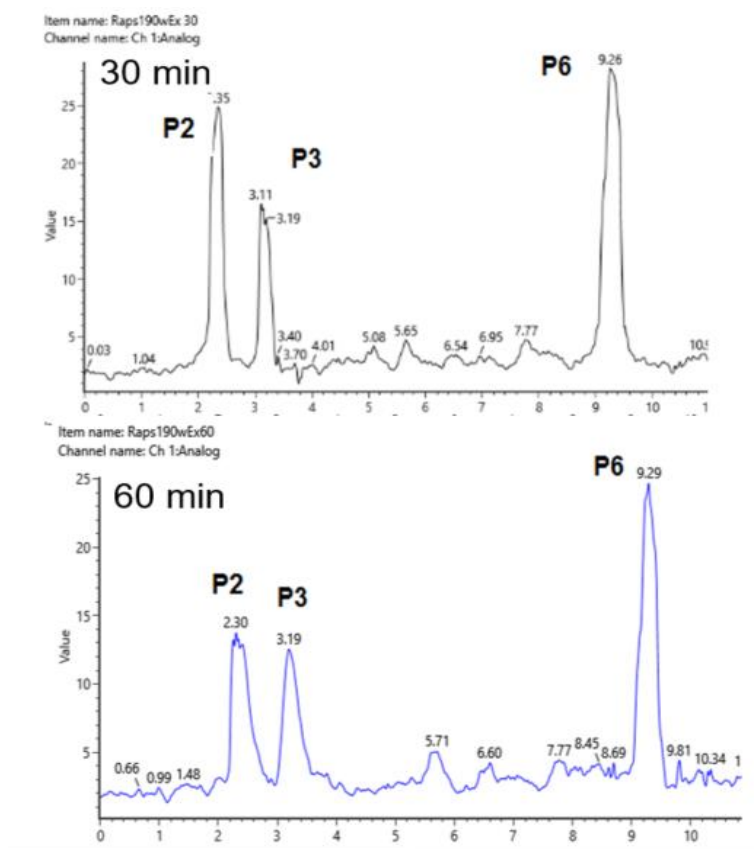


Abbildung 65: Radio-UHPLC-Chromatogramm der QuEChERS-Öl-Extraktion nach 30 Minuten und 60 Minuten Erhitzungsdauer bei 190 °C

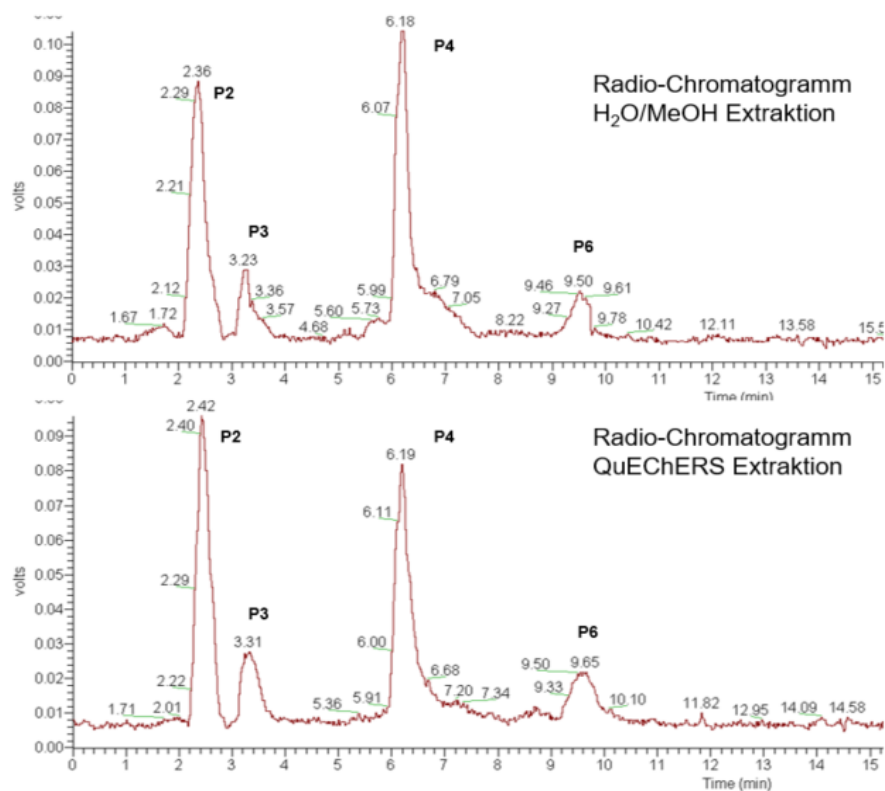


Abbildung 66: Radio-UHPLC-Chromatogramme der Extraktionen der Kleingepäckproben gemessen an der Orbitrap Exactive™ Plus

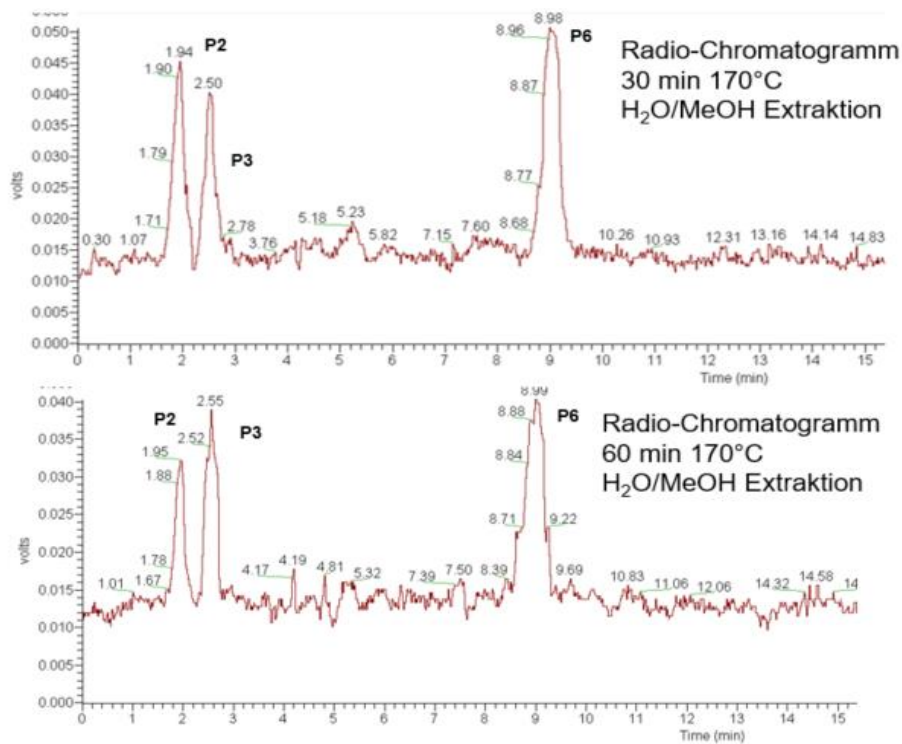


Abbildung 67: Radio-UHPLC-Chromatogramme der Extraktionen der Öl-Proben bei 170°C, gemessen an der Orbitrap Exactive™ Plus

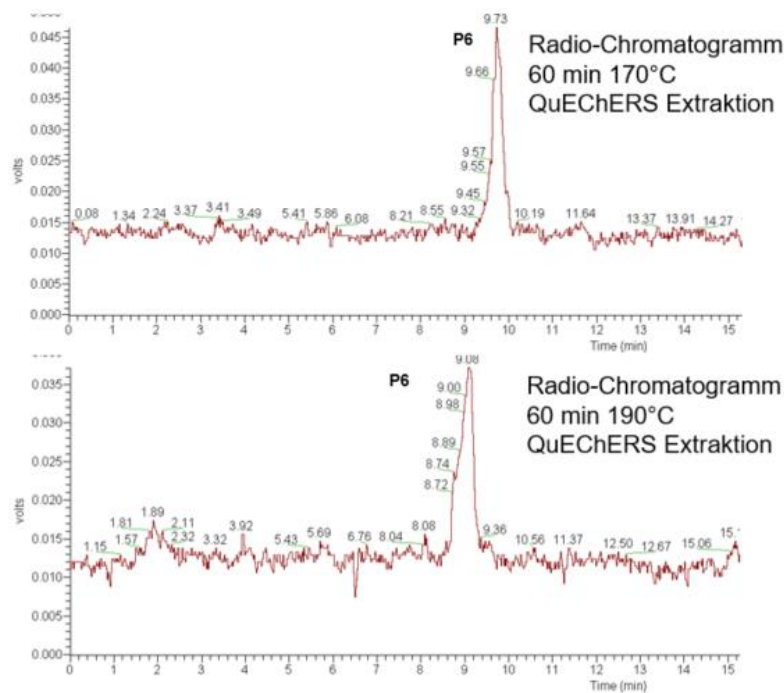


Abbildung 68: Radio-UHPLC-Chromatogramme der Extraktionen der Öl-Proben bei 170 und 190°C, gemessen an der Orbitrap Exactive™ Plus

