
VALIDIERUNG VON HPLC-METHODEN ZUR BESTIMMUNG
VON POLYPHENOLEN UND CAROTINOIDEN IN MÖHREN,
WEIZEN UND MAIS UNTERSCHIEDLICHER HERKUNFT

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Agrarwissenschaften

vorgelegt dem

Fachbereich Ökologische Agrarwissenschaften der
Universität Kassel/Witzenhausen

Fachgebiet Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur

von

Andreas Werries

Witzenhausen 2007

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 30.01.07

INHALT

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2	ALLGEMEINE GRUNDLAGEN	4
2.1	Validierung von Labormethoden	4
2.2	Qualität ökologisch erzeugter Lebensmittel	9
2.2.1	Ökologischer Landbau	9
2.2.2	Ökologisch erzeugte Lebensmittel in der Wahrnehmung der Verbraucher	11
2.2.3	Qualitätskontrolle von Öko Lebensmitteln	12
2.2.4	Untersuchungen zur produktbezogenen Qualität von Lebensmitteln aus ökologischem Anbau	14
2.2.5	Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in ökologisch vs. konventionell erzeugten pflanzlichen Lebensmitteln	15
2.3	Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe	17
2.3.1	Carotinoide	19
2.3.1.1	Strukturen der Carotinoide	19
2.3.1.2	Biosynthese der Carotinoide	20
2.3.1.3	Vorkommen und Bedeutung	21
2.3.1.4	Einflüsse auf die Carotinoidzusammensetzung von Lebensmitteln	22
2.3.1.5	Carotinoide in Möhren	25
2.3.1.6	Carotinoide in Weizenkörnern	25
2.3.1.7	Carotinoide in Maiskörnern	26
2.3.1.8	Wirkungen auf die menschliche Gesundheit	27
2.3.2	Polyphenole	30
2.3.2.1	Phenolcarbonsäuren	30
2.3.2.2	Flavonoide	32
2.3.2.3	Cumarine	34
2.3.2.4	Biosynthese der Polyphenole	34
2.3.2.5	Bedeutung für den pflanzlichen Organismus	35
2.3.2.6	Einflüsse auf den Gehalt phenolischer Substanzen in Pflanzen und pflanzlichen Lebensmitteln	36
2.3.2.7	Polyphenole in Möhren	39

2.3.2.8	Wirkungen auf die menschliche Gesundheit	41
2.3.3	Analytik sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe - Stand der Methoden	44
3	MATERIAL UND METHODEN	47
3.1	Weizenproben	48
3.1.1	Probenmaterial	48
3.1.1.1	Probenmaterial aus dem DOK-Versuch	48
3.1.1.2	Erzeugerproben	49
3.1.2	Carotinoide in Weizen	50
3.1.2.1	HPLC Messungen des Carotinoidgehaltes und des Carotinoidmusters in Weizen (2004)	50
3.1.2.2	HPLC-Analytik des Carotinoidgehaltes und des Carotinoidmusters in DOK-Weizen (2005)	52
3.1.3	Photometrische Messung der Summe der Gelbpigmente in Weizen	54
3.2	Maisproben	55
3.2.1	Probenmaterial	55
3.2.2	HPLC-Analytik des Carotinoidgehaltes und des Carotinoidmusters in Mais	56
3.3	Möhrenproben	59
3.3.1	Probenmaterial	59
3.3.1.1	Probenmaterial aus Anbauversuchen	59
3.3.1.2	Erzeugerproben	61
3.3.2	Carotinoide in Möhren	62
3.3.2.1	HPLC-Analytik des Carotinoidgehaltes und des Carotinoidmusters in Möhren	62
3.3.2.2	Photometrische Messung des Gesamtcarotinoidgehaltes in Möhren	65
3.3.3	Polyphenole in Möhren	66
3.3.3.1	HPLC-Analytik des Polyphenolgehaltes und des Polyphenolmusters in Möhren (2002, Freising)	66
3.3.3.2	HPLC-Analytik des Polyphenolgehaltes und des Polyphenolmusters in Möhren (2003, Witzenhausen)	68
3.3.3.3	HPLC-Analytik des Polyphenolgehaltes und des Polyphenolmusters in Möhren (2004, Witzenhausen)	69
3.4	Validierung der verwendeten Verfahren	71
3.4.1	Validierungsfragen	72
3.4.2	Validierungsumfang der analytischen Messmethoden	73

3.4.3	Validierung des Gesamtverfahrens - Differenzierung und Klassifizierung	75
4	ERGEBNISSE	78
4.1	Messungen der Carotinoide in Weizen	78
4.1.1	Identifizierung	79
4.1.2	Validierungsschritte der HPLC-Analytik von Carotinoiden in Weizen	80
4.1.2.1	Linearität	80
4.1.2.2	Präzision	83
4.1.2.3	Wiederfindung	85
4.1.2.4	Robustheit	86
4.1.3	Photometrische Bestimmung der Summe der Carotinoide in Weizen	90
4.1.3.1	Präzision	90
4.1.3.2	Linearität	91
4.1.4	Carotinoide in Weizen – Ergebnisse	92
4.1.4.1	Messungen des Carotinoidgehaltes in Weizen (2004)	92
4.1.4.2	Messungen des Carotinoidgehaltes in Weizen (2005)	96
4.1.5	Differenzierung und Klassifizierung	97
4.1.5.1	Differenzierung und Klassifizierung von Weizen mit unterschiedlicher N-Düngung (DOK-Weizen)	98
4.1.5.2	Differenzierung und Klassifizierung von Weizen-Erzeugerproben	102
4.2	Messungen der Carotinoide in Mais	106
4.2.1	Identifizierung der Carotinoide in Mais – Ergebnisse	107
4.2.2	Validierungsschritte der HPLC-Methode zur Bestimmung von Carotinoiden in Mais	108
4.2.2.1	Linearität	108
4.2.2.2	Präzision	113
4.2.2.3	Wiederfindung	115
4.2.2.4	Spezifität	117
4.2.2.5	Robustheit	118
4.2.3	HPLC-Analytik der Carotinoide in Mais - Ergebnisse	121
4.2.4	Differenzierung und Klassifizierung von Maisproben	123
4.3	Messungen der Carotinoide in Möhren	131
4.3.1	Identifizierung	131
4.3.2	Validierungsschritte der HPLC-Methodik zur Messung von Carotinoiden in Möhren	132
4.3.2.1	Linearität	132
4.3.2.2	Präzision	137

4.3.2.3	Spezifität	139
4.3.2.4	Richtigkeit	141
4.3.2.5	Robustheit	143
4.3.3	Photometrischen Bestimmung der Gesamtcarotinoide in Möhren - Grundkalibrierung	148
4.3.3.1	Linearität	149
4.3.3.2	Präzision	150
4.3.4	Messungen der Carotinoide in Möhren – Ergebnisse	151
4.3.5	Differenzierung und Klassifizierung	154
4.4	Messungen der phenolischen Bestandteile in Möhren	166
4.4.1	Identifizierung der phenolischen Bestandteile in Möhren	166
4.4.2	Validierungsschritte der HPLC-Methodik für die Messungen der phenolischen Bestandteile in Möhren	170
4.4.2.1	Linearität	170
4.4.2.2	Präzision	175
4.4.2.1	Präzision in Möhrenproben	175
4.4.2.3	Spezifität	176
4.4.2.4	Wiederfindung	177
4.4.2.5	Stabilität der Lösungen	179
4.4.2.6	Beurteilung von Einflussfaktoren auf das Messergebnis	179
4.4.3	HPLC-Analytik der phenolischen Bestandteile in Möhren – Ergebnisse	181
4.4.4	Differenzierung und Klassifizierung	182
4.4.4.1	Polyphenole in Möhren unterschiedlicher Sorten (FiBL-Möhren)	182
4.4.4.2	Ergebnisse der Messungen von Möhren mit unterschiedlicher N-Düngung (UniK-Möhren)	190
4.4.4.3	Differenzierung von Möhren-Erzeugerproben	195
5	DISKUSSION	205
5.1	Kritik der Methode	206
5.2	Carotinoide in Weizen	206
5.3	Carotinoide in Mais	210
5.4	Carotinoide in Möhren	212
5.5	Polyphenole in Möhren	216

5.6	Fazit	219
6	ZUSAMMENFASSUNG	223
7	SUMMARY	226
8	LITERATURVERZEICHNIS	228
9	Anhang	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Unterteilung der Verfahrensschritte im Laufe der Untersuchung einer Probe und Unterteilung in den analytischen und den präanalytischen Teil (nach SCHWEIZ, LEBENSMITTELBUCH, 2004).	5
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Verknüpfung von Primär- und Sekundärstoffwechsel	18
Abbildung 2-3: Strukturformeln einiger wichtiger Carotinoide.	19
Abbildung 2-4: Vereinfachtes Schema der Carotinoidbiosynthese (LIENAU, 2003).	21
Abbildung 2-5: Strukturen häufiger Hydroxyzimtsäuren, nach FEUCHT ET AL. (1989).	31
Abbildung 2-6: Strukturen häufiger Hydroxybenzoesäuren, nach FEUCHT ET AL. (1989).	32
Abbildung 2-7: Schematische Darstellung der Polyphenolsynthese in Pflanzen (aus RECHNER, 2001).	35
Abbildung 3-1: Fließschema einer Validierung am Beispiel der untersuchten Weizenproben.	77
Abbildung 4-1: Identifizierung von Lutein in Weizenproben.	79
Abbildung 4-2: Linearität des internen Standards β -apo-8-Carotenal.	81
Abbildung 4-3: Linearität von Lutein-Standardlösungen in 7 verschiedenen Konzentrationen..	82
Abbildung 4-4: Chromatogramme von Weizenproben mit einer Vydac 201TP Säule bei unterschiedlichen Säulentemperaturen.	88
Abbildung 4-5: Chromatogramme von Weizenproben mit unterschiedlichen Säulen.	89
Abbildung 4-6: Kalibriergerade für Lutein.	91
Abbildung 4-7: Anteil des Luteins an der Fraktion der photometrisch gemessenen Gelbpigmente in DOK-Weizenproben.	95
Abbildung 4-8: Anteil des Luteins an der Fraktion der photometrisch gemessenen Gelbpigmente in Weizen-Erzeugerproben.	95
Abbildung 4-9: Ergebnisse der Messungen mittels HPLC-Analytik des Luteingehaltes in DOK-Weizen mit unterschiedlichen Extraktionsmethoden.	97
Abbildung 4-10: Boxplot des Luteingehaltes in DOK-Weizen Proben.	98

