

Entwicklung einer einfachen und schnellen Analysenmethode für Kohlenmonoxid in Fisch – Teil 2: Methodenoptimierung

Development of an easy and fast method for carbon monoxide detection in fish – Part 2: Improvement of the method

Harald Heyer¹; Reinhard Schubring²

¹ Dräger Safety AG & Co. KGaA, Revalstr. 1, 23560 Lübeck, Germany;

² Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Forschungsbereich Fischqualität, Palmaille 9, 22767 Hamburg, Germany

reinhard.schubring@ibt.bfa-fisch.de

Nachdem im 1. Teil (Haase et al. 2005) die Grundzüge der einfachen und schnellen Analysenmethode zur Bestimmung von Kohlenmonoxid in Fisch, die dazu benötigten Geräte und Chemikalien und erste Messungen an Fisch dargestellt wurden, beschreibt dieser Teil den Einfluss der Probenvorbereitung, der Variation der Probenmengen, des Extraktionsmittels, der Dauer der Extraktion und weiterer Randbedingungen auf die Analysenergebnisse. Die beiden Durchführungsarten der Methode werden hinsichtlich der zu erwartenden Messfehler bewertet und die erforderlichen Einzelkomponenten aufgelistet, wodurch eine sichere Kostenabschätzung der Methode möglich ist. Zusätzliche instrumentelle Farbmessungen und DSC-Untersuchungen an unbehandeltem und CO-behandeltem Tunmuskel verdeutlichen die Effekte.

Einleitung

Kohlenmonoxid oder Kohlenmonoxid enthaltende Gasmischungen (gefilterter Rauch, Clearsmoke[®] oder Tasteless smoke) werden angewendet, um damit das Fleisch von Tunen oder ähnlichen Fischen mit ausgeprägter Eigenfärbung vor unerwünschten Farbveränderungen von rot (Oxyhämoglobin oder Oxymyoglobin) nach braun (Methämoglobin oder Metmyoglobin), die sich bei längerer Gefrierlagerung und insbesondere nach dem Auftauen ergeben, durch die Bildung von Carboxyhämoglobin oder Carboxymyoglobin zu schützen. In der Europäischen Union und in vielen anderen Staaten der Welt sind derartige Praktiken, die dazu dienen können, minderwertige Qualität zu schönen und die Verbraucher in die Irre zu führen, aufgrund geltenden Lebensmittelrechts nicht erlaubt.

Gegenteilige Entscheidungen niederländischer Gerichte haben jedoch dazu geführt, dass auf den Märkten der Europäischen Mitgliedsstaaten mit Kohlenmonoxid behandelte Produkte – egal in welcher Form angewendet – häufig gehandelt werden, so dass die Untersuchungsbehörden gezwungen sind einzuschreiten. Regelmäßige Schnellwarnungen, die durch die Mitgliedsstaaten an die Kommission übermittelt werden, sind dafür ein eindeutiger Hinweis. Dabei bleibt die Europäische

Kommission selbst in eindeutigen lebensmittelrechtlichen Regelungen reserviert (Schubring 2004) und stellt keine echte Hilfe für die betroffenen Mitgliedsländer dar, sondern zieht sich auf den Standpunkt zurück, dass das Generaldirektorat für Gesundheit und Verbrauchangelegenheiten der EU-Kommission (DG Sanco) bereits am 8. 10. 2004 der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (ESFA) eine Anfrage hinsichtlich „Fishery products treated with the clearsmoke process“ (ESFA-Q-2004-143) übermittelt hat (www.efsa.eu.int/)

Abstract

Development of an easy and fast method for carbon monoxide detection in fish – Part 2: Improvement of the method

After having described in our first paper (Haase et al. 2005) the main features of an easy and fast method for determination of carbon monoxide in fish and the equipment and chemicals necessary as well as first results measured on fish samples, this part deals with the influence of sample preparation, variation of the size of samples, type of solvent, duration of extraction and further conditions on the result of analyses. Both variants of the method are evaluated with regard to measuring expected errors. The single components of the equipment, including prices, are listed to allow a reliable assessment of costs. Additional instrumental colour and DSC measurements on both untreated and CO-treated tuna illustrate the effects.

register, 15. 9. 2005). Das zuständige Gremium AFC (Lebensmittelzusatzstoffe, Aromastoffe, Verarbeitungshilfsstoffe und Materialien, die mit Lebensmitteln in Berührung kommen) hat dieses Problem jedoch noch nicht behandelt, sondern „zusätzliche Angaben erbeten“. Inzwischen wird versucht, geeignete Methoden zu entwickeln, um den eindeutigen Nachweis erbringen zu können, dass eine CO-Behandlung des Fischfleisches erfolgte.

Kürzlich wurden in den USA, wo die CO-Behandlung von Tun und vergleichbaren Fischarten von den Überwachungsbehörden erlaubt ist (Schubring 2004), zwei Methoden beschrieben, die den Nachweis einer derartigen Behandlung durch „machine vision“ (Bildverarbeitungs- und Analysegerät) (Balaban et al. 2005) bzw. durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) (Anderson and Wu 2005) beinhalten. Im Vergleich zu der von Ishiwata et al. (1996) beschriebenen CO-Bestimmungsmethode im Fischfleisch, die auch in Deutschland (Feldhusen et al. 2004) und anderen Ländern (Jonker et al. 2001) am häufigsten angewendet wird, erscheint das bei der GC-MS-Methode erforderliche Instrumentarium aufwändiger und teurer. Ein Nachteil der gegenwärtig in Japan praktizierten Methode nach Ishiwata et al. ist der beträchtliche Zeitaufwand für diese Methode. Entsprechend der Festlegungen des japanischen Gesundheitsministeriums weisen CO-Gehalte unter 200 µg/kg darauf hin, dass der Fischmuskel keiner CO-Behandlung unterworfen wurde. Liegen die Gehalte jedoch über 200 µg/kg, müssen die aus der Tunmuskulatur hergestellten Extrakte bei 5 °C 2 Tage lang aufbewahrt und dann erneut analysiert werden. Verringert sich der CO-Gehalt nach 2-tägiger Lagerung, ist eine Behandlung mit CO bestätigt (Chow et al. 2004).