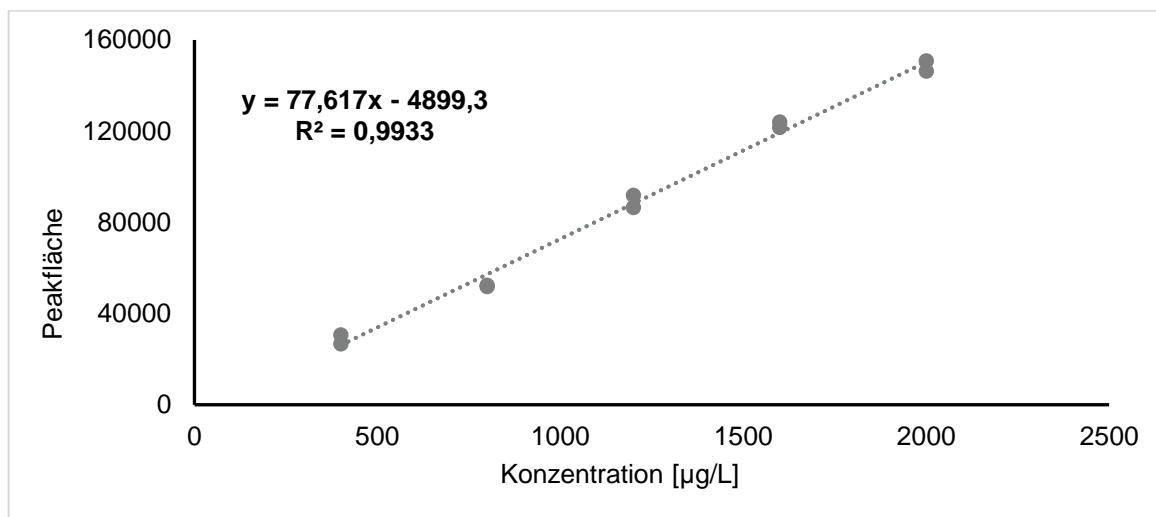


Abbildung 69: Kalibriergerade von DKP (Doppelmessung)

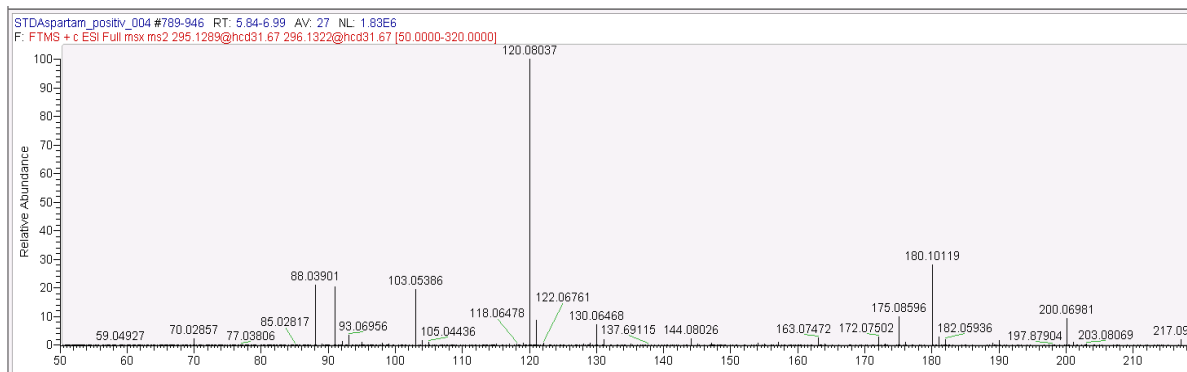


Abbildung 70: MS/MS-Fragment-Spektrum des m/z 295,1289 (ESI pos) von dem ^{12}C -Aspartam Standard, aufgenommen mittels Q Exactive™ Plus



Abbildung 71: Erhitzungsversuch von ^{14}C -Aspartam in Kaffee, schematische Übersicht

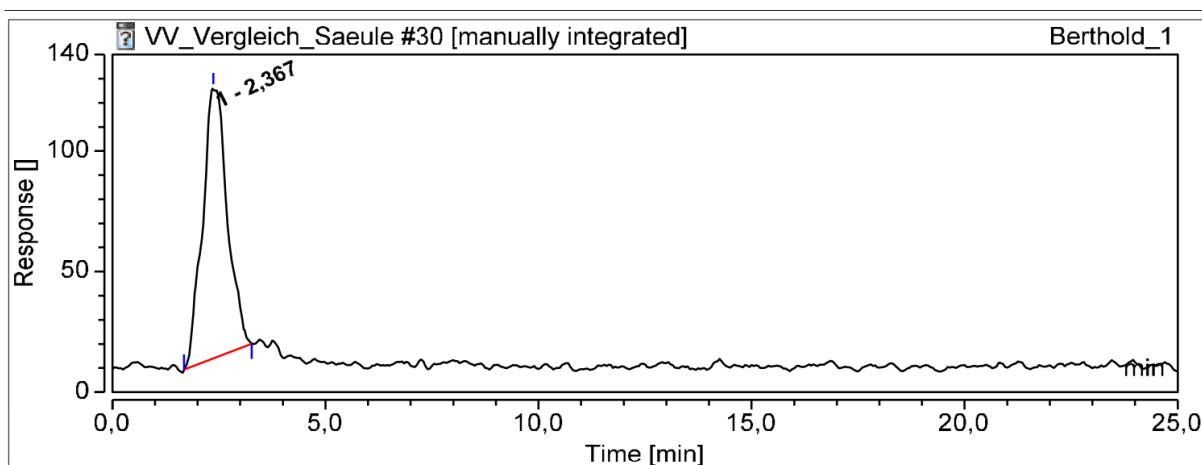


Abbildung 72: HPLC-Radio-Chromatogramm der erhitzten ^{12}C - und ^{14}C -Aspartam-Probe in H_2O ohne AcNH_4 im Fließmittel, aufgenommen mittels Ultimate 3000 HPLC System

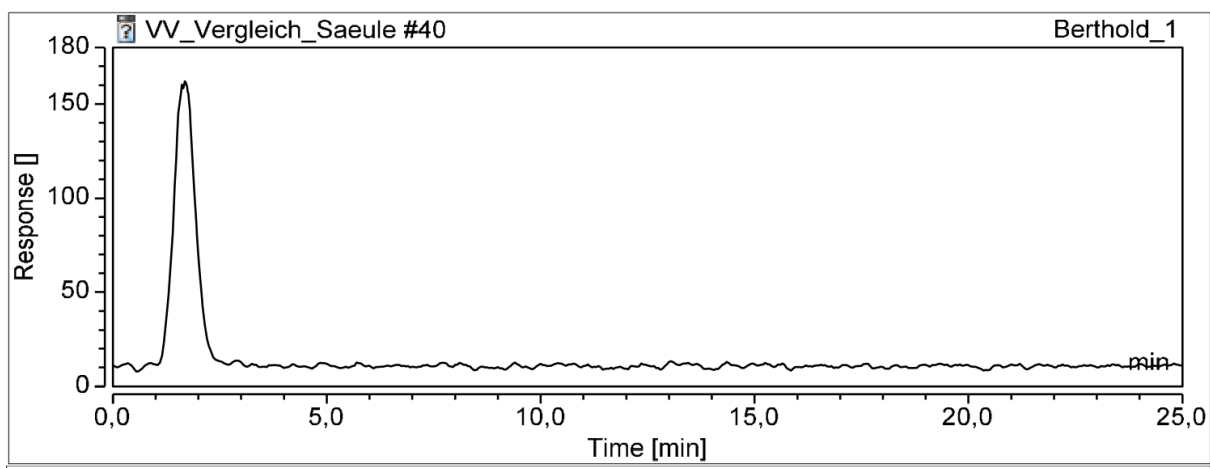


Abbildung 73: HPLC-Radio-Chromatogramm der erhitzten ^{12}C - und ^{14}C -Aspartam-Probe in H_2O ohne AcNH_4 im Fließmittel mit FA, aufgenommen mittels UltiMate 3000 HPLC System