Abbildung 4-11: Klassifizierung von DOK-Weizenproben mit CART.	100
Abbildung 4-12: Streudiagramm der Messwerte des photometrisch gemessenen Gesamtcarotinoidgehaltes in DOK-Weizen.	101
Abbildung 4-13: Boxplot des Luteingehaltes in Weizen-Erzeugerproben.	102
Abbildung 4-14: Klassifizierung von Weizen-Marktproben nach dem Anbau durch den Luteingehalt.	104
Abbildung 4-15: Klassifizierung von Weizen-Erzeugerproben durch den Gesamtcarotinoidgehalt.	106
Abbildung 4-16: Exemplarische Darstellung des Chromatogrammes einer Maisprobe.	107
Abbildung 4-17: Linearität von β -apo-8-Carotenal Standardlösungen.	109
Abbildung 4-18: Linearität von Lutein-Standardlösungen.	110
Abbildung 4-19: Linearität von Zeaxanthin-Standardlösung.	111
Abbildung 4-20: Linearität von Mais Realproben.	112
Abbildung 4-21: UV-Spektren von Lutein im Wellenlängenbereich zwischen 210 und 480 nm.	117
Abbildung 4-22: UV-Spektren von Zeaxanthin im Wellenlängenbereich zwischen 210 und 480 nm.	118
Abbildung 4-23: Einfluss der Verwendung von Chemikalien anderer Chargen.	119
Abbildung 4-24: Einfluss der Säulentemperatur auf die resultierenden Chromatogramme gleicher Maisproben bei 20 °C (I), 30 °C (II) und 45 °C (III).	120
Abbildung 4-25: Nicht identifizierte Peaks in Maisproben.	123
Abbildung 4-26: Boxplot der Messergebnisse des Luteingehaltes in Maisproben.	124
Abbildung 4-27: Boxplot der Messergebnisse des Zeaxanthingehaltes in Maisproben.	125
Abbildung 4-28: Boxplot der Messergebnisse des Peaks Nr. 2 in Maisproben.	126
Abbildung 4-29: Boxplot der Messergebnisse des Peaks Nr. 6 in Maisproben.	127
Abbildung 4-30: Boxplot der Messergebnisse des Peaks Nr. 7 in Maisproben.	128
Abbildung 4-31: Lineare Diskriminaten Analyse (LDA) zur Trennung von Maisproben anhand der Messergebnisse der Substanzen Lutein und Zeaxanthin sowie des Peaks Nr. 2.	130
Abbildung 4-32: Exemplarische Darstellung des Chromatogrammes einer Möhrenprobe der Sorte 'Rodelika' unter Standardbedingungen.	132
Abbildung 4-33: Linearität mit β -apo-8-Carotenal-Standardlösungen.	133
Abbildung 4-34: Linearität von Lutein-Standardlösungen.	134
Abbildung 4-35: Linearität von α -Carotin Standardlösung.	135
Abbildung 4-36: Linearität von β -Carotin-Standardlösungen.	137
Abbildung 4-37: UV-Spektren von Lutein im Wellenlängenbereich zwischen 210 und 480 nm.	140
Abbildung 4-38: UV-Spektren von α -Carotin im Wellenlängenbereich zwischen 210 und 480 nm.	140
Abbildung 4-39: UV-Spektren von β -Carotin.	141
Abbildung 4-40: Einfluss der Verwendung von Chemikalien anderer Chargen.	144
Abbildung 4-41: Einfluss der Säulentemperatur auf die resultierenden Chromatogramme gleicher Möhrenproben bei 20 °C (I), 30 °C (II) und 40 °C (III).	145
Abbildung 4-42: Einfluss der Säule auf das Chromatogramm von Möhrenproben.	147

Abbildung 4-43: Kalibriergerade für β -Carotin-Standardlösungen bei einer Wellenlänge von 452 nm.	149
Abbildung 4-44: Ergebnisse der photometrischen Messung des Gesamtcarotinoidgehaltes und der Summe der Carotinoide aus den Messungen mittels HPLC-Analytik im Vergleich.	154
Abbildung 4-45: Boxplot der Messergebnisse des Luteingehaltes in UniK-Möhren.	155
Abbildung 4-46: Boxplot der Messergebnisse des α -Carotingehaltes in UniK-Möhren.	156
Abbildung 4-47: Boxplot der Messergebnisse des β -Carotingehaltes in UniK-Möhren.	157
Abbildung 4-48: Boxplot der Messergebnisse des Gesamtcarotingehaltes in UniK-Möhren.	158
Abbildung 4-49: Boxplot der Messergebnisse des Luteingehaltes in Möhren-Erzeugerproben.	160
Abbildung 4-50: Boxplot der Messergebnisse des α -Carotingehaltes in Möhren-Erzeugerproben.	161
Abbildung 4-51: Boxplot der Messergebnisse des β -Carotingehaltes in Möhren-Erzeugerproben.	162
Abbildung 4-52: Klassifizierung aller Möhren-Erzeugerproben auf der Grundlage des Gehaltes einzelner Carotinoide.	165
Abbildung 4-53: Chromatogramm einer Möhrenprobe (FiBL-Möhren) der Sorte 'Samson' der Messungen 2003	167
Abbildung 4-54: Darstellung der Chromatogramme methanolischer Möhrenextrakte aus dem Jahr 2004	168
Abbildung 4-55: Linearität von 6-Methoxyflavon-Standardlösung.	171
Abbildung 4-56: Linearität von p-Hydroxybenzoesäure-Standardlösungen in verschiedenen Konzentrationen.	172
Abbildung 4-57: Linearität von Chlorogensäure-Standardlösungen in unterschiedlichen Konzentrationen..	173
Abbildung 4-58: Messung einer Möhrenprobe (2004) nach Aufbereitung und Messung mit Chemikalien verschiedener Chargennummern.	180
Abbildung 4-59: Messergebnisse (PF(Alyt)/PF(IS)) von Möhren unterschiedlicher Sorten (FiBL-Möhren 2002).	183
Abbildung 4-60: LDA mit Möhren unterschiedlicher Sorten (FiBL-Möhren, 2002).	185
Abbildung 4-61: Messergebnisse von Möhren unterschiedlicher Sorten (FiBL-Möhren 2003).	186
Abbildung 4-62: LDA mit Möhren unterschiedlicher Sorten (FiBL-Möhren, 2003).	189
Abbildung 4-63: Messergebnisse für Möhren der Sorte 'Rodelika' mit unterschiedlicher N-Düngung.	190
Abbildung 4-64: Messergebnisse für Möhren der Sorte 'Rodelika' und 'Rothild' mit unterschiedlicher N-Düngung.	192
Abbildung 4-65: LDA mit UniK-Möhren.	194
Abbildung 4-66: Messergebnisse der Möhren-Erzeugerproben.	195
Abbildung 4-67: LDA mit Möhren-Erzeugerproben.	202
Abbildung 4-68: Klassifizierung von Möhren-Erzeugerproben nach dem Anbausystem.	203

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Zusammenfassung der Ergebnisse vergleichender Studien von sekundären Pflanzeninhaltsstoffe in Produkten aus ökologischem Anbau vs. konventionellem Anbau (nach MITCHELL (2004), erweitert)	16
Tabelle 2-2: Antioxidative Eigenschaften der Carotinoide	28
Tabelle 2-3: Antikarzerogene Wirkungen der Carotinoide	28
Tabelle 2-4: Protektive Wirkung von Carotinoiden am Auge	28
Tabelle 2-5: Antikarzinogene Wirkungen von Polyphenolen	41
Tabelle 2-6: Antioxidative Wirkungen der Polyphenole	42
Tabelle 2-7: Übersicht der antimikrobiellen Wirkungen von Polyphenolen (nach TSCHONE, 2001)	42
Tabelle 2-8: Sonstige Wirkungen auf die menschliche Gesundheit	43
Tabelle 3-1: Charakterisierung der DOK-Weizenproben	48
Tabelle 3-2: Weizen-Erzeugerproben des Jahres 2004	49
Tabelle 3-3: Beschreibung der Maisproben für die Untersuchungen mit der HPLC und die photometrischen Messungen der Carotinoide	56
Tabelle 3-4: FiBL-Möhren des Jahres 2002	60
Tabelle 3-5: FiBL-Möhren des Jahres 2003	60
Tabelle 3-6: UniK-Möhren 2002 und 2003	61
Tabelle 3-7: UniK-Möhren 2004	61
Tabelle 3-8: Beschreibung der Möhren Erzeugerproben	62
Tabelle 3-9: Gradientenbedingungen für die HPLC-Untersuchungen der Polyphenole in Möhren	67
Tabelle 4-1: Linearität des internen Standards β -apo-8-Carotenal in 6 verschiedenen Konzentrationsstufen	80
Tabelle 4-2: Linearität von Lutein-Standardlösungen in verschiedenen Konzentrationsstufen	82
Tabelle 4-3: Präzision in Weizenproben	83
Tabelle 4-4: Intermediate precision in Weizen	84
Tabelle 4-5: Wiederfindung von Lutein in aufgestockten Weizenproben	85
Tabelle 4-6 : Wiederfindungsrate von β -apo-8-Carotenal in Möhrenproben	86
Tabelle 4-7: Gerätepräzision und Messpräzision der photometrischen Messungen des Gesamtcarotinoidgehaltes	91
Tabelle 4-8: Luteingehalt, Gesamtcarotinoidgehalt und Gehalt gelber Pigmente in Weizen	94
Tabelle 4-9: Differenzierung von DOK-Weizen über den Gehalt der Gesamtcarotinoide	101
Tabelle 4-10: Differenzierung auf der Grundlage des Luteingehaltes in Weizen Erzeugerproben	103
Tabelle 4-11: Differenzierung auf der Grundlage des Gesamtcarotinoidgehaltes in Weizen-Erzeugerproben	105

Tabelle 4-12: Linearität des internen Standards β -apo-8-Carotenal in verschiedenen Konzentrationsstufen	108
Tabelle 4-13: Linearität von Lutein in verschiedenen Konzentrationen	109
Tabelle 4-14: Linearität von Zeaxanthin	111
Tabelle 4-15: Untersuchungen zur Linearität von Maisproben in verschiedenen Konzentrationen	112
Tabelle 4-16: Gerätepräzision und Messpräzision in Maisproben	114
Tabelle 4-17: Wiederfindungsrate von Lutein in aufgestockten Proben	115
Tabelle 4-18: Wiederfindungsrate von Zeaxanthin in aufgestockten Proben	115
Tabelle 4-19: Wiederfindung des internen Standards β -apo-8-Carotenal in allen Maisproben	116
Tabelle 4-20: Luteingehalt und Zeaxanthingehalt in Mais	122
Tabelle 4-21: Korrelationen zwischen den einzelnen Peaks bezogen auf den Mittelwert	129
Tabelle 4-22: Bestimmung der Linearität des internen Standards β -apo-8-Carotenal	133
Tabelle 4-23: Bestimmung der Linearität von Lutein in unterschiedlichen Konzentrationen	134
Tabelle 4-24: Bestimmung der Linearität von α -Carotin in unterschiedlichen Konzentrationen	135
Tabelle 4-25: Bestimmung der Linearität von β -Carotin in unterschiedlichen Konzentrationen	136
Tabelle 4-26: Präzision in Möhrenproben	138
Tabelle 4-27: Wiederfindung des internen Standards in Möhrenproben	142
Tabelle 4-28: Richtigkeit der Messungen von Lutein	142
Tabelle 4-29: Richtigkeit der Messungen von α -Carotin	143
Tabelle 4-30: Richtigkeit der Messungen von β -Carotin	143
Tabelle 4-31: Einfluss der Säulentemperatur auf die Mittelwerte (n=5) der Messergebnisse von Möhrenproben	146
Tabelle 4-32: Einfluss der Säule auf das Ergebnis der HPLC–Analytik von Carotinoiden in Möhren.	148
Tabelle 4-33: Einfluss der Säule auf das Ergebnis der HPLC–Analytik von Carotinoiden in Möhren.	148
Tabelle 4-34: Gerätepräzision und Messpräzision der photometrischen Messungen des Gesamtcarotinoidgehaltes	150
Tabelle 4-35: Carotinoidgehalte in Möhren.	152
Tabelle 4-36: Linearität des internen Standards 6-Methoxyflavon	170
Tabelle 4-37: Linearität von p-Hydroxybenzoesäure in verschiedenen Konzentrationen	171
Tabelle 4-38: Linearität von Chlorogensäure in unterschiedlichen Konzentrationen	173
Tabelle 4-39: Linearität einzelner Peaks einer Möhrenprobe (methanolische Extraktion) in verschiedenen Verdünnungsstufen	174
Tabelle 4-40: Präzision in Möhrenextrakten (2002, 2003)	175
Tabelle 4-41: Präzision in methanolischen Möhrenextrakten (2004)	175
Tabelle 4-42: Wiederfindungsrate des internen Standards in Möhrenproben	177
Tabelle 4-43: Wiederfindung von p-Hydroxybenzoesäure-Standardlösungen in aufgestockten Möhrenproben	178

Tabelle 4-44: Wiederfindung von Chlorogensäure-Standardlösungen in aufgestockten Möhrenproben	178
Tabelle 4-45: Gehalt phenolischer Substanzen in Möhren	181
Tabelle 4-46: Retentionszeiten detektierter Peaks in FiBL-Möhren 2002	182
Tabelle 4-47: Retentionszeiten (Rt.) detektierter Peaks in FiBL-Möhren (2003)	186
Tabelle 4-48: Diskriminanten zur Gruppierung mittels LDA in den Jahren 2003 und 2003	189
Tabelle 4-49: Retentionszeiten (Rt.) detektierter Peaks in UniK-Möhren (2003)	190
Tabelle 4-50: Differenzierung von UniK-Möhren (2003)	191
Tabelle 4-51: Retentionszeiten (Rt.) detektierter Peaks in UniK-Möhren (2004)	191
Tabelle 4-52: Retentionszeiten (Rt.) detektierter Peaks in Möhren-Erzeugerproben (2004)	196