Im ersten Teil dieser Veröffentlichung (Haase et al. 2005) haben wir eine einfache Methode der CO-Bestimmung im Fischfleisch mittels Sensortechnik vorgestellt. Im diesem Teil möchten wir auf weitere Aspekte dieser Methode und einfachere Möglichkeiten der CO-Freisetzung eingehen. In den bisherigen Untersuchungen (Haase et al. 2005) und den in der Literatur beschriebenen Methoden (Ishiwata et al. 1996; Anderson et al. 2005) wird das CO durch die Zugabe von Schwefelsäure freigesetzt. Theoretisch sollte sich das an Hämoglobin und Myoglobin gebundene CO auch durch mechanische und/oder thermische Energie freisetzen lassen, so dass man auf die Verwendung ätzender und giftiger Chemikalien ganz verzichten könnte. Ein wichtiger Aspekt ist auch der Einfluss der Probenvorbereitung des Fischfleisches auf das Analysenergebnis.

Material und Methoden

Der Fisch

Unbehandeltes Gelbflossen-Tunfischfilet (*Thunnus albacares*) aus Sri Lanka – im westlichen Teil des Indischen Ozeans mit Langleinen gefangen, am 21. 1. 2005 verpackt und bei 0 bis 5 °C gelagert – wurde am 27. 1. 2005 auf dem Hamburger Fischmarkt gekauft und am

gleichen Tag, wie bei Haase et al. (2005) beschrieben, zur Hälfte mit Kohlenmonoxid behandelt und eingefroren. Die andere Hälfte wurde unbehandelt eingefroren. Vor dem Tiefgefrieren wurden die behandelten und unbehandelten Fischteile unter Verwendung von PE-Folie vakuumverpackt. Teile des so vorbehandelten Fisches wurden für die Optimierung der Methode verwendet, während der Rest nach wiederholten Gefrier-Tau-Zyklen (insgesamt acht Mal) jeweils zur instrumentellen Farbbestimmung verwendet wurde, um die Farbstabilität des Carboxymyoglobins bzw. -hämoglobins unter solchen extremen Bedingungen zu erfassen. Zusätzlich wurde an frischem, behandeltem und gefrorenem Muskel die thermische Stabilität mittels Differential Scanning Calorimetrie (DSC) untersucht.

Methoden

Farbbestimmung: Instrumentelle Farbmessungen erfolgten mit einem Dreibereichs-Farbmessgerät CR 300 der Firma Minolta (Schubring 2004) sowie einem Spektral-Farbmessgerät spectro pen® der Fa. Dr. Lange (Schubring 2005).

Thermische Analyse: Die DSC-Untersuchungen erfolgten mit einem MicroDSC VII der Fa. SETARAM (Schubring 2005).

Messung des Kohlenmonoxid-Gehalts im Fisch: Die Messung erfolgte mit einem elektrochemischen Sensor wie von Haase et al. (2005) beschrieben.

Ergebnisse

Bewertung von Randbedingungen zur Optimierung der Methode

Experimentelles

Der Versuchsaufbau 1 (Abb. 1) besteht aus einem 250 ml 3-Halskolben, einer Gaspumpe, dem Gasmessgerät MiniWarn, einem Magnetrührer und einer Heizung mit Thermoregulator für den 3-Halskolben.

Zur Bestimmung des CO-Gehaltes in Fischfleisch mit-

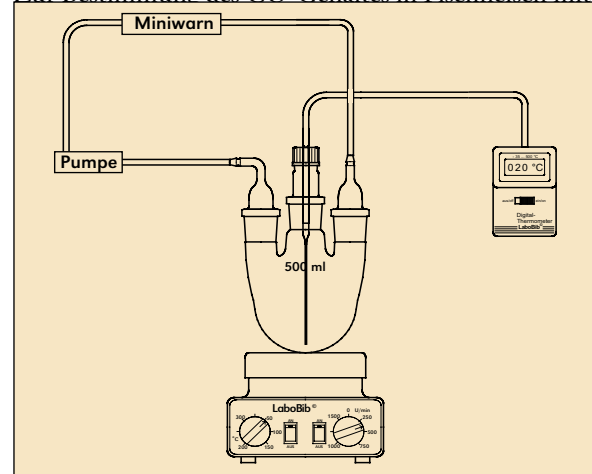


Abbildung 1: Skizze des Versuchsaufbaues 1 (Kreislaufschaltung) zur Bestimmung von CO in Fischfleisch.

Schematic diagram of the equipment 1 (closed loop) for detection of CO in fish.

tels Versuchsaufbau 1 müssen u.a. folgende Parameter bekannt sein:

- Einwaage an Fisch
- Volumen von Fisch und zugesetztem Wasser
- Volumen der Messapparatur

Zusätzlich muss das temperatur- und druckabhängige Molvolumen von CO berücksichtigt werden. Aus diesen Daten lässt sich dann die Menge CO in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Fisch berechnen. Zur Volumenbestimmung der Messapparatur werden in diese bekannte unterschiedliche Volumina an CO-Gas gegeben und die sich ergebende CO-Konzentration gemessen. Abb. 2 zeigt die Ergebnisse von Messungen, bei denen CO durch ein Septum in die Apparatur injiziert wurde.

Bei hohen CO-Konzentrationen nehmen diese über die

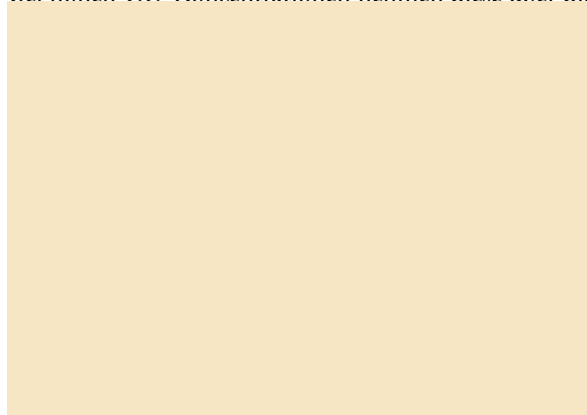


Abbildung 2: Gasvolumenbestimmung mittels CO – *Determination of the gas volume using CO.*

Zeit schneller ab als bei kleineren, was auf eine leichte Undichtigkeit der Apparatur bzw. des Sensors hindeutet. Da bei allen bisher durchgeführten Messungen die CO-Konzentrationen unter 200 ppm lagen, können die beobachteten Undichtigkeiten vernachlässigt werden. (s. Abb. 2). Das Volumen der Apparatur wird mit Zugabe größerer CO-Volumina von 0,5 bis 1,0 ml bestimmt, um den Fehler, der zum Beispiel durch die Spritze entstehen kann, so klein wie möglich zu halten. Dabei wird die maximale Konzentration bestimmt, mit Hilfe des bekannten zugegebenen CO-Volumens das Gesamtvolumen errechnet und der Mittelwert der Einzelmessungen als Volumen der Versuchsapparatur angenommen. Bei der Volumenbestimmung ergab sich ein Wert von 451.9 ml mit einem mittleren Fehler von 0,42 %.