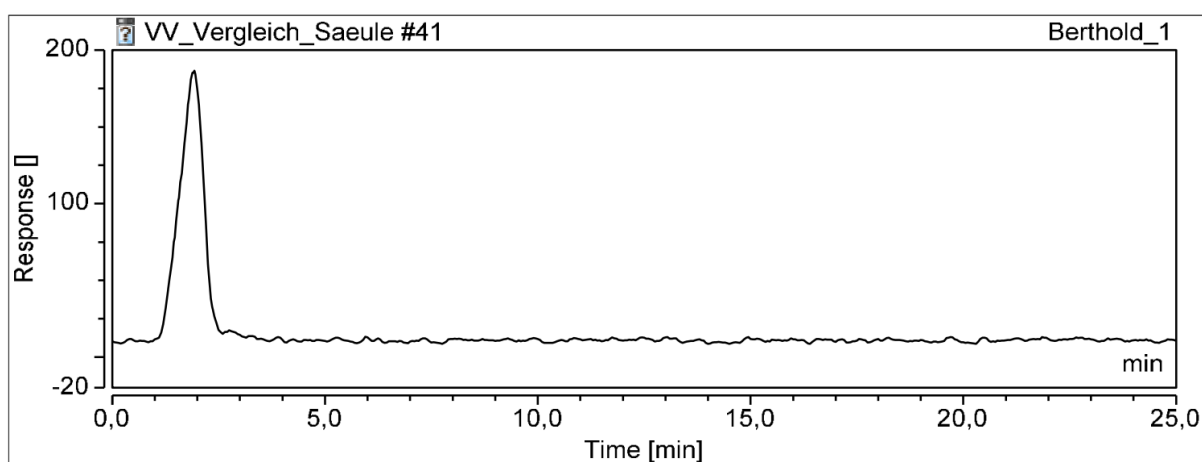


Abbildung 74: HPLC-Radio-Chromatogramm der erhitzten ^{12}C - und ^{14}C -Aspartam-Probe in H_2O ohne AcNH_4 im Fließmittel mit Ammoniakwasser, aufgenommen mittels UltiMate 3000 HPLC System

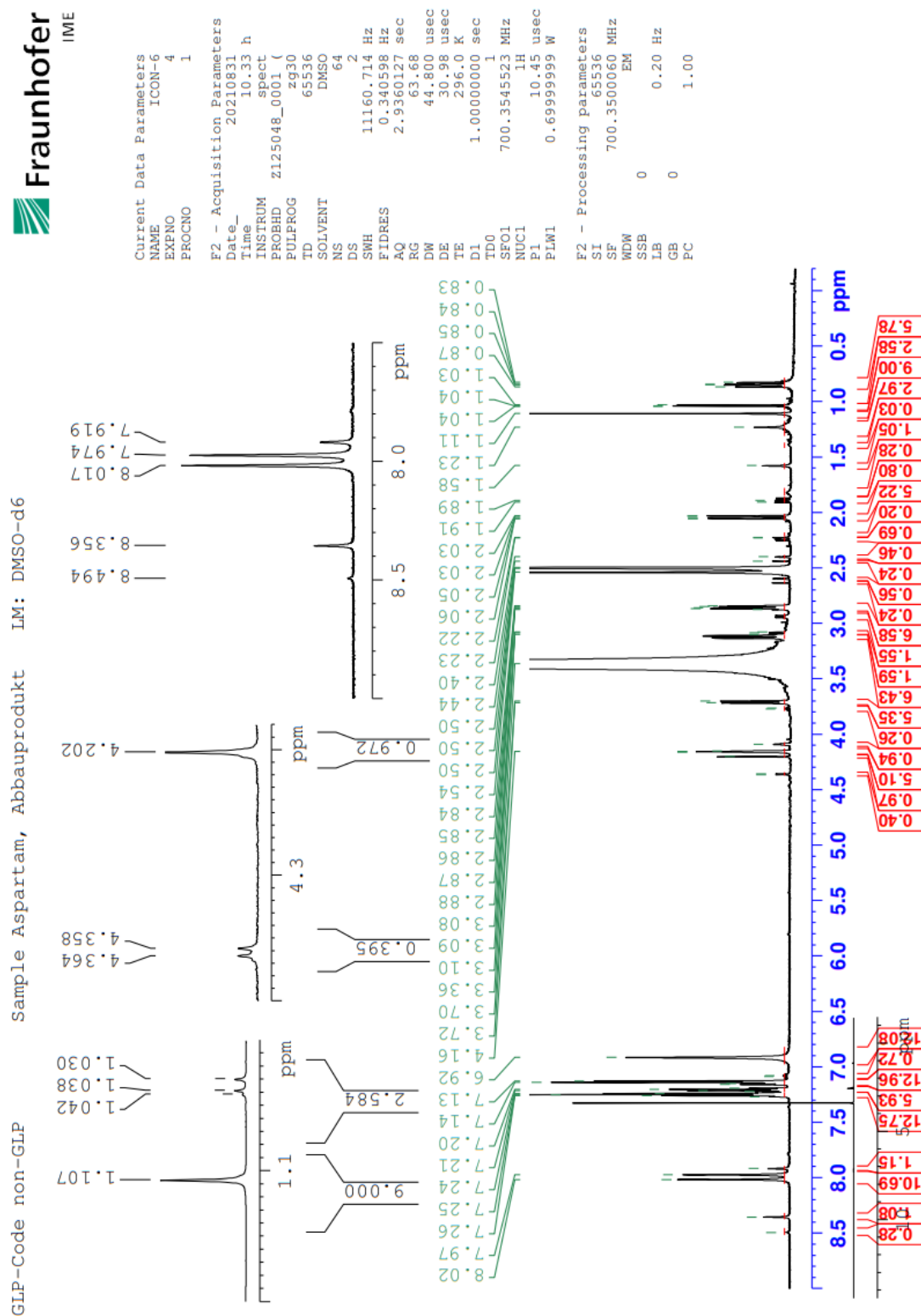


Abbildung 75: ^1H -NMR-Spektrum des Gemisches von drei Abbauprodukten des ^{14}C -Aspartam inklusive der Aufnahmeparameter (aufgenommen mit einem Bruker Ascend™ 700 NMR).

Sample Aspartam, Abbauprodukt IM: DMSO-d6

GLP-Code non-GLP

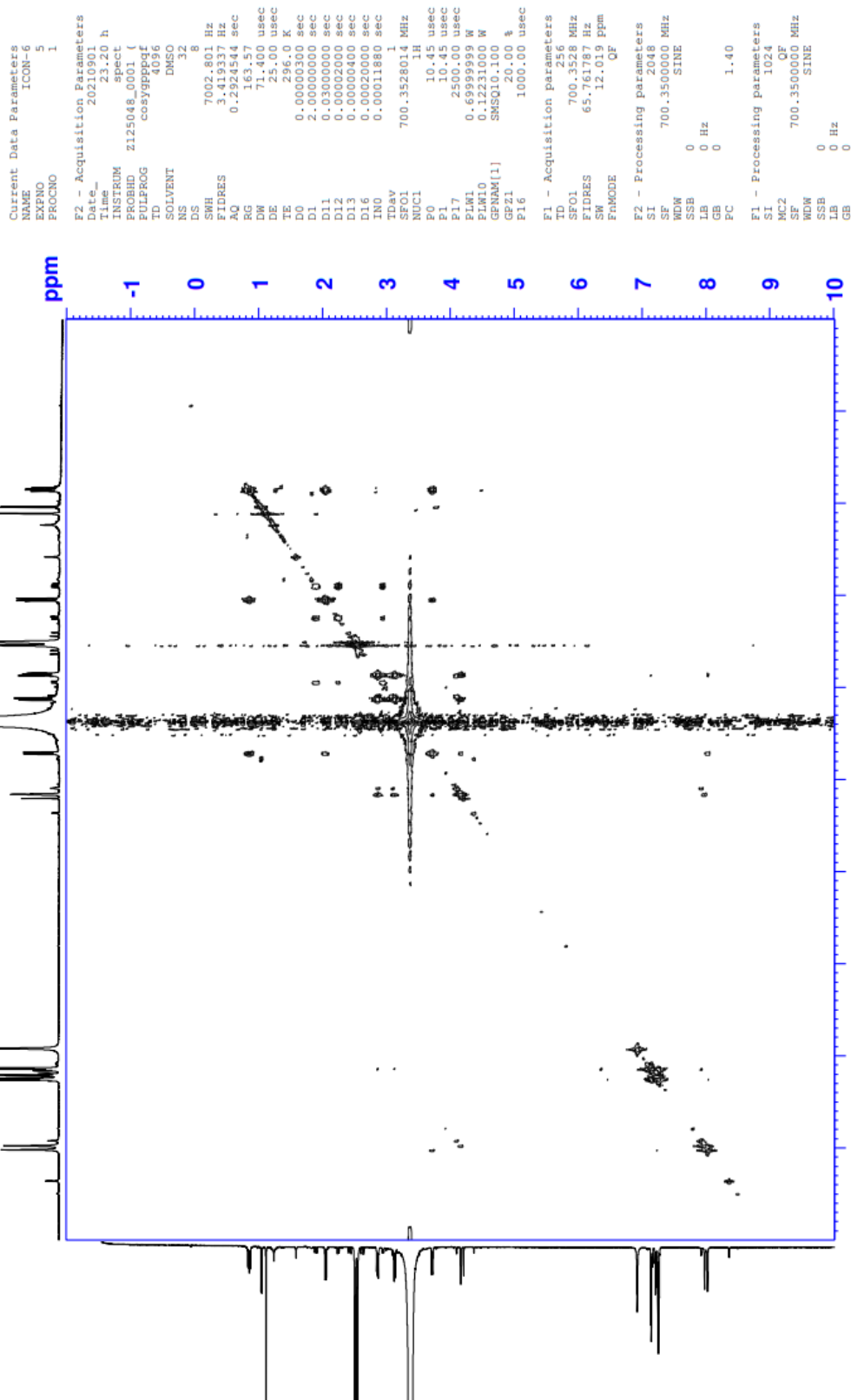


Abbildung 76: COSY-Spektrum des Gemisches von drei Abbauprodukten des ^{14}C -Aspartams inklusive der Aufnahmeparameter (aufgenommen mit einem Bruker AscendTM 700 NMR).