Glossar

ANOVA	Analysis of variance
APCI	Athmospheric pressure coupled interface
AU	Absorbance units
BFE	Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe
BHT	Butylhydroxytoluol
CART	Classification and regression tree
DAD	Diodenarraydetektor
DOK	Dynamisch-organisch–konventionell
EU	Europäische Union
F ₁	Bezeichnung für Hybridsorten (1. Filialgeneration)
FAL	Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft
FiBL	Forschungsinstitut für Biologischen Landbau, Schweiz
GC	Gaschromatographie
HPLC	High Pressure/Performance Liquid Chromatography
IS	Interner Standard
LDA	Lineare Diskriminantenanalyse
mAU	Milliabsorbance units
MeOH	Methanol
MW	Mittelwert
OP	Open pollinating
PF	Peakfläche
PG	Prüfgröße
Rpm	Rounds per minute
Rt.	Retentionszeit
s	Standardabweichung
SPS	Sekundäre Pflanzenstoffe
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultra violett
V _k	Variationskoeffizient
VO	Verordnung
WF	Wiederfindungsrate
WZW	Wissenschaftszentrum Weihenstephan

1 Einleitung und Zielsetzung

In den letzten Jahren ist das Verbraucherinteresse an ökologisch produzierten Lebensmitteln kontinuierlich gestiegen (BOURN ET AL., 2002; MEIER-PLOEGER, 2005). Für viele Käufer ist ein Hauptargument zum Kauf dieser Produkte eine erwartete höhere Qualität von Öko-Lebensmitteln gegenüber solchen aus konventioneller Produktion (DAVIES ET AL., 1995; CMA, 2005). Der Qualitätsbegriff umfasst dabei auch Aspekte wie politische, soziale und den Umweltschutz. Einen besonders hohen Stellenwert für den Verbraucher nimmt jedoch die ernährungsphysiologische Qualität ein, und damit die Erwartung, dass ökologische Lebensmittel gesünder seien als konventionelle.

Eine Kontrolle der landwirtschaftlichen Erzeugungsweise am Produkt kann aufgrund fehlender Methoden bisher nicht stattfinden, sondern es findet eine Kontrolle des Erzeugungsprozesses und dessen Dokumentation statt. Von gesetzlicher Seite liegt die Prüfung und Kennzeichnung von Öko-Produkten in der Hand der EU. Die EU-Verordnung 2092/91 legt fest, dass für pflanzliche Produkte, welche mit der Bezeichnung „Öko“ oder „Bio“ bezeichnet werden, definierte Produktionsrichtlinien eingehalten werden müssen und schreibt regelmäßige Prozesskontrollen der Erzeugerbetriebe vor.

In verschiedenen Übersichtsartikeln der letzten Jahre wurden die Ergebnisse vergleichender Studien zum Einfluss der Anbauweise auf die ernährungsphysiologische Qualität von Lebensmitteln zusammengefasst (WOESE ET AL., 1997; TAUSCHER ET AL., 2003; ALFÖLDI, 2006). In diesen Studien werden die Auswirkungen der verschiedenen Anbausysteme auf die Produktzusammensetzung untersucht.

Während die meisten dieser Untersuchungen Metaboliten des Primärstoffwechsels vergleichen, geraten in den letzten Jahren zunehmend die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses. Diese Inhaltsstoffe, die verschiedenen Substanzklassen wie beispielsweise den Polyphenolen oder den Carotinoiden angehören, erfüllen in der Pflanze verschiedene Funktionen in der Interaktion mit der Umwelt

und der Regulation von Stoffwechsellleistungen. Auch im Zusammenhang mit dem primären Stoffwechsel, insbesondere dem N-Metabolismus, sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe eine wichtige Größe zur Abschätzung der Pflanzengesundheit (BENNETT ET AL., 1994; TREUTTER ET AL., 1994; ASAMI ET AL., 2003) und damit einer eher ganzheitlichen Betrachtung des pflanzlichen Organismus. Weiterhin wurden in Untersuchungen die Induktion der Pflanzenabwehr und die Synthese von Polyphenolen und Carotinoiden durch biotische und abiotische Einflussgrößen beschrieben (ALT, 1980; COLE, 1984).

Aufgrund dieser Eigenschaften stellen sie eine Gruppe von Inhaltsstoffen dar, deren Gehalt durch Einflüsse der Anbauweise einer starken Elastizität unterliegt und somit stärker modulierbar ist als beispielsweise der von Mineralstoffen und Proteinen (BRANDT ET AL., 2001). Eine Abhängigkeit des Gehaltes dieser Stoffe vom Anbausystem erscheint daher durchaus möglich. Untersuchungen in dieser Richtung ergaben bislang keine eindeutigen Ergebnisse, was auch in der Verwendung von nicht vollständig vergleichbarem Versuchsgut und der Verwendung unterschiedlicher Messparameter und -methoden begründet liegt.

Zusätzlich sind die sekundären Pflanzenstoffe wertgebende Inhaltsstoffe in pflanzlichen Lebensmitteln, denen eine hohe gesundheitliche Bedeutung für den Menschen zukommt (WATZL ET AL., 2005). So kann eine hohe Zufuhr an sekundären Pflanzenstoffen wie Carotinoiden und Polyphenolen mit einem signifikant verringerten Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs in Zusammenhang gebracht werden (HERTOG ET AL., 1994, 1995, 1997; HEINONEN ET AL., 1996, KLIPSTEIN-GROBUSCH ET AL., 2000; KNEKT ET AL. 2002). Dieser Effekt konnte bisher jedoch nicht auf ein einzelnes Antioxidans zurückgeführt werden. Wahrscheinlicher ist, dass dieser Effekt auf das Zusammenspiel der einzelnen Minorkomponenten, also die Zusammensetzung einer ganzen Stoffklasse zurückzuführen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden HPLC-Methoden (HPLC = high pressure liquid chromatography) für die Messung des Polyphenol- und Carotinoidspektrums in codierten Blindproben von Möhren-, Weizen- und Mais angepasst und validiert. Dafür standen Proben aus definierten Langzeitversuchen und Erzeugerproben ausgesuchter ökologisch und konventionell arbeitender Anbaubetriebe für die Messungen zur Verfügung.

Dem Verfahren liegt die Frage zugrunde, ob es möglich ist, Kulturpflanzen aus verschiedenen Anbausystemen auf der Basis des Gehaltes bestimmter sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe zu differenzieren und messbare Unterschiede im Gehalt der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe mit einem bestimmten Anbausystem in Verbindung zu setzen. Dabei wurden codierte Blindproben untersucht, die Ergebnisse dieser Untersuchungen statistisch ausgewertet und im Hinblick auf eine statistisch signifikante Differenzierung geprüft.

Die Polyphenole und die Carotinoide wurden dabei aus drei Gründen als Messparameter gewählt:

- Sowohl Polyphenole als auch Carotinoide gehören zu den natürlichen Inhaltsstoffen von Möhren, Weizen und Mais; diese Stoffe sind demnach in allen Proben enthalten.
- In verschiedenen Untersuchungen wurden endogene und exogene Einflussgrößen auf die quantitative und qualitative Polyphenol- bzw. Carotinoidzusammensetzung in Möhren Weizen und Mais beschrieben, die auch durch das Anbausystem begründet sein können.
- Polyphenole und Carotinoide besitzen eine Reihe positiver Wirkungen auf die menschliche Gesundheit. Der Gehalt dieser Stoffe in Lebensmitteln ist daher für die menschliche Gesundheit relevant und stellt für den Konsumenten einen wichtigen Qualitätsbeweis dar.

2 Allgemeine Grundlagen

2.1 Validierung von Labormethoden

Jeder experimentell erzeugte Messwert ist mit Unsicherheiten behaftet, welche der Aussagekraft jeder Methode Grenzen setzen. Die Validierung untersucht und charakterisiert Prüfverfahren in Bezug auf deren Leistungsvermögen. Sie belegt, dass ein Prüfverfahren sich unter Berücksichtigung der Unsicherheiten für die Erfüllung einer bestimmten Aufgabe eignet (SCHWEIZ. LEBENSMITTELBUCH, 2004).

Nach der Definition der ISO/IEC 17025 ist die Validierung „die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden“. Mit der Validierung von analytischen Untersuchungsmethoden soll demnach der nachvollziehbare Nachweis erbracht werden, dass spezifische Fragestellungen, die mit einer Methode verbunden sind, beantwortet werden können.

Eine analytische Untersuchung besteht in der Regel aus aufeinander folgenden Verfahrensschritten, die sich in einen präanalytischen und einen analytischen Teil gliedern lassen. Das Ziel des präanalytischen Teils ist es, das zu untersuchende Probenmaterial so zu entnehmen, zu lagern und zu bearbeiten, dass der Gehalt der zu bestimmenden Substanz in der Probe möglichst unverändert bleibt und die entnommene Teilprobe repräsentativ für die Gesamtprobe ist.

Da der präanalytische Teil einer Untersuchungen in vielen Fällen nicht oder nur schwer quantitativ zu erfassen ist, beziehen sich die Validierungsmaßnahmen in der Regel auf den analytischen Teil der Messungen.

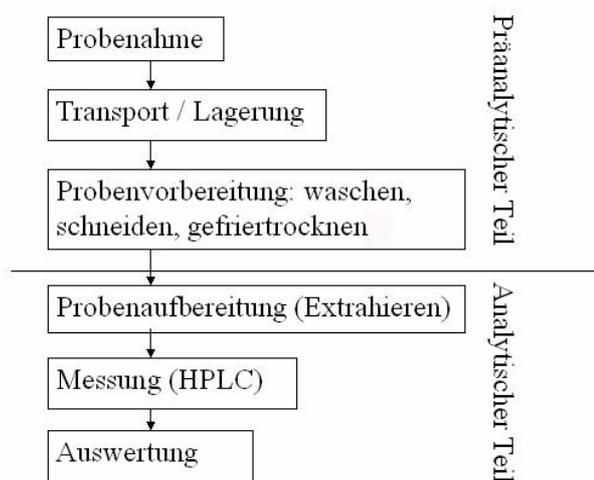


Abbildung 2-1: Unterteilung der Verfahrensschritte im Laufe der Untersuchung einer Probe und Unterteilung in den analytischen und den präanalytischen Teil (nach SCHWEIZ. LEBENSMITTELBUCH, 2004).

Im SCHWEIZ. LEBENSMITTELBUCH (2004) werden weitere Grundlagen zur Validierung genannt. Demnach ist eine Validierung kein einmaliger und danach abgeschlossener Vorgang. Vielmehr verringern sich beispielsweise mit der zunehmenden Zahl untersuchter Proben die Schwankungsbreite der Messergebnisse, der Vertrauensbereich und die Messunsicherheit. Ebenso muss bei einer Änderung der Untersuchungsziele durch die Einführung weiterer Probenmatrices oder erweiterter Spezifikationen die Validierung ergänzt werden. Gleiches gilt für die Anwendung veränderter Messmethoden. Die Auswahl der Matrices und der Umfang der Validierung hinsichtlich der Probenzahl und des Aufwandes für die einzelnen Validierungsschritte soll sich deshalb nach dem Untersuchungsziel richten.

Je aufwendiger eine Methode in den einzelnen Prozessschritten ist und je größer die Folgen eines Ergebnisses sind, desto größer muss der Aufwand für die Absicherung sein (KROMIDAS, 1999).

Durch die einer Methode zugrunde liegende Fragestellung wird der Umfang einer Validierung mitbestimmt. Diese Fragestellungen lassen sich in drei Klassen einteilen:

A.) Ja/Nein Entscheid

Bei qualitativen Nachweisen geht es um die Frage, ob eine Substanz in einer bestimmten Matrix vorhanden ist oder nicht. In solchen Fällen ist die Bestimmung der Entscheidungsgrenze sowie die Überprüfung der Selektivität und der Leerwerte ausreichend.

B.) Vergleich mit Limiten

Der Umfang der Validierungsmaßnahmen von Methoden zur Überwachung von Limiten (Grenzwerte, Spezifikationen) konzentriert sich in der Hauptursache auf den Konzentrationsbereich um die fraglichen Limite.

C.) Monitoring

Methoden die zur Bestimmung von Substanzen in einem großen Konzentrationsbereich über einen längeren Zeitraum bestimmt werden sollen, sind mit dem größten Validierungsaufwand verbunden.