Für die Messungen mit Fisch gibt es verschiedene Parameter, die zu variieren sind: der Zeitpunkt des Zerkleinerns (gefroren oder aufgetaut), der Ort des Zerkleinerns (im Kolben mit dem Rührfisch oder an der Luft mit einem Messer), die Rührdauer und der Grad der Erwärmung. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bei den Messungen angewandten Probenvorbereitungen. Der Vergleich der Proben B1 und B2 zeigt, dass es effektiver ist, das Stück Fisch erst komplett aufzutauen, da somit die höhere CO-Konzentration in Fisch erhalten wird. Aus dem Vergleich der Proben B4 und B5 ist ersichtlich, dass eine reduzierte Fischeinwaage die Versuchsdauer verkürzt und die höchste CO-Konzentration im Fischfleisch liefert. Zur Kontrolle wurde der Versuch nochmals nach der herkömmlichen Methode mit Schwefelsäure durchgeführt und ein ähnlich hoher

Tabelle 1: Verwendete Parameter bei den CO-Messungen in Kreislaufschaltung – *Conditions used during CO measurements in closed loop.*

| Probe | Fisch-einwaage [g] | Wasser-volumen [ml] | Auftauort Auftauzeit [min] | Zerkleinerungs-zustand | Rührzeit [min] | Probe erwärmt | H ₂ SO ₄ | CO-Konz. [mg/kg] | Bemerkung |
|-------|--------------------|---------------------|-------------------------------|------------------------|----------------|---------------|--------------------------------|------------------|------------------------|
| B* 1 | 60,2 | 100 | (a) | gefroren | 90 | ja | nein | 1,224 | |
| B 2 | 60,2 | 100 | Luft, 180 | aufgetaut | 90 | ja | nein | 1,701 | |
| B 3 | 65,6 | 100 | Luft, 135 | beim Auftauen | 90 | ja | nein | 1,223 | Signalabfall bei 40 °C |
| B 4 | 50,5 | 100 | Luft, 80 | beim Auftauen | 90 | ja | nein | 0,848 | |
| B 5 | 31,5 | 56,5 | Luft, 105 | aufgetaut | 120 | ja | nein | 1,737 | Signalabfall bei 40 °C |
| B 6 | 33,8 | 55 | Luft, 105 | aufgetaut | 120 | nein | ja | 1,823 | |
| B 7 | 27,95 | 50,37 | Luft, 80 | aufgetaut | 120 | nein | nein | 1,833 | |
| B 8 | 30,74 | 50 | Luft, 90 | aufgetaut | 120 | nein | ja | 1,581 | |
| B 9 | 30,7 | 50,3 | Luft, 90 | aufgetaut | 100 | (b) | nein | 2,522 | |
| B 10 | 23 | 61,2 | Kolben, 90 | aufgetaut in App. | 60 | (b) | nein | 3,455 | Höchster CO-Gehalt |
| B 11 | 20,5 | 56 | Kolben, 90 | aufget. in App. | 60 | nein | nein | 2,889 | |
| B 12 | 22,6 | 57,4 | Kühlschr., > 800 | aufget. in App. | 30 | nein | nein | 1,065 | |
| B 13 | 15,87 | 53,3 | Kühlschr., > 800 | aufget. in App. | 60 | nein | nein | 1,177 | |
| B 14 | 15,74 | 53 | Kühlschr., > 800 | aufget. in App. | 60 | nein | nein | 0,962 | |
| B 15 | 25 | 53,13 | Kühlschr., > 800 | aufget. in App. | 60 | nein | nein | 0,0132 | |
| U**1 | 14,12 | 54,5 | Kühlschr., > 800 | aufget. in App. | 60 | nein | nein | 0,0157 | |
| U 2 | 23,3 | 52 | Kühlschr., > 800 | aufget. in App. | 60 | nein | nein | 0,937 | |
| U 3 | 31,6 | 52,1 | Kühlschr., > 800 | aufget. in App. | 60 | nein | nein | 0,00565 | |
| U 4 | 24,1 | 64 | Kühlschr., > 800 | aufget. in App. | 60 | nein | nein | 0,00729 | |
| U 5 | 28,11 | 57,9 | Kolben, 90 | aufgetaut | 60 | nein | nein | 0,0252 | |
| U 6 | 32,9 | 58,35 | Luft, 90 | aufgetaut | 60 | nein | nein | 0,0157 | |

(a) = Fisch wurde gefroren zerkleinert und sofort in Kolben gegeben,

(b) = nachdem max. CO-Konzentration erreicht war,

B* = CO behandelte Probe,

U** = unbehandelte Probe.

CO-Gehalt im Fisch festgestellt (B6). Abbildung 3 zeigt die CO-Messung der Probe B5, die zusätzlich noch erwärmt wurde.

Auf der zweiten y-Achse ist zusätzlich die Temperatur

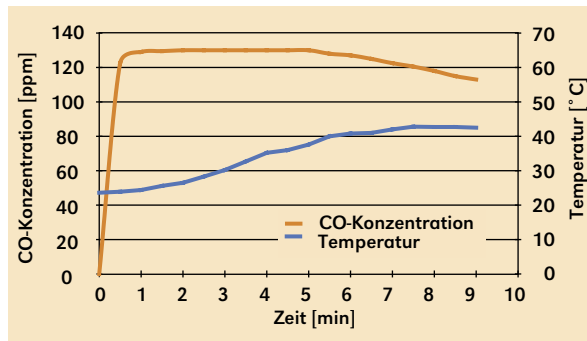


Abbildung 3: Bestimmung des CO-Gehaltes von Probe B5 – *Determination of CO content of sample B5.*

mit aufgezeichnet. Man erkennt, dass die maximale CO-Konzentration schon erreicht wird, bevor der Temperaturanstieg beginnt. Das deutet daraufhin, dass es sogar möglich ist, bei den Versuchen ohne Erwärmung der Proben auszukommen. Der Abfall des CO-Signals bei 40 °C ist auf eine Leckage infolge der Temperaturerhöhung zurückzuführen. Die folgende Abbildung 4 zeigt die CO-Freisetzung der Probe B7, die nur durch Zufuhr mechanischer Energie (Rühren) erreicht wurde.