Abbildung 77: Zoom COSY-Spektrum für die Betätigung der benachbarten Kopplung der Protonen des Isopropanols.

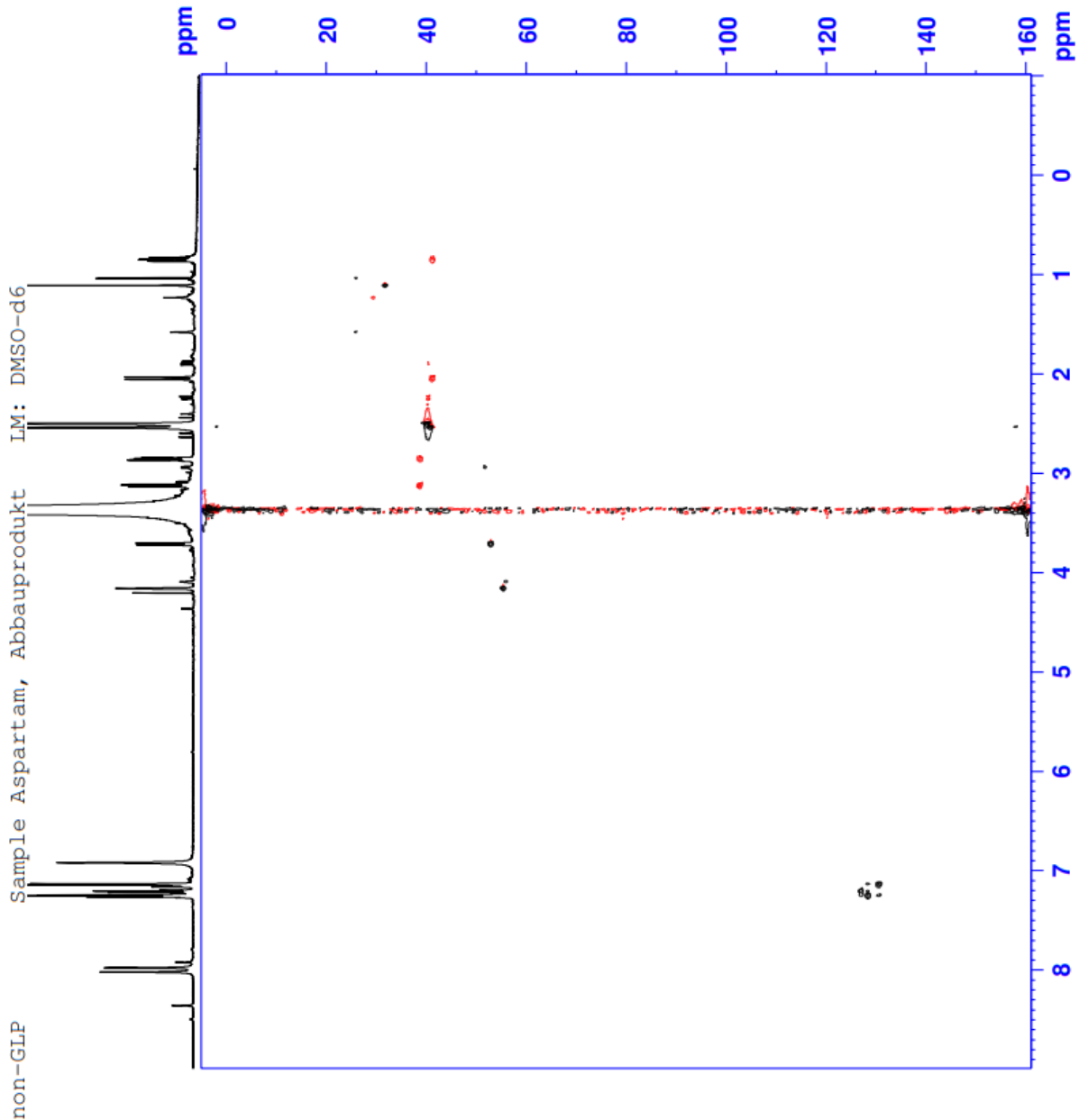


Abbildung 78: HSQC-Spektrum des Gemisches von drei Abbauprodukten des ^{14}C -Aspartams inklusive der Aufnahmeparameter (aufgenommen mit einem Bruker AscendTM 700 NMR).

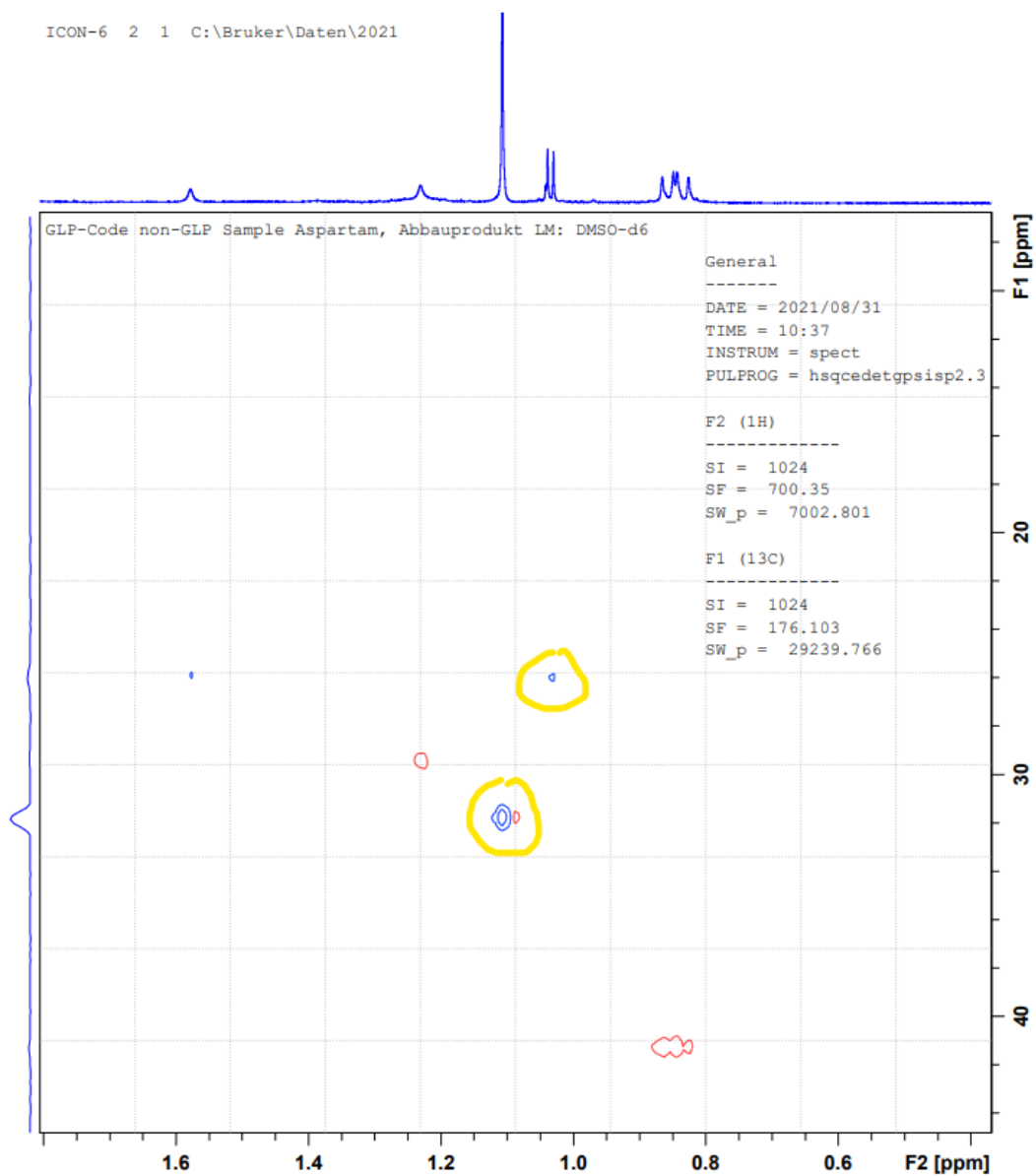


Abbildung 79: Zoom HSQC-Spektrum für die Zuordnung direkt gebundener H-Atome an C-Atomen (blau stellt eine ungerade Anzahl am H-Atomen dar und rot eine gerade)