Die einzelnen Verfahrensmerkmale sowie die Validierungsmaßnahmen, die zu deren Überprüfung dienen, werden u. a. im AMTSBLATT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN (2002) beschrieben.

Bei der Validierung eines Analysenverfahrens ist die Bestimmung der folgenden Validierungsparameter üblich, wobei sich der Umfang der Validierung nach der Fragestellung richtet (KROMIDAS ET AL., 1995; KROMIDAS, 1996).

Linearität

Die Überprüfung auf Linearität gibt Aufschluss darüber, in welchem Konzentrationsbereich die Konzentration einer untersuchten Substanz in einem mathematischen Zusammenhang mit dem Messsignal korreliert ist. Die Kalibrierfunktion kann linear, linearisiert oder nicht linear sein. Die Linearität bezieht sich auf eine konkrete Methode.

Präzision

Die Präzision ist das Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Analyseergebnisse untereinander. Sie beschreibt das Maß der Streuung von Analyseergebnissen. Die Präzision wird als Standardabweichung oder als Variationskoeffizient (V_K) einer Datenreihe angegeben. (KROMIDAS, 1999). Die Bestimmung der Präzision kann in die Bestimmung der Gerätepräzision, die Messpräzision und die Methodenpräzision unterteilt

werden. Darüber hinaus kann die Laborpräzision bzw. intermediate precision bestimmt werden. Es ist darauf zu achten, dass alle relevanten Schritte des Prüfverfahrens berücksichtigt werden, da jeder Schritt einen Beitrag zur Präzision leistet. Die Vergleichspräzision ergibt sich aus Methodenvergleichsstudien, wobei in diesem Fall die Mitwirkung mehrerer Laboratorien notwendig ist (SCHWEIZ. LEBENSMITTELBUCH, 2004).

Die Gerätepräzision und die Messpräzision als Variationskoeffizienten, bzw. relative Standardabweichung beziehen sich nur auf den instrumentellen Messvorgang und liegen in der Regel in einem Bereich zwischen $< 0,05$ % für Titrationsen, 1 % für HPLC, GC oder photometrische Messungen und bis 2 % für Feuchtemessungen oder Kappillarelektrophorese (KROMIDAS, 1999).

Die erreichbare Methodenpräzision ist von der Konzentration des Analyten in der Matrix abhängig. Die Richtwerte für den Pharmabereich liegen für Analytgehalte von 10 % und mehr bei max. 3 %, für 1 %-10 % Analytgehalt bei einem V_K von 5 % und für Analytgehalte von 0,1 bis 1 % bei einem V_K von 10 % (KROMIDAS, 1999).

Richtigkeit

Die Richtigkeit ist die systematische Abweichung eines gemessenen Wertes von einem als richtig angesehenen Wert (KROMIDAS, 1999).

Für Messungen in Matrices unbekannter Zusammensetzung ist die Richtigkeit aufgrund der mangelnden Kenntnis über Bindungsform und Verteilung des Analyten in der Matrix oder über die Reinheit und Stabilität eines Referenzmaterials der am schwierigsten zu bestimmende Validierungsparameter. Da die Richtigkeit konzentrationsabhängig ist, sollte sie immer an mehreren Proben unterschiedlichen Gehaltes bestimmt werden (SCHWEIZ. LEBENSMITTELBUCH, 2004).

Die Richtigkeit einer Methode kann mit der Wiederfindung ausgedrückt werden. Die Wiederfindung oder die Wiederfindungsrate ist das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert und beschreibt die Ausbeute der extrahierten Analyten nach allen Schritten der Analyse (KROMIDAS, 1999).

Die Richtigkeit soll möglichst mit zertifiziertem Referenzmaterial bestimmt werden. Wenn kein zertifiziertes Referenzmaterial, oder gut beschriebenes Probenmaterial (z.B. aus Ringversuchen) zur Verfügung steht, kann die Wiederfindung mittels aufgestockten

Proben mit Standardsubstanzen einzelner Analyten bestimmt werden (KROMIDAS, 1999).

Spezifität/Selektivität

Die Spezifität beschreibt die Fähigkeit einer Methode, eine Substanz bzw. eine Substanzklasse ohne Störung durch andere Komponenten zu bestimmen (KROMIDAS, 1999). Im Unterschied zu einer *selektiven* Methode, welche direkt interpretierbare Ergebnisse für *alle* interessierenden Analyten liefert, werden durch eine *spezifische* Methode direkt interpretierbare Ergebnisse für *einen* Analyten erzielt, während andere Analyten sich gegenseitig stören können (KROMIDAS, 1999).

Robustheit

Die Robustheit beschreibt die Fähigkeit einer Methode unter variierenden Bedingungen gleich bleibende Ergebnisse zu liefern. Kritische Einflussgrößen auf die Ergebnisse können sowohl in der Probenvorbereitung, der Aufbereitung und der Analyse selbst liegen. Als Faktoren kommen dabei neben dem Analytiker sowie den Geräten und Umgebungsbedingungen (z. B. Temperatur) auch die Reinheit und die Stabilität von Reagenzien, Standards, Proben sowie deren Lösungen in Betracht (KROMIDAS, 1999).

Dokumentation

Den Abschluss der Validierung bildet die Dokumentation der Maßnahmen und basiert auf dem während der Messungen geführten Validierungsprotokoll. Die Dokumentation kann dabei Angaben zu folgenden Punkten beinhalten (nach KROMIDAS, 1999):

- Zusammenfassung mit kommentierter Stellungnahme
- Zielsetzung der Methode und Anwendungsbereich
- Prinzip und Charakteristika der eingesetzten Methoden
- Beschreibung der untersuchten Probenmatrices
- Charakterisierung der eingesetzten Geräte und Chemikalien
- Beschreibungen der Messungen und Angabe der Messergebnisse mit Angaben über die experimentellen Bedingungen

2.2 Qualität ökologisch erzeugter Lebensmittel

2.2.1 Ökologischer Landbau

Die Bezeichnung „Lebensmittel aus biologischem Anbau“ bzw. aus „ökologischem Anbau“ bezeichnet solche Lebensmittel, die nach den Grundsätzen und Praktiken des ökologischen Landbaus erzeugt werden. Der Hauptgedanke der ökologischen Landwirtschaft besteht im Wirtschaften mit der Natur, wobei der landwirtschaftliche Betrieb vor allem als Organismus mit den Bestandteilen Mensch, Tier, Pflanze, Klima und Boden gesehen wird. Mit den Methoden des ökologischen Landbaues soll ein möglichst geschlossener betrieblicher Nährstoffkreislauf erreicht werden, dessen Futter- und Nährstoffgrundlage der Betrieb selbst sein soll (BMELV, 2005).

Folgende Maßnahmen stehen dabei nach der Darstellung des BMELV (2005) im Vordergrund:

- Kein Pflanzenschutz mit chemisch-synthetischen Mitteln.
- Anbau wenig anfälliger Sorten in geeigneten Fruchtfolgen.
- Einsatz von Nützlingen, mechanische Maßnahmen zur Unkrautbekämpfung wie Hacken und Abflammen.
- Keine Verwendung leicht löslicher mineralischer Düngemittel.
- Ausbringen von organisch gebundenem Stickstoff vorwiegend in Form von Mist oder Mistkompost.
- Gründüngung durch Stickstoff bindende Pflanzen und Einsatz langsam wirkender natürlicher Düngestoffe.
- Pflege der Bodenfruchtbarkeit durch ausgeprägte Humuswirtschaft; abwechslungsreiche, weite Fruchtfolgen mit vielen Fruchtfolgegliedern und Zwischenfrüchten.
- Keine Verwendung von chemisch-synthetischen Wachstumsregulatoren oder von Hormonen.
- Begrenzter, streng an die Fläche gebundener Viehbesatz.

- Fütterung der Tiere möglichst mit hofeigenem Futter, wenig Zukauf von Futtermitteln von anderen Ökobetrieben; weitgehender Verzicht auf Antibiotika.

Ökologischer Landbau ist besonders auf Nachhaltigkeit ausgelegt. Er erhält und schont die natürlichen Ressourcen in besonderem Maße und hat vielfältige positive Auswirkungen auf die Umwelt (BMELV, 2005).

In vielen vergleichenden Artikeln zur Qualität von Lebensmitteln aus verschiedenen Anbausystemen werden die Begriffe „ökologischer“, „biologischer“ oder „organischer“ Anbau synonym gebraucht. Alle drei Begriffe sind allgemeine Sammelbegriffe des täglichen Sprachgebrauchs und umfassen die verschiedenen biologischen Landbaumethoden (DIERCKS, 1986). Gekennzeichnet werden Produkte aus ökologischer Landwirtschaft in Deutschland durch das staatliche Bio-Siegel und häufig durch die Aufschrift „aus kontrolliert biologischem Anbau“, abgekürzt *kbA*. International ist die englische Bezeichnung *organic* üblich.

Eine große Anzahl der ökologischen Produzenten hat sich darüber hinaus in verschiedenen Anbauverbänden - wie in der Bundesrepublik Deutschland z.B. Bioland, Demeter, Naturland, Gää e.V. oder Biopark - zusammengeschlossen. Die unterschiedlichen Anbauverbände in der EU kontrollieren und fördern national ihre Mitglieder. In ihren Anforderungen gehen sie teilweise beträchtlich über die Anforderungen der EU Öko-Verordnung hinaus. So ist beispielsweise den an Bioland angeschlossenen Höfen der Zukauf von synthetischem Stickstoffdünger untersagt, und diese Höfe dürfen keinen konventionellen Anbau betreiben, auch wenn beide Anbauarten von einander getrennt sind. Seit 2005 gelten bei Naturland zusätzlich Sozialrichtlinien. Damit werden die sozialen Bedingungen, unter denen ökologische Lebensmittel erzeugt und verarbeitet werden, im Rahmen der Zertifizierung abgeprüft.

2.2.2 Ökologisch erzeugte Lebensmittel in der Wahrnehmung der Verbraucher

In den letzten Jahren wurde in verschiedenen Übersichtsartikeln immer wieder auf die steigende Nachfrage nach ökologisch erzeugten Lebensmitteln hingewiesen (BOURN ET AL., 2002; TAUSCHER ET AL., 2003; MEIER-PLOEGER, 2005). Demnach ist der Markt für ökologische Lebensmittel das am stärksten wachsende Segment im Lebensmittelbereich und hat mittlerweile in Deutschland einen Jahresumsatz von 3,5 Mrd. Euro erreicht (HAMM, 2004). Der Marktanteil aller Öko-Produkte am Lebensmittelmarkt lag in Deutschland im Jahr 2004 bei ca. 2,5 %, bei Öko-Obst mit einem Marktanteil von 5 % sogar noch höher (BMELV 2005). Ökologisch erzeugte Lebensmittel verfügen über einen hohen Bekanntheitsgrad (70-80 %) und sind bei etwa 60 % der Verbraucher mit einem positiven Image verbunden, als regelmäßige Käufer ökologischer Produkte bezeichnen sich jedoch nur 8 % der Bevölkerung (CMA, 2005).

Die Motivation, die zum Kauf ökologisch erzeugter Lebensmittel führt, wurde wiederholt untersucht und die Ergebnisse zeigen eine Reihe spezifischer Faktoren, die sich stark nach der sozialen Lage und der Grundorientierung der Käufer richten (CMA, 2005).

Es wird neben allgemeinen Umwelt- und Ressourcenschutzaspekten, der Lebensmittelsicherheit und der Frische vor allem auch auf gesundheitliche Aspekte hingewiesen. Viele Käufer halten ökologische Lebensmittel hinsichtlich Produktbezogener Qualitätsaspekte, wie der geringeren Belastung mit Pestiziden, einem höheren Nährwert oder einem höheren Gehalt gesundheitsfördernder Inhaltsstoffe, für gesünder als konventionelle Lebensmittel. Diese Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass diese Käufer ökologischer Lebensmittel überdurchschnittlich gesundheitsbewusst sind und diese Lebensmittel zum Nutzen der eigenen Gesundheit kaufen (BEHARRELL ET AL., 1991; CMA, 2005).