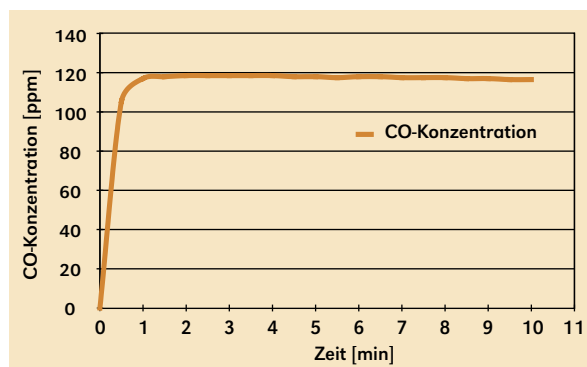


Abbildung 4: CO-Freisetzung aus Probe B7 mittels kinetischer Energie (Rühren) – *Release of CO from sample B7 by kinetic energy (stirring).*

Der gemessene CO-Gehalt im Fisch ist von der gleichen Größenordnung wie bei vorherigen Versuchen mit Erwärmung der Probe. Dies lässt den Schluss zu, dass eine weitere Vereinfachung der Messmethode möglich ist – die CO-Freisetzung nur aufgrund der eingebrachten kinetischen Energie zu erzwingen.

Probenvorbereitung

Da die Ergebnisse der durchgeführten Messungen sehr unterschiedlich sind (Tabelle 1), liegt es nahe, dass die Probenvorbereitung einen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse hat. Deshalb wurden Untersuchungen mit gefrorenem Fisch durchgeführt, welche gezeigt haben,

dass schon während des Auftauvorgangs CO aus dem Fisch freigesetzt wird. Auch wenn der Fisch nur im mit Wasser gefüllten 3-Halskolben liegt, wird CO frei und die größten Verluste wurden nachgewiesen, wenn der Fisch an Luft auftaut.

Deshalb wurde eine Menge von 20 g Fisch im Stück im gefrorenem Zustand mit 60 ml Wasser und dem Rührfisch in den Kolben gegeben und der Kreislauf geschlossen. Der Fisch taute so im Wasser auf und es kam zu keinem Verlust an CO. Nach 90 min Auftauen wurde der Fisch mit dem Rührfisch zerkleinert und das Gemisch 60 min lang homogenisiert. Die gemessene Konzentration lag bei 3,455 mg/kg (B 10), was ungefähr doppelt so viel ist, wie bei den vorherigen Messungen, bei denen die Probe an der Luft aufgetaut wurde. Dieser Wert kann somit als maximale CO-Konzentration im Fischfleisch angenommen werden. Für den unbehandelten Fisch ergab sich bei der gleichen Probenvorbereitung eine Konzentration von 0,0252 mg/kg (U 5). Um die CO-Gehalte im Fisch vergleichen zu können, wurde die Probenvorbereitung nun standardisiert. Die einzelnen Proben wurden in Plastikbeuteln eingeschweißt, über Nacht im Kühlschrank aufgetaut und am nächsten Tag zur Konzentrationsbestimmung verwendet. Dieses Auftauverfahren wird auch häufig vor der Zubereitung von Fisch verwendet und ist somit entscheidend für den Verbraucher. Chow et al. (2004) zeigten, dass weder erhitzter Tunmuskel noch hitzedenaturierte Myoglobinslösung erhebliche Mengen an CO zurückhalten können. Wenn Tunmuskel 30 Min. auf 80 °C erhitzt wurde, ergaben CO-Gehalte über 100 µg/kg einen eindeutigen Hinweis darauf, dass dieser Muskel mit CO behandelt worden war.

CO-Bestimmung mit Reihenschaltung

Eine weitere Möglichkeit, die Menge CO in Fischfleisch zu bestimmen, ist die Messung der CO-Konzentration in Reihenschaltung. Hierzu wird der Kreislauf (Abb. 1) aufgelöst und zusätzlich hinter das Messgerät MiniWarn ein Volumenstrommessgerät geschaltet (Abb. 5a, b).

Der 3-Halskolben mit der Probe (1) wird mit einem

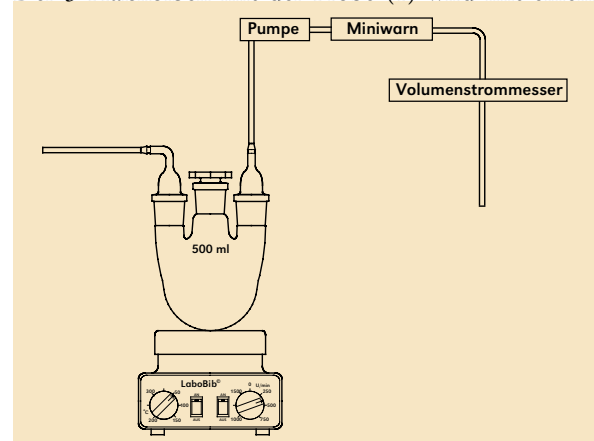


Abbildung 5a: Skizze des Versuchsaufbaus 2 (Reihenschaltung) zur Bestimmung von CO in Fischfleisch – *Schematic diagram of the equipment 2 (series connexion) for detection of CO in fish.*

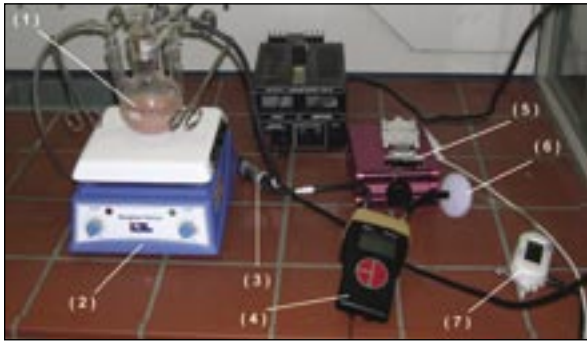


Abbildung 5b: Bild des Versuchsaufbaus 2 (Reihenschaltung) zur Bestimmung von CO in Fischfleisch – *Picture of the equipment 2 (series connexion) for detection of CO in fish.*

Stativ über dem Magnetrührer (2) fixiert. Über eine Gaspumpe (3) wird Luft von außen über die Probe gesaugt und zum Gasmessgerät Miniwarn (4) transportiert, das seine Daten über eine Infrarotschnittstelle (5) zum Messrechner sendet. Danach passiert der Gasstrom einen Partikelfilter (6), der dem Volumenstrommessgerät (7) vorgeschaltet ist.