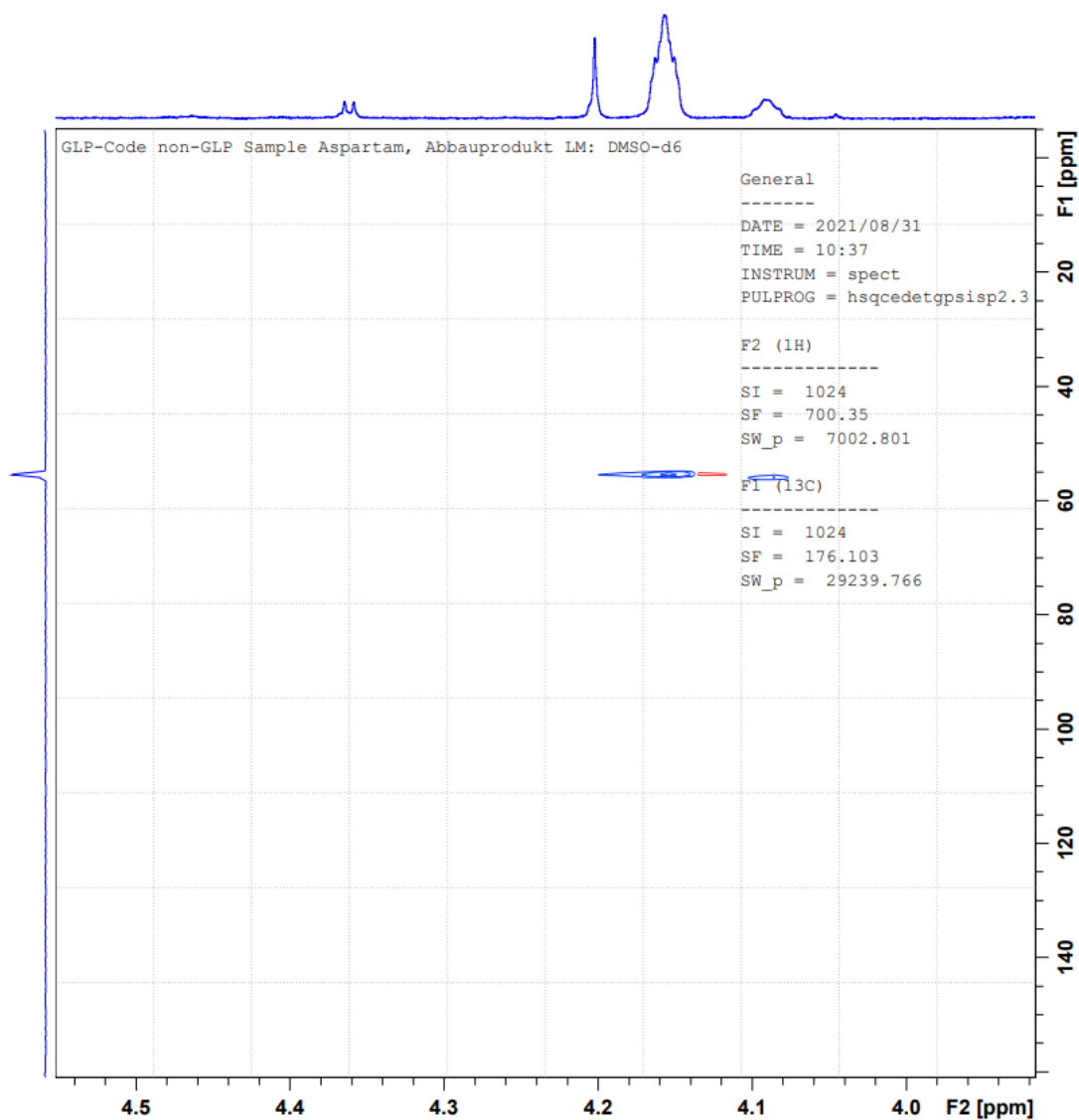


Abbildung 80: Zoom HSQC-Spektrum für die Überprüfung keiner Signale für die OH Gruppen von Isopropanol und tert-Butanol (blau stellt eine ungerade Anzahl am H-Atomen dar und rot eine gerade)

GLP-Code non-GLP Sample Aspartam, Abbauprodukt IM: DMSO-d6

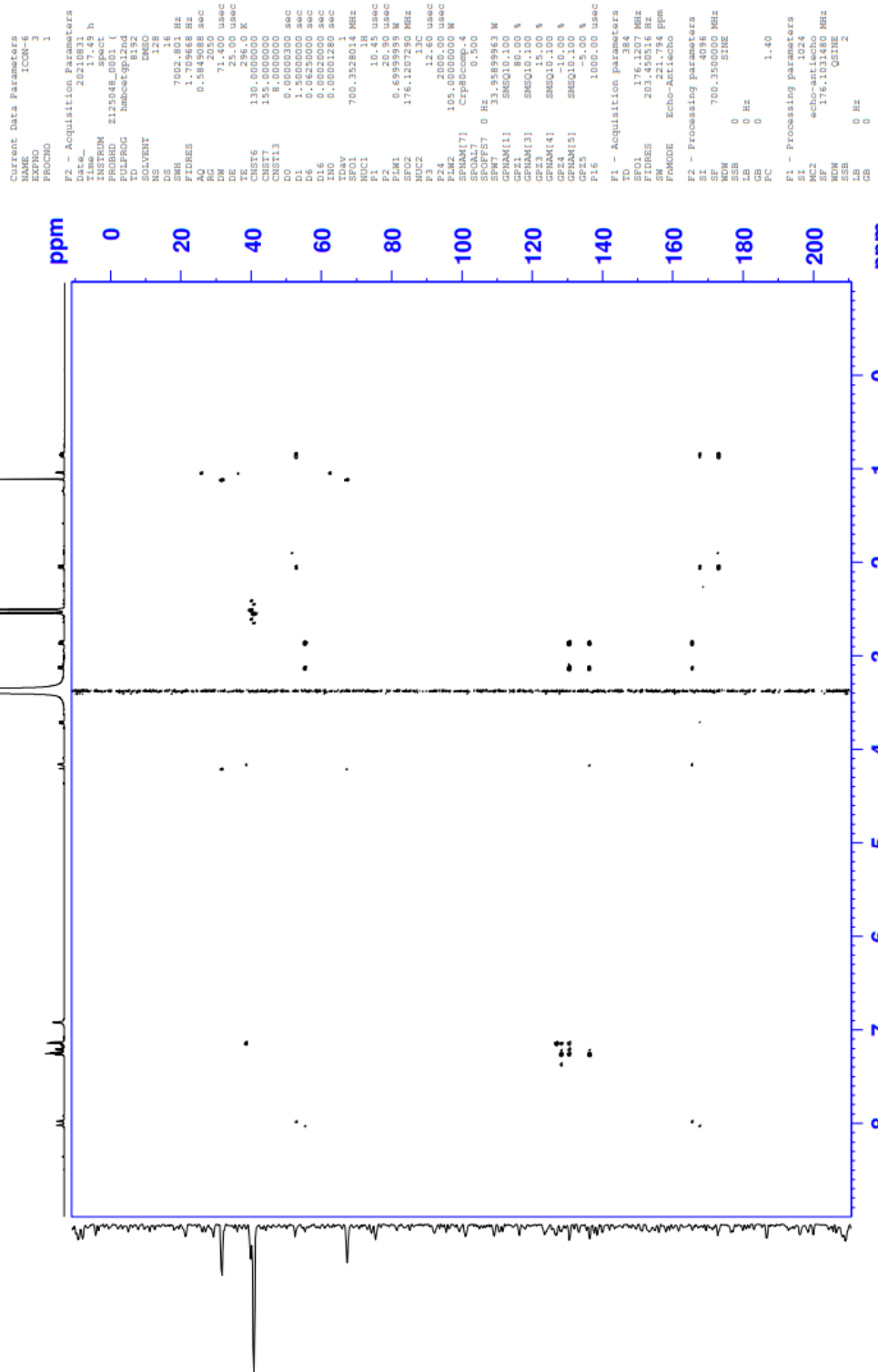


Abbildung 81: HMBC-Spektrum des Gemisches von drei Abbauprodukten des ^{14}C -Aspartams inklusive der Aufnahmeparameter (aufgenommen mit einem Bruker AscendTM 700 NMR).