2.2.3 Qualitätskontrolle von Öko Lebensmitteln

In der „Verordnung (EWG) Nr. 2092/91 des Rates vom 24. Juni 1991 über den ökologischen Landbau und die entsprechende Kennzeichnung der landwirtschaftlichen Erzeugnisse und Lebensmittel“ (EU-ÖKO-VERORDNUNG sowie ergänzende Richtlinien) wird genau definiert, wie landwirtschaftliche Erzeugnisse und Lebensmittel, die als Öko-Produkte gekennzeichnet werden sollen, erzeugt und hergestellt werden müssen. Um die Qualität eines Lebensmittels zu ermitteln, müssen nicht nur die speziellen Eigenschaften des Produktes, sondern auch seine Erzeugung und Verarbeitung bemessen und nachgewiesen werden.

Öko-Produkte müssen genau wie konventionelle Erzeugnisse die Vorschriften des Lebensmittel- und Futtermittelrechts erfüllen. Für eine zusätzliche Öko-Zertifizierung muss das nach der EU-Öko-Verordnung vorgesehene Kontrollsystem und -verfahren durchgeführt werden.

Die Kontrolle der Öko-Lebensmittel erfolgt in Deutschland über staatlich zugelassene Öko-Kontrollstellen, die jährlich die Einhaltung der EU-Öko-Verordnung (VO, EWG, NR. 2092/91) durch die Erzeuger ökologisch erzeugter Lebensmittel überprüfen.

In der EU-Öko-Verordnung ist auch das Zulassungsverfahren für die deutschen Kontrollstellen geregelt. Aufgrund der grundgesetzlichen Zuordnungen erfolgt die Überwachung und Zulassung der deutschen Kontrollstellen durch Bund und Länder, wobei die Aufgabenverteilung im deutschen Öko-Landbaugesetz geregelt ist. Die staatlich zugelassenen privaten Öko-Kontrollstellen in Deutschland sind zuständig für die Kontrolle der Erzeugung und Verarbeitung von Öko-Lebensmitteln. Sie überprüfen und überwachen vor Ort die Einhaltung der EU-Öko-Verordnung.

Die Maßnahmen zur Kontrolle der Echtheit von Öko-Lebensmitteln umfassen alle Stufen des Produktionsprozesses einschließlich der Lagerung, der Lagerung und der Verpackung. Mindestanforderungen für die Erzeuger, Verarbeiter, Lagerhalter und Händler landwirtschaftlicher Produkte werden im Anhang III der EU-Öko-Verordnung aufgeführt. Erzeuger und Verarbeiter müssen beschreiben auf welchen Flächen, in welchen Gebäuden und mit welchen Einrichtungen produziert wird. Um die Rückverfolgung von Öko-Produkten sicherzustellen, müssen darüber hinaus alle Betriebsmittel und Erzeug-

nisse, die in den Betrieb eingehen auf allen Verarbeitungsstufen genau erfasst und protokolliert werden.

Die Kennzeichnung ökologisch erzeugter Lebensmittel ist gesetzlich geregelt und sieht vor, dass nur Öko-Produkte Hinweise wie „aus (kontrolliert) biologischem bzw. ökologischem Anbau/Landbau“ oder „aus (kontrolliert) biologischer/ökologischer Landwirtschaft“ tragen dürfen. Die EU Codenummer garantiert die Herstellung nach den Richtlinien der Verordnung 2092/91. Die Kontrollstellen-Nummern auf ökologisch erzeugten Produkten sind wie folgt aufgebaut:

DE-XXX-Öko-Kontrollstelle

DE = Länderkürzel (DE = Deutschland; andere EU Mitgliedstaaten besitzen andere Länderkürzel).

XXX = Nummern- oder Buchstabenkombination (deutsche Kontrollstellen verwenden Ziffern).

Zur Überprüfung werden die Betriebe mindestens einmal jährlich kontrolliert, außerdem werden Stichprobenkontrollen durchgeführt. Bei bestandener Kontrolle sind die Betriebe berechtigt ihre Produkte mit dem deutschen Biosiegel auszuzeichnen. Produkte die dieses Siegel tragen müssen folgende Anforderungen erfüllen:

- Sie müssen - den Vorschriften der amtlichen Kontrollregelung entsprechend - zu mindestens 95% aus ökologischen Erzeugnissen bestehen.
- Sie müssen in geschlossener Verpackung direkt vom Erzeuger oder Aufbereiter kommen.
- Sie müssen den Namen des Erzeugers, Aufbereiters, Vertreibers oder Verkäufers sowie den Namen oder den Code der Kontrollstelle tragen

Bei Verstoß gegen die Bestimmungen des Öko-Landbaus kann der Entzug des Rechts das betreffende Produkt als ökologisches Erzeugnis zu bezeichnen, zur Anwendung kommen. Bei Vorliegen schwerwiegender Verstöße können strengere Strafen verhängt werden (BMELV, 2005).

Sind weniger als 95% aber mindestens 70% der Zutaten ökologisch erzeugt, dürfen diese in der Zutatenliste als solche gekennzeichnet werden – z.B. mit einem Sternchen oder einer Fußnote.

2.2.4 Untersuchungen zur produktbezogenen Qualität von Lebensmitteln aus ökologischem Anbau

Wenn es darum geht eine objektive Bewertung von Erzeugnissen aus verschiedenen Produktionsverfahren vorzunehmen, steht die Wissenschaft bisher noch am Anfang. Die Mehrzahl der Untersuchungen, die in diesem Bereich durchgeführt wurden, wurden entweder als Düngungsversuche oder als Betriebsvergleiche konzipiert. Weitergehende Untersuchungen widmen sich den Wirkungen ökologischer Lebensmittel auf Menschen und Tiere.

Ergebnisse solcher Studien zur produktbezogenen Qualität konventionell und ökologisch erzeugter pflanzlicher Lebensmittel wurden in den letzten Jahren von verschiedenen Autoren zusammengefasst und bewertet (WOESE ET AL., 1995; WORTHINGTON, 1998; HEATON ET AL., 2001; BOURN ET AL., 2002; TAUSCHER ET AL., 2003; VELIMIROV ET AL., 2003). Die Ergebnisse dieser einzelnen Studien konnten keine in allen Punkten übereinstimmenden Ergebnisse erbringen.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus den angesprochenen Literaturstudien wurde von ALFÖLDI ET AL. (2006) vorgenommen. Als Gesamttrend werden an dieser Stelle folgende Eigenschaften genannt:

- Ökologisch erzeugte pflanzliche Lebensmittel haben einen geringeren Gehalt wertmindernder Inhaltsstoffe wie beispielsweise Pestizide und Nitrat.
- Ökologisch erzeugte pflanzliche Lebensmittel haben tendenziell höhere Gehalte an Vitamin C.
- Eine höhere Belastung durch pathogene Stoffe, wie Mykotoxine und Kolibakterien von ökologisch erzeugten Lebensmitteln im Vergleich zu konventionell erzeugten Lebensmitteln kann nicht festgestellt werden.

- Im Vergleich haben ökologisch erzeugte Lebensmittel einen geringeren Proteingehalt als konventionell erzeugte.
- Der Gehalt potenziell gesundheitsfördernder sekundärer Pflanzeninhaltsstoffen ist in ökologisch erzeugten pflanzlichen Lebensmitteln höher als in konventionell erzeugten Lebensmitteln.

2.2.5 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in ökologisch vs. konventionell erzeugten pflanzlichen Lebensmitteln

Die ernährungsphysiologische Relevanz der Ergebnisse vergleichender Studien zum Proteingehalt und allgemeinen Parametern wie dem Nährwert und dem Mineraliengehalt wird in verschiedenen Studien (BRANDT ET AL., 2001; BOURN ET AL., 2002) auch vor dem Hintergrund der Versorgungssituation in den Industrieländern zurückhaltend bewertet. Da Mineralien und Vitamine sowie die Zufuhr von Proteinen und Kohlenhydraten in diesen Ländern keine Mangelfaktoren darstellen, werden dort andere Parameter, wie der Gehalt sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe für die Einschätzung des gesundheitlichen Nutzens vorgeschlagen. Die Ergebnisse von Untersuchungen zum Gehalt sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe in ökologisch erzeugten pflanzlichen Lebensmitteln sind als Hintergrund für die vorliegende Arbeit relevant und werden daher näher vorgestellt.

Den sekundären Pflanzenstoffen wird eine allgemein hemmende Wirkung bei Entzündungen und Infektionen zugesprochen. Außerdem verringern sie das Risiko von Herz-Kreislauf- und Krebserkrankungen (ENGELHARDT, 1992; GALENSA ET AL., 1995A, B; SCHLESIER ET AL., 2001). Nach Ergebnissen der neueren Literatur auf diesem Gebiet sollen ökologisch erzeugte, pflanzliche Lebensmittel einen höheren Gehalt sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe besitzen als konventionell erzeugte (BRANDT ET AL., 2001).

Ergebnisse zu vergleichenden Untersuchungen sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe sind als Tabelle dargestellt. Die Ergebnisse dieser Studien sind nicht eindeutig, und ein abschließendes Urteil ist auf der Grundlage dieser Untersuchungen nicht zu treffen.

Tabelle 2-1: Zusammenfassung der Ergebnisse vergleichender Studien von sekundären Pflanzeninhaltsstoffe in Produkten aus ökologischem Anbau vs. konventionellem Anbau (nach MITCHELL (2004), erweitert)

Quelle	Proben	Parameter	Ergebnisse
LIEBLEIN (1993)	Möhren	β -Carotiningehalt, N-Gehalt	Kein konsistenter Zusammenhang zwischen mineralischer N-Düngung und dem Stickstoffgehalt, kein Effekt der N-Düngung auf den Carotinoidgehalt
ASAMI ET AL., (2003)	Mais, Erdbeeren	Gesamtphenolgehalt (TP), Ascorbinsäure (AA)	TP erhöht in Proben aus ökologischem und integriertem Anbau
CARBONARO ET AL., (2001)	Pfirsiche, Birnen	Aktivität der Polyphenoloxidase (PPO)	TP und PPO Aktivität erhöht in Früchten aus ökologischem Anbau
CARBONARO ET AL., (2002)	Pfirsiche, Birnen	PPO Aktivität, TP, AA, α -Tocopherol (TH)	PPO Aktivität und TR erhöht in ökologisch erzeugten Pfirsichen, α -TH erhöht in Pfirsichen aus ökologischem Anbau und niedriger in Birnen aus ökologischem Anbau
GRINDER-PETERSEN, (2003)	Humane Ausscheidungsprodukte nach Aufnahme konventioneller vs. ökologischer Nahrungsmittel	Quercitin (Q), Kämpferol (K), Hesperitin (H), Naringenin, Isorhamnetin (I)	Ökologisch erzeugte Lebensmittel mit höherem Q-Gehalt, höherem K (Trendaussage) und niedrigerem I. Höhere renale Exkretion von Q und K nach Ingestion ökologischer Lebensmittel
HÄKKINEN ET AL., (2000)	Heidelbeeren, Erdbeeren	Q, K, Ellagsäure, p-Cumarsäure	Keine konsistenten Unterschiede zwischen Proben der verschiedenen Anbausysteme
RENET AL., (2001)	Qing-gen-cai, Spinat, China-kohl, grüne Paprika, Zwiebeln	Antioxidative und antimutagene Kapazität, Flavonoide (Q, K, H, Kaffeesäure Myricetin, Apigenin =A)	Höhere antioxidative Kapazität in Spinat, Zwiebeln, Qing-gen-cai aus ökologischem Anbau, keine Unterschiede bei grünem Paprika; generell höhere Flavonoidgehalte in Proben aus ökologischem Anbau
WEIBEL ET AL., (2001)	Äpfel	phenolische Substanzen, (Flavonoide)	Durchschnittlich 18 % mehr phenolische Substanzen in Äpfeln aus ökologischem Anbau
YOUNG, ET AL., (2005)	Grünkohl, Blattsalat, Pak Choi	Phenolische Säuren, (K), (Q), (L), (A), Luteolin, (TP)	Keine Unterschiede der Einzelkomponenten, TP signifikant höher in ökologisch erzeugten Pak-Choi-Proben.
HAJSLOVA, ET AL., (2005)	Kartoffeln	Chlorogensäure, PPO-Aktivität, Vit. C	Keine konsistenten Unterschiede zwischen den Proben über 4 Jahre

2.3 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Nach einer einfachen Definition werden Stoffe, die nicht im Primärstoffwechsel der Pflanze gebildet und verbraucht werden, als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (SPI) bezeichnet (RICHTER, 1996).