Zur Bestimmung des CO-Gehaltes in Fischfleisch mittels Versuchsaufbau 2 müssen folgende Parameter bekannt sein:

- Einwaage an Fisch
- Volumen, das durch die Apparatur geströmt ist

Zusätzlich sollte das temperatur- und druckabhängige Molvolumen von CO berücksichtigt werden. Die freigesetzte CO-Menge erhält man durch Integration der Konzentrations-Zeitkurve. Tabelle 2 zeigt die bei den Messungen in Reihenschaltung verwendeten Parameter.

Für alle Bestimmungen des CO-Gehaltes in Fischfleisch wurden Messwerte zwischen 0,74 und 1,06 mg/kg Fisch erhalten. Durch die Standardisierung der Probenvorbereitung konnte die vorher beobachtete Variation im

Tabelle 2: Verwendete Parameter bei den CO-Messungen in Reihenschaltung – *Conditions used during CO measurements in series connexion.*

| Probe | Fischeinwaage [g] | Wasservolumen [ml] | Rühdauer [min] | Flow [l/min] | CO-Konzentration [mg/kg] |
|-------|-------------------|--------------------|----------------|--------------|--------------------------|
| B 16 | 31,85 | 60,55 | 60 | 0,33 | 0,985 |
| B 17 | 31,87 | 59,5 | 60 | 0,4 | 0,862 |
| B 18 | 31,9 | 61,46 | 60 | 0,313 | 0,994 |
| B 19 | 30,6 | 60,9 | 120 | 0,22 | 1,06 |
| B 20 | 33,5 | 60 | 60 | 0,23 | 0,774 |
| U 7 | 32,35 | 58,86 | 60 | 0,34 | < 0,016 |
| U 8 | 47 | 71 | 60 | 0,235 | < 0,016 |
| U 9 | 31,8 | 64 | 60 | 0,245 | < 0,016 |
| U 10 | 30,4 | 61 | 60 | 0,245 | < 0,016 |
| U 11 | 29,7 | 55,9 | 60 | 0,223 | < 0,016 |
| U 12 | 32,8 | 57,5 | 60 | 0,223 | < 0,016 |

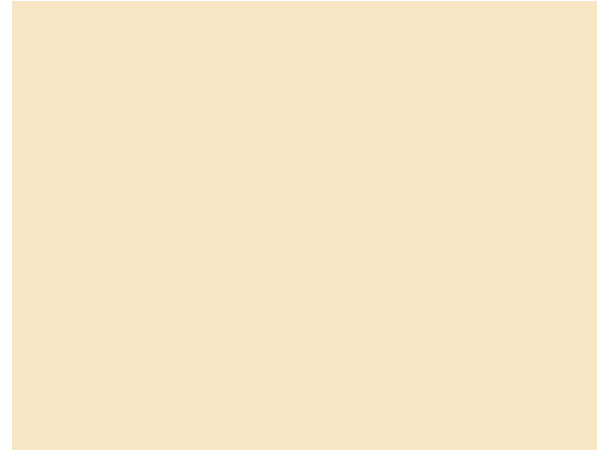


Abbildung 6: CO-Freisetzung aus Probe B16 – *Release of CO from sample B16.*

CO-Gehalt des Fischfleisches stark minimiert werden. Abbildung 6 zeigt eine typische Messkurve, die mit dem Versuchsaufbau 2 erhalten wurde.

Die freigesetzte CO-Menge steigt zunächst steil an, um danach exponentiell abzufallen. Die zweite Kurve zeigt die dazugehörige Summation der CO-Menge an. Messungen mit unbehandeltem Fisch zeigten CO-Konzentrationen unter 2 ppm an (untere Messgrenze des hier verwendeten Sensors), womit sich eine untere Nachweisgrenze von 0,016 mg CO pro kg Fisch ergibt.

Fehlerbetrachtung

In Tabelle 3 sind die bei den verschiedenen Versuchsaufbauten auftretenden maximalen Fehler dargestellt. Bei der Messung in Reihenschaltung ist von Vorteil, dass das Volumen der Apparatur und des Fisches nicht bestimmt werden muss. Zudem haben eventuell auftretende Leckagen in der Apparatur bei der Reihenschaltung kaum Einfluss auf die CO-Bestimmung.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass sich der CO-Gehalt im Speisefisch (Tun) einfacher als bisher nachweisen lässt. Schwefelsäure muss nicht mehr verwendet werden, und das CO kann nur durch Rühren

Tabelle 3: Fehler bei verschiedenen Versuchsaufbauten – *Possible errors by using the different types of measurement.*

| Fehlerquelle | Kreislauf-führung max. Fehler [%] | Reihenschaltung max. [%] |
|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Sensor | 3,3 | 3,3 |
| Volumenbestimmung Apparatur | 0,7 | - |
| Volumenbestimmung Fisch, abgeschätzt | 10 | - |
| Volumenstromänderung | - | 2,1 |
| max. Gesamtfehler | 14,0 | 5,4 |

Tabelle 4: Komponenten für Kreislauf- und Reihenschaltung – *Items necessary for both closed loop and series connexion.*

| Kreislaufschaltung | Preis [€] | Reihenschaltung | Preis [€] |
|--|-------------|---|-------------|
| 250 ml 3-Halskolben | 42 | 250 ml 3-Halskolben | 42 |
| MiniWarn ¹⁾ | 746 | MiniWarn ¹⁾ | 746 |
| DrägerSensor XS R CO – 68 10 258 ¹⁾ | 303 | DrägerSensor XS R CO –68 10 258 ¹⁾ | 303 |
| Kalibrieradapter ¹⁾ | 31 | Kalibrieradapter ¹⁾ | 31 |
| Software GasVision 5.6.4 ¹⁾ | 173 | Software GasVision 5.6.4 ¹⁾ | 173 |
| Gaspumpe (Smartpump) ¹⁾ | 408 | Gaspumpe (Smartpump) ¹⁾ | 408 |
| Schläuche (Viton) | 40 | Schläuche (Viton) | 40 |
| Magnetrührer | 80 | Magnetrührer | 80 |
| Rührfisch | 1 | Rührfisch | 1 |
| | | Volumenstrommessgerät (500 ml Schwabekörperdurchflussmesser) | 80 |
| Summe | 1824 | | 1904 |