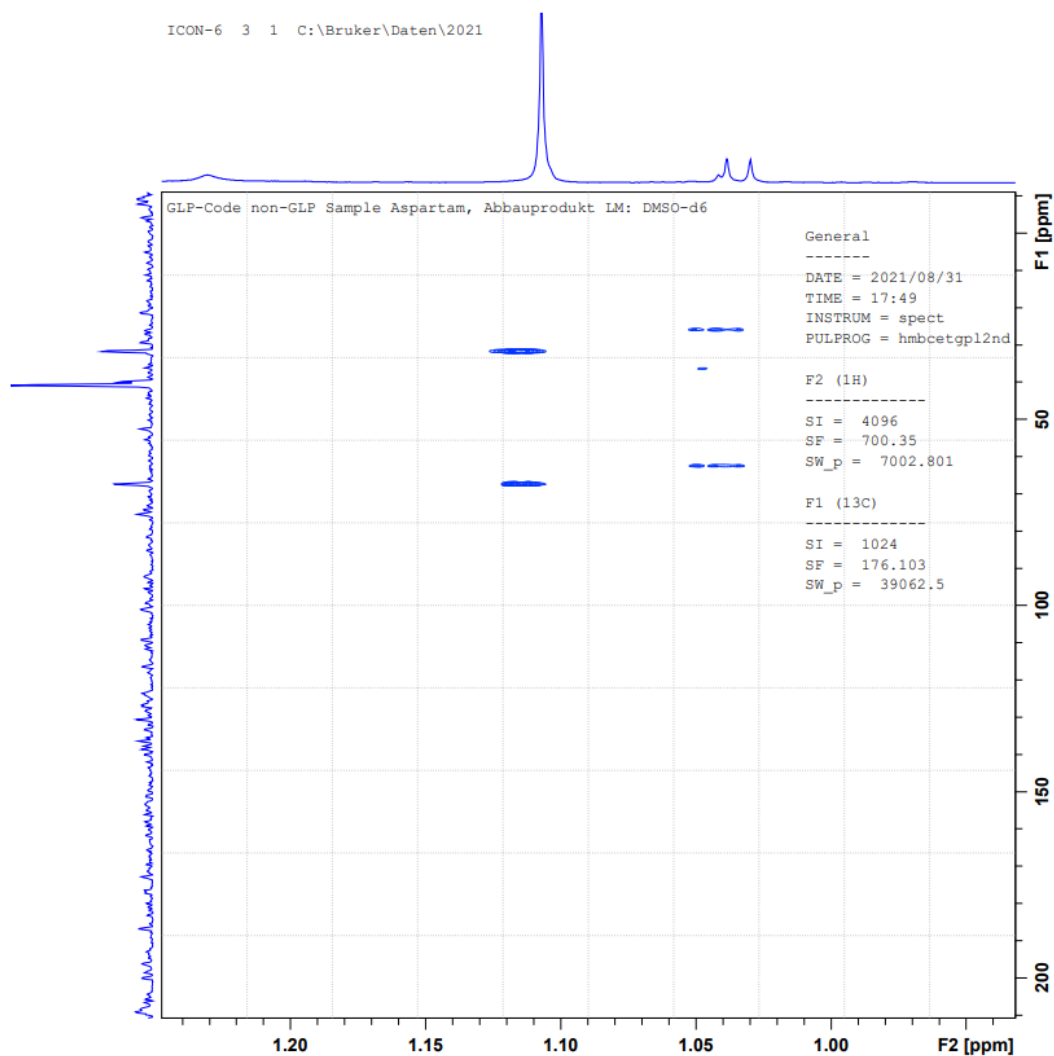


Abbildung 82: Zoom HMBC-Spektrum für die Zuordnung der lang Strecken Kopplung der CH₃ Gruppen des Isopropanols.

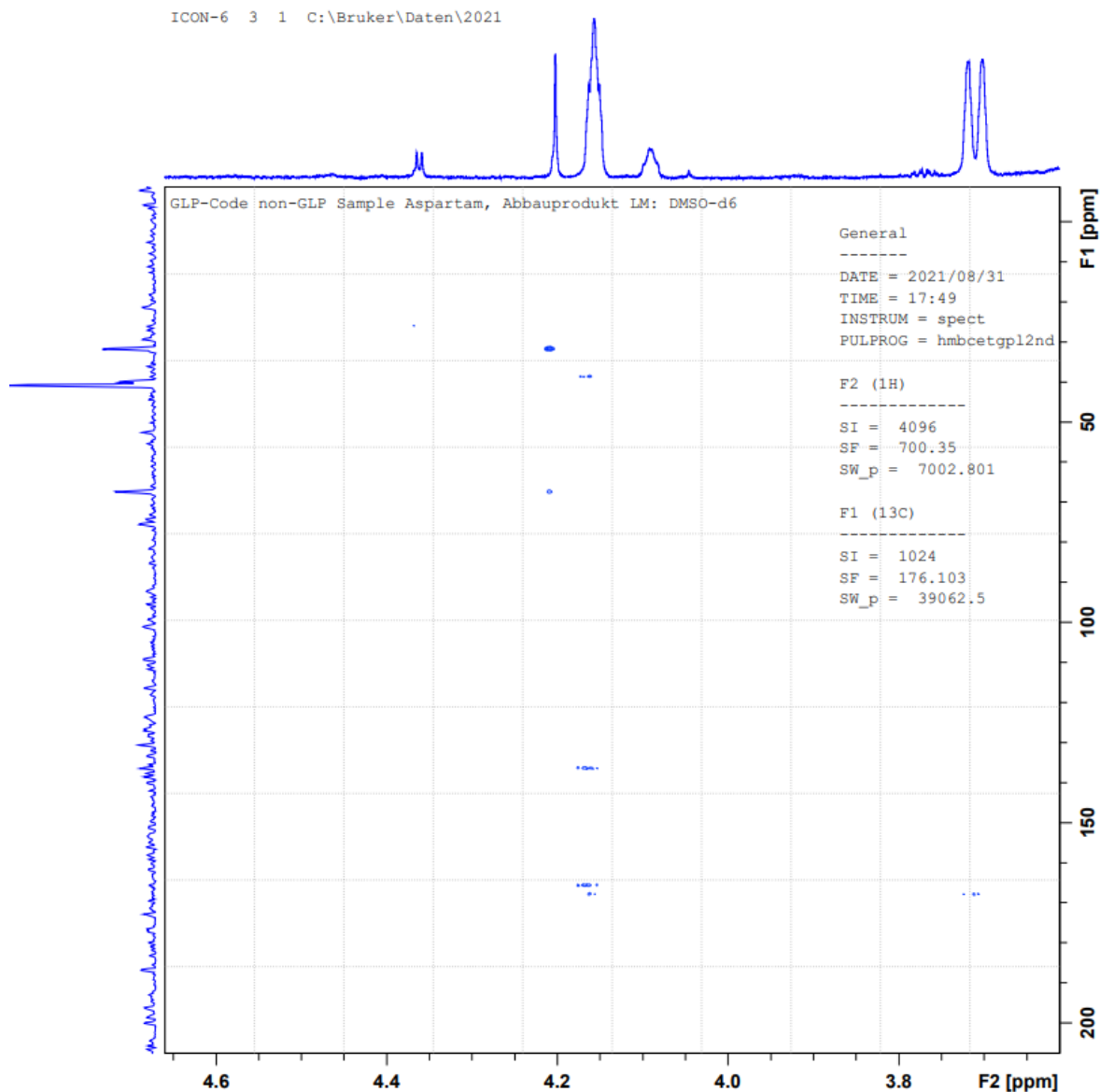


Abbildung 83: Zoom HMBC-Spektrum für die Zuordnung der lang Strecken Kopplung der OH Gruppen des Isopropanols und tert-Butanols.

8.2 Ergänzende Tabellen

Tabelle 43: Aktivität der ^{14}C -ALA und ^{14}C -Tyrosin Schweineproben (Angaben laut Monash University)

Organs/Tissues/Waste	^{14}C -ALA Pig kBq/g	^{14}C -Tyrosin Pig kBq/g
quadriceps	0,042	0,474
triceps	0,097	0,792
cerebellum	0,007	0,621
thalamus	0,003	0,374
frontal lobe	0,013	0,522
stomach digesta	0,000	0,100
small intestine digesta	0,099	0,638
stomach	0,082	0,468
small intestine	0,070	0,941
colon	0,080	0,670
liver	0,196	0,846
spleen	0,076	0,613
heart	0,079	0,369
CD waste	1,375	0,143
CD+1 waste	8,139	16,585
CD+2 waste	0,190	1,427
CD+3 waste	0,099	0,622

Tabelle 44: gefundene Massen und Peakflächen der ^{14}C -ALA-Exkrement-Proben

Masse (neutrale Masse des ^{12}C -Isotops)			Peakfläche		
Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 1	Probe 2	Probe 3
188,10405	188,10417	188,10423	2,16 E8	2,38 E8	2,81 E8
246,14570	246,14584	246,14586	6,27 E7	3,87 E7	4,75 E7
230,15082	230,15089	230,15090	5,10 E7	3,93 E7	4,84 E7