Während der Primärstoffwechsel praktisch in allen Zellen gleich abläuft und dessen Produkte demnach in allen Zellen angetroffen werden, liegen die SPI nur in bestimmten Zellen bzw. Zellkompartimenten mit spezifischen Funktionen vor. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe sind in der Regel komplexer als die primären Produkte, da sie aus den Produkten des Primärstoffwechsels auf unterschiedlichen Stoffwechselwegen, die nicht im Primärstoffwechsel zur Verfügung stehen, synthetisiert werden. Die Anzahl der SPI ist nicht bekannt, die Anzahl der verschiedenen Verbindungen wird momentan zwischen 60000 bis 100000 geschätzt (WATZL, 2005).

Aufgrund leistungsfähiger Trennverfahren wie der HPLC und der Gaschromatographie und Methoden der Strukturaufklärung sind heutzutage die Strukturen von einigen 10000 Naturstoffen bekannt. Eine Einteilung der SPI erfolgt anhand ähnlicher chemischer Eigenschaften, wobei eine allgemein gültige Einteilung dieser Stoffe in verschiedenen Klassen nicht existiert. Charakteristisch ist dabei die Beschränkung der Verbreitung einzelner Sekundärstoffe auf bestimmte Familien, einzelne Arten oder sogar chemische Rassen. Die Rolle der SPI für die Pflanze selbst ist in vielen Fällen im Detail noch ungeklärt oder unterliegt der Spekulation.

Trotz der enormen strukturellen Vielfalt der Sekundärverbindungen lässt sich die Synthese der SPI auf wenige zentrale Stoffwechselwege zurückführen (Abb. 2-2), welche wiederum mit einer begrenzten Anzahl von Grundbausteinen oder Intermediärprodukten auskommen. Beispiele hierfür sind Shikimat, Isopentenylphosphat und einige Aminosäuren oder aber Acetyl-CoA, welches eine zentrale Stellung einnimmt (RICHTER, 1996).

Physiologische Bedeutung erhalten die SPI als Cosubstrate oder Coenzyme und als Speicherstoffe für Stickstoff und Kohlenstoff. Sie spielen daneben aber auch eine Rolle bei der Photosynthese, beim Ionentransport und bei der Beeinflussung von Bildung,

Aktivierung und Abbau von Pflanzenhormonen. Bekannte Funktionen bestehen weiterhin in der direkten Abwehr von Fressfeinden durch den Aufbau mechanischer Barrieren, wie sie in der Substanz Lignin realisiert sind, abschreckende, bakterizide, toxische oder hormonelle Prinzipien. Weiterhin gibt es Hinweise auf die Vermittlung einer indirekten Abwehr durch die „Kommunikation“ zwischen Pflanzen einer Population mittels flüchtiger Substanzen. Schließlich besitzen die SPI optische und olfaktorische Signalwirkungen, welche als Attraktoren für bestäubende Insekten dienen können. Beispiele hierfür sind die farbigen Pigmente in Blütenblättern (RICHTER, 1996).

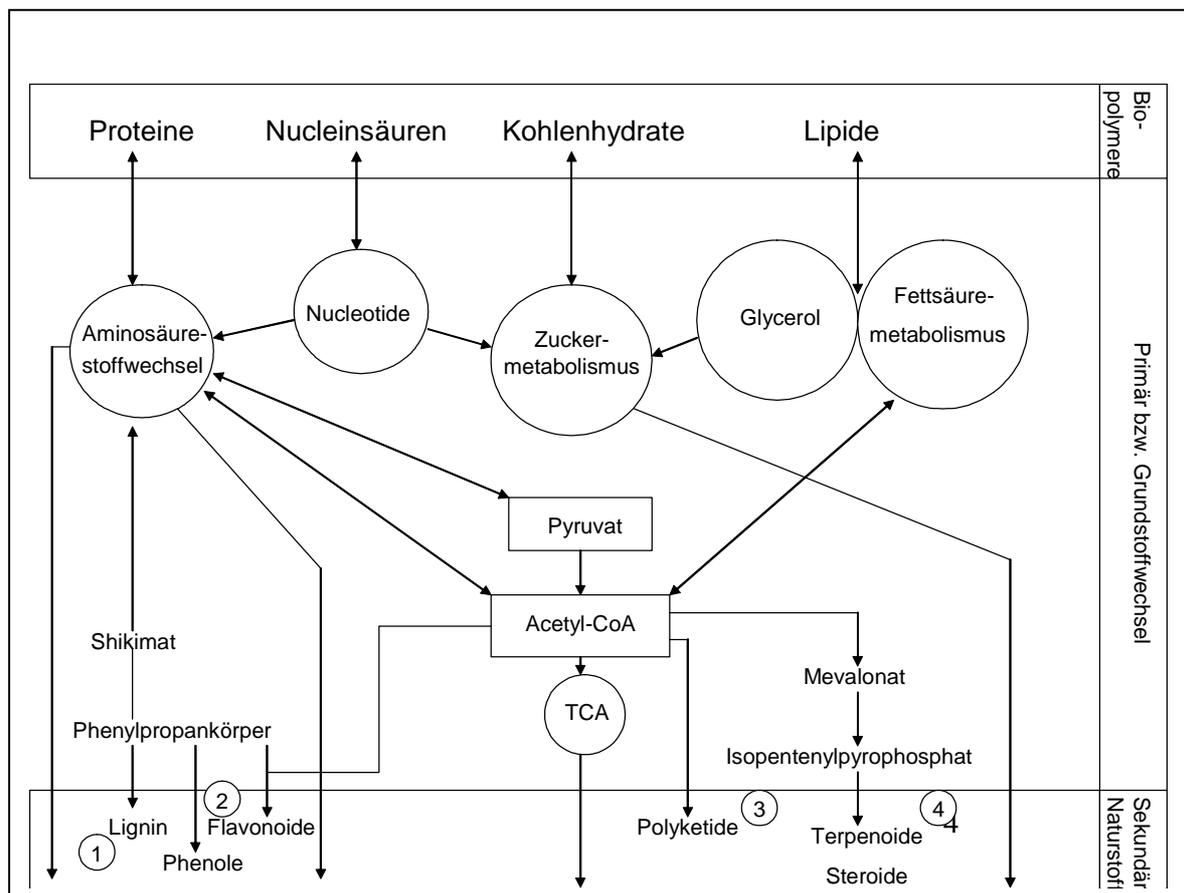


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Verknüpfung von Primär- und Sekundärstoffwechsel.

2.3.1 Carotinoide

Als Carotinoide wird eine Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe bezeichnet, welche als gemeinsames Merkmal aus acht Isopren-Einheiten bestehen, und somit zur Substanzklasse der Tetraterpene gehören.

2.3.1.1 Strukturen der Carotinoide

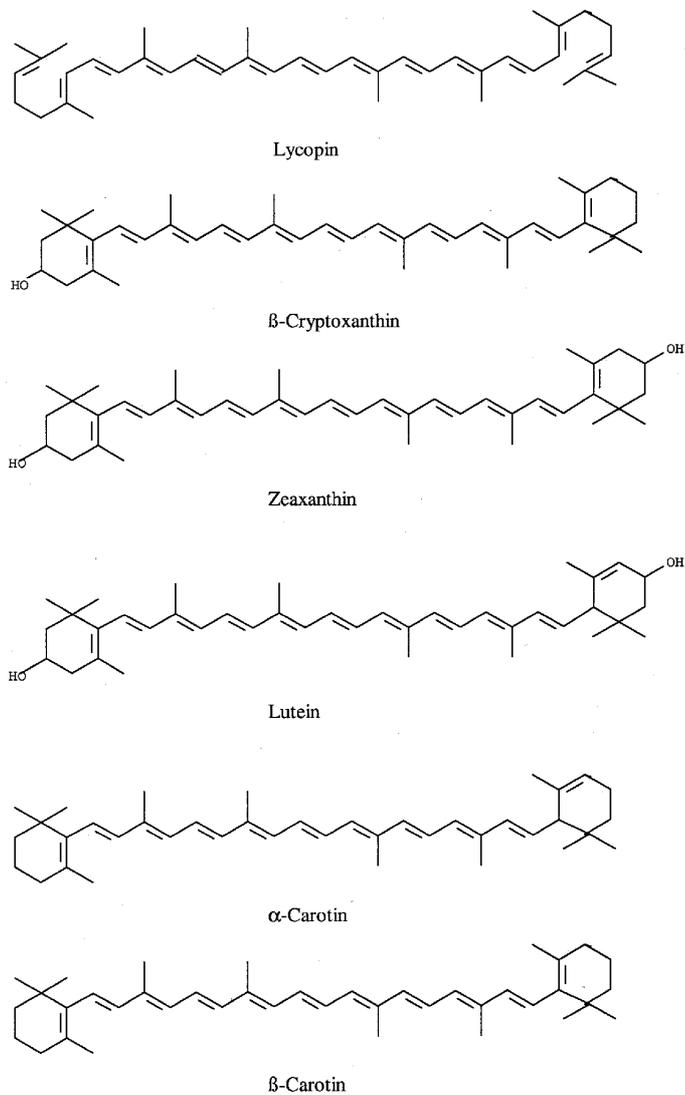


Abbildung 2-3: Strukturformeln einiger wichtiger Carotinoide (LIENAU, 2003).

Formal leiten sich alle Carotinoide vom Lycopin her. Lycopin ist eine acyclische Verbindung mit der Summenformel $C_{40}H_{56}$. Weitere Carotinoide entstehen durch weitere Hydrierung, Dehydrierung, Cyclisierung oder den Einbau von funktionellen Gruppen, wie Hydroxyl-, Carbonyl- oder Epoxygruppen. Die beiden wichtigsten cyclischen Carotinoide sind β - und α -Carotin. Beide besitzen endständig zwei Ionon-Ringe, die durch eine olefinische Kette verbunden sind. Während β -Carotin ein zentrosymmetrisches Molekül ist, das zwei β -Ionon-Ringe als Endgruppen hat, besteht α -Carotin aus einem β - und einem ε -Ionon-Ring. Die Strukturen einiger weit verbreiteter Carotinoide sind in Abbildung 2-3 dargestellt. Neben den dargestellten Carotinoidstrukturen mit der all-trans-(all-E-) Konfiguration der olefinischen Kette existieren auch mehrere geometrische Isomere mit einer oder mehreren z-(cis-) Anordnungen. Diese z-Isomere werden unter der Wirkung von Licht, Sauerstoff und Wärme gebildet (LIENAU, 2003). Dabei besitzt das zentrosymmetrisch aufgebaute Zeaxanthin zwei sterisch bevorzugte Isomere in 9- und 13-Position. Lutein dagegen ist aufgrund der verschiedenen endständigen Ionon-Ringe unsymmetrisch. Daher ergibt sich die doppelte Anzahl an Z-Isomeren. Diese werden als 9-Z, 13-Z, 9'-Z, 13'-Z-Lutein bezeichnet (LIENAU, 2003). Für andere Carotinoide, die eine noch höhere Tendenz zur Isomerisierung aufweisen, sind auch Z-Isomere bzw ZZ-/ZZZ-Isomere in anderen Positionen beschrieben (ZECHMEISTER, 1962).

Aufgrund der Tatsache, dass die meisten Carotinoide ein oder mehrere stereogene Zentren besitzen, kommen neben den verschiedenen geometrischen Isomeren auch optische Isomere vor. So kommen beispielsweise von Lutein, welches drei stereogene Zentren besitzt, acht optische Isomere vor. Das natürlich vorkommende Isomer ist dabei das 3R, 3'R, 6'R-Lutein (LIENAU, 2003).

2.3.1.2 Biosynthese der Carotinoide

Die Abbildung 2-4 zeigt ein vereinfachtes Schema der Carotinoid-Biosynthese.

Zuerst werden zwei Einheiten Isopentylpyrophosphat (IPP) an ein Molekül Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) addiert. Das Produkt dieses ersten Schrittes ist das Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). Durch die weitere Schwanz-Schwanz-Verknüpfung

zweier Moleküle GGPP entsteht Phytoen, in welches durch anschließende Dehydrierung Doppelbindungen in das Molekül eingeführt werden. Auf diesem Wege entstehen nacheinander all-E ζ -Carotin, all-E Neurosporin und schließlich all-E Lycopin. Aus dieser Substanz werden unter Cyclisierung oder Hydroxylierung weitere Carotinoide gebildet (BREITENBACH ET AL., 2001).