¹⁾ Dräger-Safety, Lübeck

aus dem Gemisch ausgetrieben werden. Eine definierte Probenvorbereitung ist essentiell für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Der Nachweis des CO in Reihenschaltung ist die einfachere und weniger fehleranfällige Methode. Möglicherweise sind jedoch die mit dieser Methode ermittelbaren CO-Gehalte etwas geringer als bei der Kreislaufschaltung, wenn man die in Tabelle 2 dargestellten Untersuchungsergebnisse mit denen der Tabelle 1 vergleicht. Tabelle 4 listet die benötigten Komponenten für die verschiedenen Versuchsaufbauten auf. Stellt man diese Kosten denen für die Anschaffung eines Gaschromatographen mit „head space“ Probenwechsler und Nickelkatalysator zur Umformung von CO in Methan gegenüber, für die ca. 40 000 € aufzuwenden sind, wird deutlich, dass die Zielstellung eine billige Methode zu entwickeln, erreicht wurde. Selbst wenn man davon ausgeht, dass in vielen Untersuchungslaboratorien Gaschromatographen vorhanden sind und für eine CO-Bestimmung genutzt werden können, ist zur Realisierung der CO-Bestimmung immer noch eine Nachrüstung mit dem Nickelkatalysator und einem „head space“ Probenwechsler erforderlich. Die dabei anfallenden Kosten liegen günstigenfalls bei 12 000 bis 15 000 €.

Gefrier-Tau-Stabilität von Carboxymyoglobin und -hämoglobin

Die Gefrier-Tau-Stabilität des unbehandelten und CO-behandelten Tunmuskels wurde anhand von Farbmessungen verfolgt. Dabei wurde der Gefrier-Auftau-Vorgang achtmal wiederholt. Die Ergebnisse der Messungen der CIELab-Farbwerte mit den Farbmessgeräten CR 300 (Minolta) und spectro pen[®] (Dr. Lange GmbH) sind in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt.

Es wird deutlich, dass bezüglich der Rotwerte (Abb. 7) markante Unterschiede zwischen der behandelten und der unbehandelten Muskulatur bestehen. Mit zunehmenden Gefrier-Tau-Zyklen ist offensichtlich

eine Abnahme der a*-Werte verbunden. Unterschiede zwischen beiden Farbmessgeräten werden durch unterschiedliche Kalibrierstandards erklärt. Auffällig ist jedoch, dass der durch die USDC festgelegte a*-Wert von $\leq 16,2$ als Beweis dafür dass der behandelte Tun dem unbehandelten farblich entspricht, nicht überschritten wird.

In der Regel scheint die Helligkeit L* der unbehandelten Proben im Vergleich zu den behandelten leicht erhöht ($P > 0,05$) und mit zunehmende Anzahl an Gefrier-Tau-Zyklen weisen die L*-Werte eine leicht steigende, aber ebenfalls nicht signifikante Tendenz auf (Abb. 8). Die mit dem CR 300 ermittelten b*-Werte weisen vergleichbare Tendenzen auf, wie vorstehend für L* diskutiert. Mit dem spectro pen[®] gemessene b* weisen dagegen keine durch die CO-Behandlung bedingten Unterschiede auf. Wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen bewirken offensichtlich ein Zunahme von b* (Abb. 8).

Thermische Stabilität von Tunfischmuskel

Die Anlagerung von CO an die Muskel- und Blutfarbstoffe beeinflusst die thermische Stabilität offensichtlich nicht signifikant. Dagegen führt der Gefrier-vorgang zu einer Modifizierung des Myosinpeaks. Die bei ungefrorenem Material zu erkennende Schulter auf der Niedrigtemperaturseite des Peaks verschwindet, wodurch sich eine geringere Differenzierung und Verbreiterung des Myosinpeaks durch den Gefriervorgang ergibt (Abb. 9). Umwandlungstemperaturen und -enthalpien der einzelnen Proteinfractionen bleiben weitgehend unbeeinflusst (Tab. 5). Zhang et al. (2001) untersuchten die thermischen Eigenschaften von Tunfisch (*Katsuwonus pelamis*) allerdings mit einem weniger empfindlichen DSC (PerkinElmer DSC7) und ermittelten dabei 3 Denaturierungstemperaturen, unterschiedlich für ordinären (42,6 °C, 56,4 °C, 68,7 °C) und roten (43,2 °C, 57,1 °C, 67,9 °C) Muskel. Die Zuordnung der einzelnen Peaks zu Proteinfractionen