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel des L-Tyrosins.....	4
Abbildung 2: ketogener Abbau von L-Tyrosin [21].....	5
Abbildung 3: alternativer Abbauweg von L-Tyrosin [22]	6
Abbildung 4: bekannte Katecholamine [23]	7
Abbildung 5: Bildung der Katecholamine aus aromatischen Aminosäuren [23]	7
Abbildung 6: Strukturformel der ALA	8
Abbildung 7: metabolischer Verbleib der ALA [32]	9
Abbildung 8: Strukturformel Aspartam.....	13
Abbildung 9: chemische Synthese des Aspartams [50, 51].....	14
Abbildung 10: schematische Übersicht über den Szintillationsprozess [68]	18
Abbildung 11: Aufbau eines Oxidizers [71].....	19
Abbildung 12: Kopplung UHPLC, Radiodetektor und HRMS	20
Abbildung 13: Aufbau Q Exactive™ Plus (Thermo Fisher Scientific) [77].....	21
Abbildung 14: Übersicht einer Orbitrap und Umwandlung der erzeugten Frequenz in ein Massenspektrum mittels Fourier-Transformation [88]	23
Abbildung 15: Aufbau eines Vion-IMS-QToF [90].....	24
Abbildung 16: Design der Fütterungsstudie	27
Abbildung 17: Massenspur des ¹² C- und ¹⁴ C-Tyrosins sowie das Radio- Chromatogramm des ¹⁴ C-Tyrosins.....	75
Abbildung 18: Bilanzierung der Aktivität der untersuchten ¹⁴ C-Tyrosin Plasma Probe	77
Abbildung 19: Bilanzierung der untersuchten ¹⁴ C-Tyrosin Darm Proben.....	78
Abbildung 20: Radio-Chromatogramm der extrahierten Exkrement-Probe eines ¹⁴ C- Tyrosin Schweins	81
Abbildung 21: Radio-Chromatogramm der extrahierten Exkrement-Probe eines ¹⁴ C- Tyrosin Schweins nach saurer Hydrolyse	83
Abbildung 22: Vergleich der HLB-Prime-SPE Eluate der ¹⁴ C-Tyrosin Exkrement Proben nach der MeOH + 5 % FA Extraktion und MeOH + 5 % FA Extraktion nach sauren Hydrolyse.....	84
Abbildung 23: Massenspur des ¹² C- und ¹⁴ C-ALA sowie das Radio-Chromatogramm des ¹⁴ C-ALA-Standards.....	85

Abbildung 24: Radio-Chromatogramm der Ethylacetat-Extraktion der ¹⁴ C-ALA Exkrement Proben	88
Abbildung 25: Radio-Chromatogramm der sauren-wässrigen Extraktion der dotierten ¹⁴ C-Tyrosin-Öl-Probe, gemessen mit einer ZIC-HILIC-Säule	91
Abbildung 26: Radio-Chromatogramm der sauren-wässrigen Extraktion der dotierten ¹⁴ C-Tyrosin-Öl-Probe, gemessen mit einer C18-Säule	91
Abbildung 27: Zuordnung der Fragment m/z-Verhältnisse zu dem Abbauprodukt des Tyrosins, R stellt dabei die unbekannte Anlagerung dar	95
Abbildung 28: 3-Hydroxy-Benzoessäure (rechts), Salicylsäure (Mitte) und 3-Furyl- Acryl-Säure (links)	96
Abbildung 29: Strukturformeln der möglichen Abbauprodukte des Tyrosins nach einem Erhitzungsversuch in Rapsöl	96
Abbildung 30: Bilanzierung der ¹⁴ C-ALA-Rapsöl-Proben	98
Abbildung 31: Radio-Chromatogramme der ¹⁴ C-ALA-Rapsöl-Proben nach 30 Minuten und 60 Minuten Erhitzen	98
Abbildung 32: Massenspur des ¹² C- und ¹⁴ C-Aspartams sowie das Radio- Chromatogramm des ¹⁴ C-Aspartam-Standards	100
Abbildung 33: Bilanzierung der Aktivität von ¹⁴ C-Aspartam der extrahierten Kleingebäck-Proben in Prozent der Wiederfindungsrate (Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit zugehöriger Standardabweichung)	101
Abbildung 34: Bilanzierung der Aktivität von ¹⁴ C-Aspartam der extrahierten Öl-Proben bei 170 °C für 15, 30 und 60 Minuten in Prozent der Wiederfindungsrate (Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit zugehöriger Standardabweichung)	102
Abbildung 35: Bilanzierung der Aktivität von ¹⁴ C-Aspartam der extrahierten Öl-Proben bei 190 °C für 30 und 60 Minuten in Prozent der Wiederfindungsrate (Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit zugehöriger Standardabweichung).	103
Abbildung 36: Radio-Chromatogramme der Kleingebäck-Proben (links: H ₂ O:MeOH (50:50) Extraktion, rechts: QuEChERS-Extraktion)	104
Abbildung 37: Radio-Chromatogramme der Extraktion mit H ₂ O/MeOH (50:50, v/v) und QuEChERS-Öl-Extraktion bei unterschiedlichen Erhitzungsdauern der Proben von 15, 30 und 60 Minuten bei 170 °C.....	105
Abbildung 38: Bildungsweg des Abbauprodukts P2 bzw. DKP [105]	108

Abbildung 39: MS/MS-Fragment-Spektrum des m/z 250,1073 (ESI pos) von dem ^{12}C -Isotop ($^{12}\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N O}_4$) des Abbauproduktes P6, aufgenommen mittels Q Exactive TM Plus	110
Abbildung 40: mögliche Bildung des Fragments m/z 120,0804 ausgehend von Aspartam.....	110
Abbildung 41: mögliche Strukturen für das Fragment mit m/z von 180,1012	111
Abbildung 42: Strukturvorschläge für die Fragmente mit m/z 190,0856 und 162,0908	111
Abbildung 43: mögliche Strukturen für das Abbauprodukt P6 (Summenformel $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_4$).....	112
Abbildung 44: Radio-Chromatogramm des ^{14}C -Aspartams in heißem Kaffee.....	112
Abbildung 45: Radio-Chromatogramm des ^{14}C -Aspartams in Kaffee und der anschließenden Erwärmung in einer Mikrowelle	113
Abbildung 46: Radio-Chromatogramme des Stabilitätsversuches von ^{14}C -Aspartam in Wasser nach 10 Minuten und 180 Minuten bei 130 °C	114
Abbildung 47: Bildungsweg des L-Aspartyl-Phenylalanins aus Aspartam.....	115
Abbildung 48: Verlauf der Bildung der Abbauprodukte des Aspartams in H_2O bei 130 °C	115
Abbildung 49: Radio-Chromatogramme des Stabilitätsversuches von ^{14}C -Aspartam in Wasser + H_3PO_4 nach 10 Minuten und 180 Minuten bei 130 °C.....	116
Abbildung 50: Bildung der Abbauprodukte Asparaginsäure und Phenylalanin-Methylester aus Aspartam.....	117
Abbildung 51: Verlauf der Bildung der Abbauprodukte des Aspartams in H_2O + H_3PO_4 bei 130 °C	118
Abbildung 52: Radio-Chromatogramme des Stabilitäts-Versuch von ^{14}C -Aspartam in einer simulierten Cola Light Matrix bei 20 °C, 40 °C und 60 °C über 24 Stunden	119
Abbildung 53: Vergleich UHPLC-C18 Säule mit einer HPLC-C18 Säule von einer ^{14}C -Aspartam H_2O Lösung	120
Abbildung 54: postulierter Reaktionsweg des DKP [128]	137
Abbildung 55: identifizierte Abbauprodukte des Aspartams, abhängig vom pH-Wert	140
Abbildung 56: ermittelte Kalibriergerade der ^{14}C -Tyrosin-Standard Lösungen.....	153

Abbildung 57: Radio-UHPLC-Chromatogramm der QuEChERS-Extraktion einer dotierten ^{14}C -Tyrosin-Öl-Probe, gemessen mit einer C18-Säule.....	153
Abbildung 58: Fragmentspektrum einer ^{12}C -Tyrosin-Standardlösung (1mg/L) im ESI-negativen Modus, aufgenommen mittels Q Exactive™ Plus	154
Abbildung 59: Fragmentspektrum einer erhitzten ^{12}C -Tyrosin-Öl-Probe (1mg/L) im ESI-negativen Modus, aufgenommen mittels Q Exactive™ Plus	154
Abbildung 60: Fragmentspektrum einer erhitzten ^{14}C -Tyrosin-Öl-Probe (1000Bq/20 μL) im ESI-negativen Modus, aufgenommen mittels Q Exactive™ Plus	154
Abbildung 61: In-Source-Fragmentierung des m/z 300,08774, aufgenommen mittels Q Exactive™ Plus	155
Abbildung 62: Fragmentspektrum des m/z 137,02 einer ^{12}C -Tyrosin-dotierten und -erhitzten Öl-Probe, aufgenommen mittels Q Exactive™ Plus	155
Abbildung 63: Fragmentspektrum des m/z 137,02 einer nicht erhitzten Öl-Probe, aufgenommen mittels Q Exactive™ Plus	155
Abbildung 64: Radio-UHPLC-Chromatogramm der wässrigen-Öl-Extraktion nach 30 Minuten und 60 Minuten Erhitzungsdauer bei 190 °C	156
Abbildung 65: Radio-UHPLC-Chromatogramm der QuEChERS-Öl-Extraktion nach 30 Minuten und 60 Minuten Erhitzungsdauer bei 190 °C	156
Abbildung 66: Radio-UHPLC-Chromatogramme der Extraktionen der Kleingepäckproben gemessen an der Orbitrap Exactive™ Plus	157
Abbildung 67: Radio-UHPLC-Chromatogramme der Extraktionen der Öl-Proben bei 170°C, gemessen an der Orbitrap Exactive™ Plus	157
Abbildung 68: Radio-UHPLC-Chromatogramme der Extraktionen der Öl-Proben bei 170 und 190°C, gemessen an der Orbitrap Exactive™ Plus	158
Abbildung 69: Kalibriergerade von DKP (Doppelmessung)	158
Abbildung 70: MS/MS-Fragment-Spektrum des m/z 295,1289 (ESI pos) von dem ^{12}C -Aspartam Standard, aufgenommen mittels Q Exactive™ Plus	159
Abbildung 71: Erhitzungsversuch von ^{14}C -Aspartam in Kaffee, schematische Übersicht	159
Abbildung 72: HPLC-Radio-Chromatogramm der erhitzten ^{12}C - und ^{14}C -Aspartam-Probe in H_2O ohne AcNH_4 im Fließmittel, aufgenommen mittels UltiMate 3000 HPLC System	159