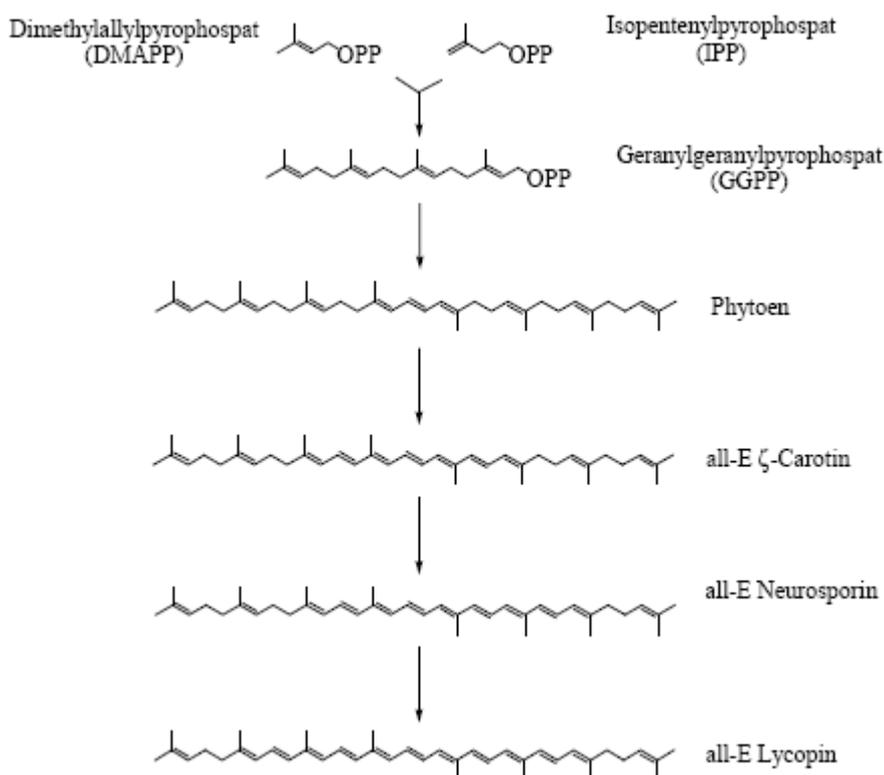


Abbildung 2-4: Vereinfachtes Schema der Carotinoidbiosynthese (LIENAU, 2003).

2.3.1.3 Vorkommen und Bedeutung

Aus der Natur sind gegenwärtig mehrere hundert Carotinoide bekannt (WATZL, 2001). Diese werden hauptsächlich in den Blättern von Pflanzen gefunden, wo sie mit den Chloroplasten assoziiert vorkommen. Die Aufgabe der Carotinoide besteht dabei in der Mitwirkung im Prozess der primären Lichtabsorption und der Photonenkanalisierung in der Photosynthese. In dieser Funktion schützen sie das Chlorophyll der Blätter vor dem

oxidativen Abbau. Die typische orange-rote Farbe wird in den Blättern jedoch meistens durch das Chlorophyll überdeckt (BRITTON ET AL., 1998).

In vielen Fällen sind die orange-roten Carotinoide auch in Samen, im Pollen und in den Früchten von Obst und Gemüse zu finden, wo sie oft für die Farbgebung verantwortlich sind. So finden sich beispielsweise hohe Konzentrationen von β -Carotin in Möhren, während die rote Farbe der Tomate durch das Lycopin zu erklären ist. Carotine finden sich überwiegend in orange-rot-gelbem Gemüse und Obst (WATZL, 2001). Häufig vorkommende Xanthophylle wie Zeaxanthin und Lutein finden sich dagegen eher in dunkelgrünem Blattgemüse.

2.3.1.4 Einflüsse auf die Carotinoidzusammensetzung von Lebensmitteln

Der Carotinoidgehalt in Lebensmitteln variiert hinsichtlich der qualitativen und der quantitativen Zusammensetzung. Grünes Gemüse und Blattgemüse besitzen ein Carotinoidmuster, in welchem Lutein, β -Carotin, Violaxanthin und Neoxanthin die bedeutendsten Substanzen darstellen. Während die relativen Verhältnisse der Einzelkomponenten weitgehend konstant erscheinen, können die absoluten Konzentrationen variieren. Grünes Gemüse enthält zusätzlich noch Carotinoide wie α -Carotin, β -Cryptoxanthin, Zeaxanthin und Lutein-5,6-Epoxid (RODRIGUEZ-AMAYA, 2004).

Die Zusammensetzung der Carotinoide in Früchten ist wesentlich komplexer und variabler.

Typischerweise enthalten Früchte wenige Hauptkomponenten zusammen mit einer Reihe untergeordneter Carotinoide, die sich nur in Spuren oder in sehr geringen Konzentrationen nachweisen lassen. Von GOODWIN (1980) wurden acht verschiedene Carotinoidmuster beschrieben:

- unbeutende Carotinoidanteile
- geringe Mengen an Chloroplasten assoziierte Carotinoide
- beträchtliche Konzentrationen von Lycopin
- β -Carotin und/oder β -Cryptoxanthin als Hauptbestandteile der Carotinoidfraktion
- beträchtliche Anteile von Carotinoidepoxiden

- mengenmäßiges Übergewicht seltener, artspezifischer Carotinoide
- bedeutende Anteile von poly-cis-Carotinoiden
- signifikante Anteile sogenannter Apo Carotinoide (Carotinoide mit verkürztem C-Grundgerüst).

Die Carotinoide in reifen Früchten sind hauptsächlich in den Chloroplasten lokalisiert, Hydroxycarotinoide finden sich meistens in veresterter Form mit Fettsäuren.

Carotine sind die vorherrschenden Bestandteile in Wurzelgemüse, Xanthophylle lassen sich als vorherrschende Carotinoide beispielsweise in Mais und Weizenkörnern finden (GOODWIN, 1980).

Die qualitative und quantitative Variabilität der Carotinoide einer Pflanze bzw. eines pflanzlichen Lebensmittels wird darüber hinaus noch von weiteren Faktoren wie Sorte, Reifezustand, verwendetem Pflanzenteil, Anbaufaktoren, Verarbeitung und Lagerungsbedingungen beeinflusst.

Sortenunterschiede des gleichen Produktes sind gut dokumentiert und können sowohl die qualitative als auch die quantitative Zusammensetzung der Carotinoide erheblich beeinflussen (GROSS, 1987, 1991; RODRIGUEZ-AMAYA, 1993). So werden beispielsweise Unterschiede im β -Carotiningehalt von Süßkartoffelsorten zwischen 10 – 26 $\mu\text{g}/100\text{g}$ beschrieben (HUANG ET AL., 1992; K'OSAMBO, 1998).

Daneben ist der Reifezustand einer der Faktoren, die eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Carotinoidzusammensetzung spielen. Die Reife geht in Gemüse und Obst generell mit einer erhöhten Carotinogenese einher (GROSS, 1987, 1991; ARIMA ET AL., 1988; MERCADANTE ET AL., 1998). So besitzen Blätter verschiedener Reifegrade zwar das gleiche qualitative Carotinoidspektrum, die Konzentrationen der einzelnen Komponenten erhöhen sich jedoch mit zunehmender Reife. In Salatblättern und in Endivien erhöht sich die Konzentration der Carotinoide im Laufe der Reife um das 3-fache (RAMOS ET AL., 1987; AZEVEDO-MELEIRO ET AL., 2005).

Einen ebenfalls fördernden Einfluss auf die Carotinogenese haben die Temperatur und die Exposition gegenüber UV-Strahlung. Entsprechend wies Blattgemüse, das in einem Gewächshaus bzw. auf überdachten Parzellen angebaut worden war, im Sommer einen höheren Carotinoidgehalt auf als im Winter (RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; KIMURA ET AL., 2003). Freilandversuche mit Blattgemüse ergaben im Winter einen höheren Carotinoid-

gehalt der Pflanzen als im Sommer. Solche Ergebnisse werden mit dem Übergewicht der Photodegradation unter dem Einfluss der Sonneneinstrahlung gegenüber der Carotinogenese begründet (HEINONEN ET AL., 1989).

Auch die Auswahl eines bestimmten Pflanzenteils hat einen Einfluss auf den Carotinoidgehalt einer Probe, da sich die Carotinoide nicht in allen Pflanzenteilen gleichmäßig finden lassen und größtenteils in der Schale enthalten sein sollen (GROSS, 1987, 1991; RODRIGUEZ-AMAYA, 1993).

Weiterhin werden auch Einflüsse aus dem Anbausystem beschrieben. In einer vergleichenden Studie mit Kohl (MERCADANTE ET AL., 1991) werden Pflanzen gleicher Sorte, im gleichen Reifezustand, von benachbarten Standorten von je einem ökologisch wirtschaftenden und einem konventionell wirtschaftenden Betrieb miteinander verglichen. In den Pflanzen aus ökologischem Anbau wird gegenüber den konventionell erzeugten Proben eine erhöhte Konzentration aller Carotinoide angegeben. In anderen Untersuchungen an Möhren der Sorten 'Nerac' und Nabonne (RÜFER ET AL., 2006) wird in den Proben der Sorte 'Nerac' aus konventionellem Anbau ein signifikant höherer Gehalt der Carotinoide Lutein, α -Carotin und β -Carotin gefunden. Diese Ergebnisse werden in Möhren der Sorte 'Narbonne' jedoch nicht bestätigt. Sortenspezifische Unterschiede im Carotinoidgehalt und der antioxidativen Kapazität werden in der selben Quelle ebenfalls nicht nachgewiesen. Keine Unterschiede im Carotinoidgehalt von Pflanzen finden sich im Vergleich eines konventionellen mit einem hydroponischen Anbausystem (KIMURA ET AL., 2003). Weiterhin wird die Anwendung von Herbiziden auf den Carotinoidgehalt diskutiert (GIANNOPLITIS ET AL., 1989).

Durch ihren Charakter als hochgradig ungesättigte Verbindungen sind die Carotinoide auch nach der Ernte sowie während der Lagerung und der Verarbeitung anfällig gegenüber Isomerisierung und Oxidation. Die Isomerisierung von cis- zu trans-Carotinoiden wird durch den Kontakt mit Säuren, Hitze und durch die Einwirkung von UV-Licht ausgelöst und führt zu einem Verlust der Farbe und der Vitamin-A Aktivität. Weitere wichtige Faktoren in der Veränderung der Carotinoide sind die enzymatische und die nicht-enzymatische Oxidation. Diese Vorgänge werden von der Einwirkung des Luftsauerstoffs, der jeweiligen Carotinoidstruktur sowie durch den Kontakt mit Metallen und verschiedene Peroxidasen gefördert und können durch Antioxidantien gehemmt

werden. Der Mechanismus der enzymatischen Oxidation ist noch nicht vollständig geklärt. Mit zunehmender Degradation der Zellstrukturen, der Lagerdauer sowie der Licht- und Sauerstoffexposition während der Lagerung/Verarbeitung scheint auch die Oxidation zuzunehmen. Unter ungünstigen Bedingungen können die Lagerbedingungen und/oder die Verarbeitung zu vollständiger Farblosigkeit und zum Verlust der Vitamin-A Aktivität führen (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999, 2002).

2.3.1.5 Carotinoide in Möhren

Der Carotinoidgehalt von Möhren wird in der Literatur in einem weiten Konzentrationsbereich beschrieben, wobei die Bestimmungsmethoden und das Probenmaterial hinsichtlich Sorten und Probenvorbereitung starke Unterschiede aufweisen. So werden Gehalte aus gefriergetrockneten Möhren, Frischmasse und Möhrensaft angegeben. Weiterhin erfolgt teilweise eine Unterscheidung in große und kleine Möhren gleichen Alters, nach dem Pflanzenalter und nach dem Erntetermin (SCHUPHAN, 1976; FRITZ ET AL., 1977; BAJAJ ET AL., 1980; EVERS, 1989; HEINONEN ET AL., 1990; MÜLLER, 1997). Daneben werden noch Einflüsse des Anbaustandortes sowie des Anbau- bzw. Erntejahres beschrieben, die sich in einer Größenordnung von fast 50 % Abweichung bewegen können (HABEGGER, 2005). Den genannten Quellen zufolge sind die Hauptcarotinoide in Möhren α -Carotin, β -Carotin und Lutein. Der Gehalt von α -Carotin wird mit 0,11 – 0,56 mg/100g, der Gehalt β -Carotin mit 4,6 – 10,3 mg/100g und der Luteingehalt zwischen 0,11 – 0,56 mg/100g in Frischmöhren angegeben. Eine direkte Vergleichbarkeit zwischen diesen Ergebnissen ist aufgrund des unterschiedlichen Probenmaterials nur bedingt gegeben.