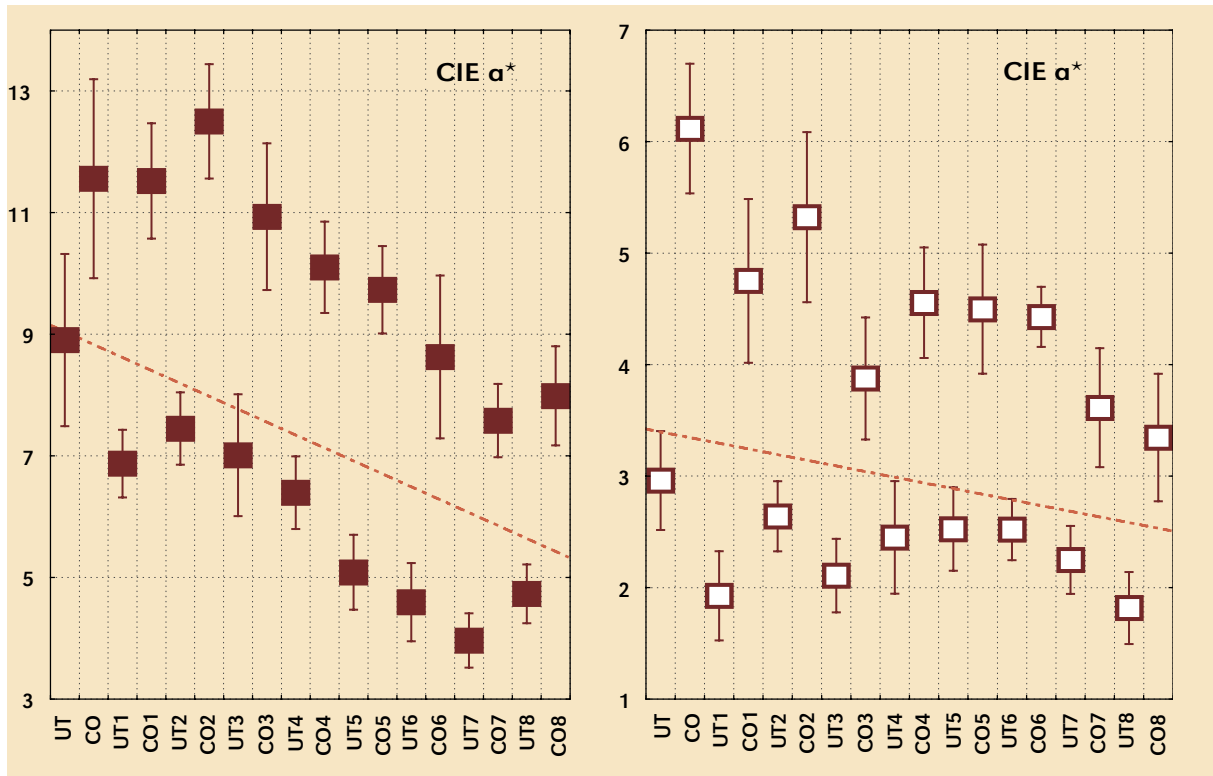


Abbildung 7: Veränderung der Rotwerte a^* in Abhängigkeit von Gefrier-Tau-Zyklen (UT bis UT8 = unbehandelter Muskel, CO bis CO8 = CO-behandelter Muskel, ■ = CR 300, □ = spectro pen®).

Changes in redness a^ as a function of freeze-thaw cycles (UT to UT8, untreated muscle; CO to CO8 = CO-treated muscle, ■ = CR 300, □ = spectro pen®).*

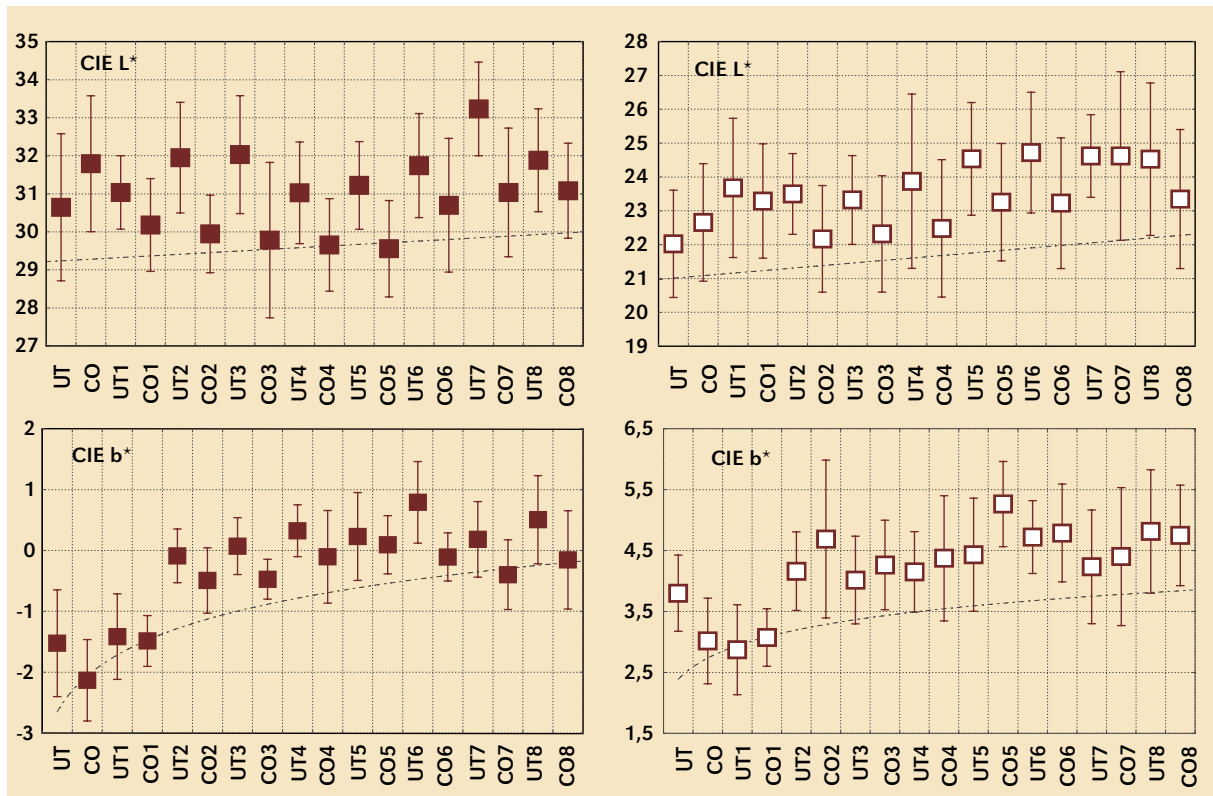


Abbildung 8: Veränderung der Helligkeit L^* und Gelbwerte b^* in Abhängigkeit von Gefrier-Tau-Zyklen (UT bis UT8 = unbehandelter Muskel, CO bis CO8 = CO-behandelter Muskel, ■ = CR 300, □ = spectro pen®).

Changes in lightness L^ and yellowness b^* as a function of freeze/thaw cycles (UT to UT8, untreated muscle; CO to CO8, CO-treated muscle, ■ = CR 300, □ = spectro pen®).*

Tabelle 5: Umwandlungstemperaturen und -enthalpien beim Erhitzen von Tunfischmuskel in Abhängigkeit von der Vorbehandlung – *Transition temperatures and enthalpies of heated tuna muscle as affected by pre-processing.*

| Probe | | Peak | | | |
|----------------------------------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | I | II | III | IV |
| Tun, frisch | T_{on} [°C] | 36,6 | 45,0 | 56,0 | 63,0 |
| | T_{max} [°C] | 41,7 | 49,1 | 58,4 | 65,6 |
| | ΔH [Jg ⁻¹] | 0,258 | 0,099 | 0,017 | 0,079 |
| Tun, frisch CO-behandelt | T_{on} [°C] | 36,8 | 46,0 | 57,5 | 64,0 |
| | T_{max} [°C] | 42,2 | 49,7 | 59,5 | 66,5 |
| | ΔH [Jg ⁻¹] | 0,219 | 0,112 | 0,011 | 0,068 |
| Tun, gefroren | T_{on} [°C] | 36,5 | 45,7 | 57,5 | 63,3 |
| | T_{max} [°C] | 39,9 | 50,0 | 59,9 | 66,4 |
| | ΔH [Jg ⁻¹] | 0,206 | 0,114 | 0,014 | 0,068 |
| Tun, CO-behan- delt, gefroren | T_{on} [°C] | 36,6 | 45,38 | 57,8 | 63,6 |
| | T_{max} [°C] | 39,8 | 50,0 | 59,7 | 66,4 |
| | ΔH [Jg ⁻¹] | 0,209 | 0,111 | 0,010 | 0,077 |

wird von ihnen wie folgt vorgenommen: Peak 1 = Umwandlung der Myosin- und 1. Umwandlung der Sarkoplasmproteinfraktion, Peak 2 = 2. Umwandlung der Sarkoplasmproteinfraktion, Peak 3 = 3. Umwandlung der Sarkoplasmproteinfraktion oder Umwandlung der Aktinfraktion. Ueki et al. (2005) isolierten dagegen die Myoglobinfraction von Bonito (*Auxis rochei*) und fanden deren Thermostabilität, die höchste Umwandlungstemperatur wurde mit 72,8 °C bei pH = 6,52 ermittelt, als am geringsten aller bisher von ihnen untersuchten Myoglobine von Scombriden.