Abbildung 73: HPLC-Radio-Chromatogramm der erhitzten ^{12}C - und ^{14}C -Aspartam- Probe in H_2O ohne AcNH_4 im Fließmittel mit FA, aufgenommen mittels UltiMate 3000 HPLC System.....	160
Abbildung 74: HPLC-Radio-Chromatogramm der erhitzten ^{12}C - und ^{14}C -Aspartam- Probe in H_2O ohne AcNH_4 im Fließmittel mit Ammoniakwasser, aufgenommen mittels UltiMate 3000 HPLC System	160
Abbildung 75: ^1H -NMR-Spektrum des Gemisches von drei Abbauprodukten des ^{14}C - Aspartams inklusive der Aufnahmeparameter (aufgenommen mit einem Bruker Ascend TM 700 NMR).	161
Abbildung 76: COSY-Spektrum des Gemisches von drei Abbauprodukten des ^{14}C - Aspartams inklusive der Aufnahmeparameter (aufgenommen mit einem Bruker Ascend TM 700 NMR).	162
Abbildung 77: Zoom COSY-Spektrum für die Betätigung der benachbarten Kopplung der Protonen des Isopropanols.	163
Abbildung 78: HSQC-Spektrum des Gemisches von drei Abbauprodukten des ^{14}C - Aspartams inklusive der Aufnahmeparameter (aufgenommen mit einem Bruker Ascend TM 700 NMR).....	164
Abbildung 79: Zoom HSQC-Spektrum für die Zuordnung direkt gebundener H-Atome an C-Atomen (blau stellt eine ungerade Anzahl am H-Atomen dar und rot eine gerade).....	165
Abbildung 80: Zoom HSQC-Spektrum für die Überprüfung keiner Signale für die OH Gruppen von Isopropanol und tert-Butanol (blau stellt eine ungerade Anzahl am H-Atomen dar und rot eine gerade).....	166
Abbildung 81: HMBC-Spektrum des Gemisches von drei Abbauprodukten des ^{14}C - Aspartams inklusive der Aufnahmeparameter (aufgenommen mit einem Bruker Ascend TM 700 NMR).....	167
Abbildung 82: Zoom HMBC-Spektrum für die Zuordnung der lang Strecken Kopplung der CH_3 Gruppen des Isopropanols.	168
Abbildung 83: Zoom HMBC-Spektrum für die Zuordnung der lang Strecken Kopplung der OH Gruppen des Isopropanols und tert-Butanols.	169

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stoffgruppen nach Eicosanoid-Oxidation [33].....	10
Tabelle 2: pKs-Werte von L-Tyrosin [39].....	11
Tabelle 3: spezifische Daten des ¹⁴ C-Tyrosin-Standards	29
Tabelle 4: Kalibrierpunkte Tyrosin	29
Tabelle 5: Chromatographische Parameter für die entwickelte ¹⁴ C-Tyrosin-Methode mit einer ZIC-HILIC-Säule	30
Tabelle 6: Parametereinstellung des Radiodetektors Berthold LB 509	31
Tabelle 7: HRMS-Parameter für die entwickelte ¹⁴ C-Tyrosin-Methode der Q Exactive™ Plus (Orbitrap) im FullMS-AIF-Modus	32
Tabelle 8: spezifische Daten des ¹⁴ C-ALA-Standards	39
Tabelle 9: chromatographische Parameter für die entwickelte ¹⁴ C-ALA-Methode mit einer C18-Säule	40
Tabelle 10: Liste der verwendeten Chemikalien für die Untersuchungen von ¹⁴ C- Tyrosin und ¹⁴ C-ALA nach der Verdauung.....	43
Tabelle 11: Liste der verwendeten Geräte für die Untersuchungen von ¹⁴ C-Tyrosin und ¹⁴ C-ALA nach der Verdauung.....	44
Tabelle 12: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien von ¹⁴ C-Tyrosin und ¹⁴ C- ALA nach der Verdauung.....	45
Tabelle 13: Chromatographische Parameter für die Messung des ¹⁴ C-Tyrosin- dotierten Rapsöls für die Erfassung der Abbauprodukte mit einer C18-Säule ...	48
Tabelle 14: Isotopenmuster des ¹⁴ C-Tyrosin-Standards.....	49
Tabelle 15: Parametereinstellungen für die Software Compound Discoverer – Schnellsuche ¹⁴ C-Tyrosin-Proben	50
Tabelle 16: Spezifisches Isotopenmuster ¹⁴ C-Tyrosin-Abbauprodukte	51
Tabelle 17: Parametereinstellungen für die Software Compound Discoverer – erweiterte Suche ¹⁴ C-Tyrosin-Proben	52
Tabelle 18: Parametereinstellungen für die HRMS-Messung der t-SIM- und PRM- Fragment-Daten	53
Tabelle 19: spezifische Daten zu ¹⁴ C-Aspartam	56
Tabelle 20: Chromatographische Parameter für die entwickelte ¹⁴ C-Aspartam- Methode mit einer C18-Säule.....	57

Tabelle 21: HRMS-Parameter für die Untersuchung der potenziellen Abbauprodukte des Aspartams an der Vion IMS QTOF.....	58
Tabelle 22: HRMS-Parameter für die Untersuchung der potenziellen Abbauprodukte des Aspartams an der Orbitrap Q Exactive™ Plus.....	59
Tabelle 23: spezifisches Isotopenmuster Aspartam	63
Tabelle 24: Parametereinstellungen Compound Discoverer – erweiterte Suche ¹⁴ C-Aspartam.....	64
Tabelle 25: Herstellung der Matrix-matched-Kalibrierung für das Abbauprodukt DKP	65
Tabelle 26: Parameter für die Fragmentierungsexperimente im PRM, t-SIM-Modus der ¹⁴ C-Aspartam-extrahierten Öl-Proben.....	67
Tabelle 27: Liste der verwendeten Chemikalien für die Untersuchungen von ¹⁴ C-Substanzen in Lebensmittelverarbeitungsprozessen	71
Tabelle 28: Liste der verwendeten Geräte für die Untersuchungen von ¹⁴ C-Substanzen in Lebensmittelverarbeitungsprozessen	72
Tabelle 29: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien für die Untersuchungen von ¹⁴ C-Substanzen in Lebensmittelverarbeitungsprozessen.....	73
Tabelle 30: Wiederfindungsraten der HLB-Eluate von den ¹⁴ C-Tyrosin	81
Tabelle 31: Wiederfindungsraten der HLB-Eluate von den ¹⁴ C-Tyrosin	82
Tabelle 32: Überprüfung der ¹² C und ¹⁴ C m/z Verhältnisse der ¹⁴ C-ALA-Exkrementen mittels der Software Xcalibur.....	88
Tabelle 33: Summenformelvorschläge der ¹⁴ C-ALA-Metabolite	89
Tabelle 34: Summenformel-Vorschläge und zugehörige m/z-Verhältnisse der gefundenen ¹⁴ C-markierten Abbauprodukte, ermittelt mit dem Programm Compound Discoverer.....	92
Tabelle 35: Isotope des m/z 196,10347 und das zugehörige Isotopenverhältnis	92
Tabelle 36: Isotope des m/z 316,12436 und das zugehörige Isotopenverhältnis	93
Tabelle 37: MS/MS-Fragment m/z-Verhältnisse (ESI neg.) der Extrakte der ¹² C- und ¹⁴ C-Tyrosin-Rapsöl-Proben.....	94
Tabelle 38: In-Source-Fragmente des m/z 151,0512	96
Tabelle 39: Verhältnis des Isotopenmusters des ¹⁴ C-Aspartam-Standards.....	104
Tabelle 40: Summenformel-Vorschläge und zugehörige m/z Verhältnisse der gefundenen ¹⁴ C-markierten Abbauprodukte, ermittelt mit dem Programm Compound Discoverer.....	107

Tabelle 41: berechnete Konzentration und Gehalt an DKP aus der Geradengleichung	108
Tabelle 42: Summenformelvorschläge und m/z für das Abbauprodukt P6 mit dem entsprechenden Isotopenverhältnis	109
Tabelle 43: Aktivität der ^{14}C -ALA und ^{14}C -Tyrosin Schweineproben (Angaben laut Monash University)	170
Tabelle 44: gefundene Massen und Peakflächen der ^{14}C -ALA-Exkrement-Proben	170