Schlussfolgerungen

Die Zielstellung, eine einfache und billige Methode zum Nachweis von mit CO behandelter Fischmuskulatur zu entwickeln, wurde mit der optimierten Sensormethode realisiert. Durch geeignete Probenvorbereitung konnte Wasser als Extraktionsmittel für CO anstelle der Schwefelsäure eingesetzt werden und durch Anordnung der Messkomponenten in Reihenschaltung der Messfehler der Methode deutlich verringert werden. Instrumentelle Farbmessungen verdeutlichen, dass selbst achtmalige Gefrier-Tau-Zyklen keinen Verlust der signifikant erhöhten Rotfärbung in mit CO-behandeltem Tunmuskel verglichen mit unbehandeltem, einer gleichen Anzahl von Gefrier-Auftau-Vorgängen ausgesetztem, Tunfleisch bedingt. Eine CO-Behandlung verändert das DSC-Muster der Tunmuskel-Proteine nicht signifikant. Einmaliges Gefrieren/Auftauen beeinflusst jedoch die Form des Myosinpeaks.

Danksagung

Die Autoren danken Isabella Delgado Blas, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Forschungsbereich Fischqualität, Hamburg, Germany, und

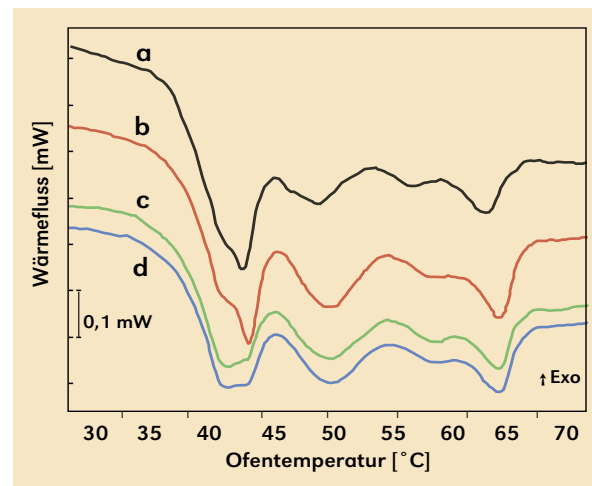


Abbildung 9: DSC-Kurven von frischer (a, b) und gefrorener (c, d) Thunmuskulatur ohne (a, c) und mit CO-Behandlung (b, d) – *DSC curves of fresh (a, b) and frozen (c, d) tuna muscle with (a, c) and without CO treatment (b, d).*

Axel Möller, Dräger Safety AG & Co. KGaA, Lübeck, Germany, für die sorgfältige experimentelle Mitarbeit.

Zitierte Literatur

- Stenzel, W.-R.; Feldhusen, F., 2004: Aspekte der Verwendung von Kohlenmonoxid bei Fleisch- und Fischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*. 84(9): 131–136.
- Schubring, R., 2004: Applikation von „tasteless smoke“ und Kohlenmonoxid bei Fisch – Technologiefolgenabschätzung. *Arch. Lebensmittelhyg.* 55: 85–93.
- Ishiwata, H.; Takeda, Y.; Kawasaki, Y.; Yoshida, R.; Sugita, T.; Sakamoto, S.; Yamada, T., 1996: Concentration of carbon monoxide in commercial fish flesh and in fish flesh exposed to carbon monoxide gas for color fixing. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 37: 83–90.
- Feldhusen, F.; Rehbein, H.; Kruse, R., 2004: Treatment of tuna products with carbon monoxide; principles of assessment and actual analytical aspects. In: Rehbein, H.; Karl, H.; Manthey-Karl, M.; Oehlenschläger, J.; Schubring, R. (eds.) *Proceedings of the WEFTA Conference 2004*. 12 – 15 September 2004, Lübeck, Germany. Hamburg, German Federal Research Centre for Nutrition and Food, Department for Fish Quality, p. 187–191.
- Jonker; K.M.; Geertsen, J.A.M.; Bos, H.P.G.M., 2001: Untersuchung auf Kohlenmonoxid in Thunfisch. *Keuringsdienst van Waaren Oost, SANCO-2003-02727-00-00-DE-TRA-00 (NL)*.
- Balaban, M. O.; Kristinsson, H. G.; Otwell, W. S., 2005: Evaluation of color parameters in a machine vision analysis of carbon monoxide-treated fish-part I: fresh tuna. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 14: 5–24.
- Anderson C.R.; Wu, W.-H., 2005: Analysis of carbon monoxide in commercially treated tuna (*Thunnus* spp.) and mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53: 7019–7023.
- Haase, T.; Heyer, H.; Schubring, R. (2005): Entwicklung einer einfachen und schnellen Analysenmethode für Kohlenmonoxid in Fisch und Durchführung orientierender Untersuchungen. *Inf. Fischereiforsch.* 52: 58–62.
- Schubring, R. (2004): Instrumental colour, texture, water holding

and DSC measurements on frozen cod fillets (*Gadus morhua*) during long term storage at different temperatures. Deut. Lebensm.-Rundsch. 100: 247–254.

Schubring, R., 2005: Thermal stability, texture, liquid holding capacity and colour of smoked salmon on retail level. Thermochimica Acta, doi: 10.1016/j.tca.2005.05.021.

Chow, C.-J.; Chu, Y.-J., 2004: Effect of heating on residual carbon monoxide content in CO-treated tuna and myoglobin. J. Food

Biochem. 28: 476–487.

Zhang, J.; Farkas, B. E.; Hale, S. A., 2001: Thermal properties of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Int. J. Food Properties 4: 81–90.

Ueki, N.; Chow, C.-J.; Ochiai, Y., 2005: Characterization of bullet tuna myoglobin with reference to the thermostability-structure relationship. J. Agric. Food Chem. 53: 4968–4975.