2.3.1.6 Carotinoide in Weizenkörnern

Die Intensität der Farbgebung, die in der Hauptsache den Carotinoden zugeschrieben wird, galt in der Vergangenheit als Qualitätsparameter für Weizen und Weizenprodukte. In neuerer Zeit werden die Carotinoide zusätzlich auch aufgrund ihrer antioxidativen

Eigenschaften untersucht (PANFILI ET AL., 2004). Nach verschiedenen Untersuchungen (HEINONEN ET AL., 1989; HENTSCHEL ET AL., 2002; KONOPKA ET AL., 2003; PANFILI ET AL., 2004) lassen sich in Weizen die Carotinoide Lutein, β -Carotin und Spuren von Zeaxanthin nachweisen. Die Hauptkomponente dieser Substanzklasse ist dabei das Lutein. Der Luteingehalt von Weizen, der in Finnland angebaut wurde (HEINONEN ET AL., 1989), wird mit Werten von 220 $\mu\text{g}/100\text{g}$ angegeben. In einer polnischen Studie (KONOPKA ET AL., 2003) wird ein Bereich zwischen 1,43 – 1,80 ppm im gesamten Korn und zwischen 1,47 – 2,11 ppm im Mehl genannt, daneben werden signifikante Sortenunterschiede gefunden. Während Lutein gleichmäßig im Korn verteilt ist, enthalten nur die äußeren Schichten des Korns β -Carotin in einer Konzentration von 0,04-0,25 ppm. Bei HENTSCHEL (2002) werden weiterhin Spuren von Zeaxanthin und nicht identifizierte Gelbpigmente beschrieben. In dieser Untersuchung wird der mit der HPLC gemessene Luteingehalt mit Werten zwischen 1,5 – 4 mg/kg angegeben. An den gleichen Proben wurde zusätzlich mit einer photometrischen Methode (ICC 152) der Gehalt der gelben Pigmente, deren chemische Natur bislang den Carotinoiden zugeschrieben wurde, bestimmt. Die gemessenen Werte übertreffen die mittels HPLC ermittelten Werte um mehr als das Doppelte. An dieser Stelle werden Unterschiede im Luteingehalt der einzelnen Fraktionen des gemahlene Weizens bestätigt. In einem Vergleich zwischen Weichweizen und Hartweizen liegt der Luteingehalt in Hartweizen zwischen 1,69 – 2,75 ppm, der von Weichweizen zwischen 0,13 – 2,23 ppm.

2.3.1.7 Carotinoide in Maiskörnern

Ebenso wie beim Weizen entstammen die gelben Pigmente im Mais der Klasse der Carotinoide. In den Untersuchungen von KURILICH ET AL. (1999), DAOOD ET AL. (2003) und PANFILI ET AL. (2004) werden als Carotinoide in Mais die Substanzen Lutein, Zeaxanthin, β -Carotin, β -Cryptoxanthin und α -Carotin genannt. Die Hauptkomponenten in frischem Mais stellten in den Untersuchungen von KURILICH ET AL. (1999) die Xanthophylle Zeaxanthin und Lutein dar. In dieser Studie mit 44 Zuckermaislinien wird der Luteingehalt mit Werten zwischen 0-20 $\mu\text{g}/\text{g}$ TM angegeben. Das gleiche Carotinoidmuster wird auch von MOROS ET AL. (2002) beschrieben. In dieser Untersuchung wer-

den die Gehalte von Lutein mit 15,7 $\mu\text{g/g}$ TM, von Zeaxanthin mit 5,7 $\mu\text{g/g}$ TM und der Gehalt von β -Cryptoxanthin mit 0,57 $\mu\text{g/g}$ TM angegeben. Hinsichtlich der Gehalte werden von DAOOD ET AL. (2003) signifikante Sorten- und Standortunterschiede für die einzelnen Carotinoide ermittelt. In Untersuchungen, die mit Mais verschiedener Farben an unterschiedlichen Standorten durchgeführt wurden, liegen der Lutein- und der Zeaxanthingehalt in einem Bereich zwischen 2,13-11,3 $\mu\text{g/g}$. An dieser Stelle werden zusätzlich die Carotinoide β -Zeaxanthin und Zeinoxanthin in Konzentrationen von 0,11-0,81 $\mu\text{g/g}$ bzw. 0,05-0,92 $\mu\text{g/g}$ beschrieben. Die mittleren Konzentrationen nach PANFILI (2004) für Zeaxanthin betragen 6,43 mg/kg TM, für β -Cryptoxanthin 2,4 mg/kg TM, für β - α -Carotin 1,44 mg/kg TM und für den Gesamtcarotinoidgehalt 11,14 mg/kg TM. Während Lutein eine gleichmäßige Verteilung über das ganze Korn zeigt, sind α - und β -Carotin im Keimling lokalisiert. Im Jahresbericht BFE (2003) wird der Zeaxanthingehalt in Mais mit 370 $\mu\text{g}/100\text{g}$ Frischmasse angegeben.

2.3.1.8 Wirkungen auf die menschliche Gesundheit

Da der menschliche Organismus nicht in der Lage ist Carotinoide zu synthetisieren, müssen diese mit der Nahrung zugeführt werden.

Insgesamt sind in der Nahrungskette ca. 50 Carotinoide nachgewiesen worden, wovon sich jedoch nur 15 Carotinoide sowie 8 Metabolite in unterschiedlichen Organen des menschlichen Körpers wieder finden lassen. Die wichtigsten Speicherorte sind die Leber, das Fettgewebe, das Serum und, im Falle der Xanthophylle Lutein und Zeaxanthin, das Auge (HUMPHRIES ET AL., 2003).

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von klinischen und epidemiologischen Studien zu den gesundheitlich relevanten Eigenschaften der Carotinoide durchgeführt. Den Carotinoiden werden danach vielfältige Eigenschaften zugesprochen, die sich positiv auf die Gesundheit auswirken sollen. Dabei kann zwischen den antioxidativen Eigenschaften und der Provitamin-A Aktivität einiger Carotinoide unterschieden werden (HEINONEN ET AL., 1994; BROWN ET AL., 1999; KLIPSTEIN-GROBUSCH ET AL., 2000).

Tabelle 2-2: Antioxidative Eigenschaften der Carotinoide

Substanzen	Wirkungen	Quelle
Carotinoide	Wirkungen als Radikalfänger, Schutz der Zellen des Organismus vor dem Einfluss freier Radikale durch quenchen reaktiven Singulett-Sauerstoffs, Verminderung von oxidativem Stress	RICE-EVANS ET AL. (1997)
β -Carotin, Lycopin	Protektive Wirkungen gegenüber der Entwicklung von Arteriosklerose	KLIPSTEIN-GROBUSCH ET AL. (2000)
β -Carotin	Protektive Wirkungen gegenüber Herz-Kreislaufkrankungen	KLIPSTEIN-GROBUSCH ET AL. (2000)
Lutein und Zeaxanthin	Protektive Wirkungen im menschlichen Auge durch Hemmung der Lipid-Oxidation, Minderung von oxidativem Stress durch Desaktivierung freier Radikale	BROWN ET AL. (1963)
Carotinoide	Verhinderung photochemische Schäden durch Absorption energiereicher Wellenlängen im blauen Spektralbereich	SCHMIDT ET AL. (1987)

Tabelle 2-3: Antikancerogene Wirkungen der Carotinoide

Substanz	Wirkungen	Quelle
Lycopin	Verhinderung von Prostatakrebs	COHEN ET AL. (2000)
β -Carotin	Protektive Wirkung gegen die Entwicklung von Hautkrebs	COHEN ET AL. (2000)
Lutein	Protektive Wirkung gegenüber der Entstehung von Darmkrebs	SLATTERY ET AL. (2000)
Carotinoide	Hemmende Wirkung auf die Entstehung von Brust- und Lungenkrebs	ZHANG (1999)

Tabelle 2-4: Protektive Wirkung von Carotinoiden am Auge

Substanz	Wirkungen	Quelle
Lutein, Zeaxanthin	Positive Beeinflussung der Pathogenese von Katarakt und altersbedingter Makuladegeneration (AMD)	LIENAU (2003)
Lutein, Zeaxanthin	Erhöhung der Dichte an Makulapigmenten	MARES-PERLMAN ET AL. (2002)
Lutein	Inverse Korrelation zwischen dem erhöhten Konsum von Carotinoiden und dem Risiko, an Katarakt zu erkranken.	BROWN ET AL. (1999)

Derzeit sind ca. 50 Carotinoide bekannt, die im menschlichen Organismus Provitamin A-Aktivität besitzen, und somit im Organismus als Vorstufen der Vitamin-A (Retinol) Synthese dienen können. Retinol besitzt große Bedeutung für den Sehprozess sowie für das Wachstum und die normale Entwicklung des Menschen. Voraussetzung für diese Eigenschaft ist das Vorhandensein eines unsubstituierten β -Ionon-Ringes. Für β -Carotin, welches 2 β -Ionon-Ringe pro Molekül aufweist, kann daher die größte Provitamin A-Aktivität nachgewiesen werden. Aber auch für andere Carotinoide, wie beispielsweise α -Carotin und α -Cryptoxanthin, besitzen die Fähigkeit zur Bildung von Vitamin A (TANG ET AL., 1999).

Negative Wirkungen der Carotinoide

Die beschriebenen positiven Wirkungen der Carotinoide auf die menschliche Gesundheit werden auch kritisch betrachtet, da sich in einigen Studien herausstellte, dass Carotinoide auch schädliche Wirkungen besitzen können. Im Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Trial (ATBC) sowie im Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET) weisen Raucher und Asbest-Arbeiter, die eine Supplementierung mit β -Carotin erfahren hatten, eine signifikant höhere allgemeine Sterblichkeit und ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko gegenüber den Kontrollgruppen auf (HEINONEN ET AL., 1994; OMENN ET AL., 1996).

Als Grund für diese gesundheitsschädliche Wirkung wird eine mögliche pro-oxidative Wirkung von Carotinoiden angeführt, die bei Verabreichung von sehr hohen Dosen und in speziellen Risikogruppen entsteht. Daher wurden bisher durch die World Health Organisation (WHO) oder andere Institutionen keine Empfehlungen für die Supplementierung mit Carotinoiden ausgesprochen, bis konkrete Ergebnisse bezüglich der gesundheitsfördernden oder -schädigenden Wirkungen bei den verschiedenen Dosierungen vorliegen (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2000).

2.3.2 Polyphenole

Unter der Bezeichnung Polyphenole wird eine Klasse von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zusammengefasst, die als gemeinsames Merkmal einen oder mehrere phenolische Ringe aufweisen. Die Gruppe der Polyphenole besteht aus mehreren tausend (derzeit) bekannten Substanzen und ist im Pflanzenreich ubiquitär verbreitet. Die meisten phenolischen Komponenten leiten sich von der Aminosäure Phenylalanin her. Auch die Aminosäure Tyrosin wird als Vorläufer diskutiert. Viele der genauen Synthese- und Metabolisierungswege sind derzeit jedoch nicht vollständig geklärt (NIKFARDJAM, 2001).

Die wichtigsten Vertreter innerhalb der Polyphenole lassen sich in Gruppen mit unterschiedlich komplexen phenolischen Grundgerüsten aufteilen:

- Phenolcarbonsäuren und deren Derivate (Nichtflavonoide)
- Flavonoide
- Cumarine
- Stilbene

Zur besseren Strukturierung können auch diese Gruppen wiederum in Untergruppen eingeteilt werden.

Die Stilbene sind bislang nicht als Inhaltsstoffe von Möhren oder Weizen nachgewiesen worden und werden daher nicht näher beschrieben.

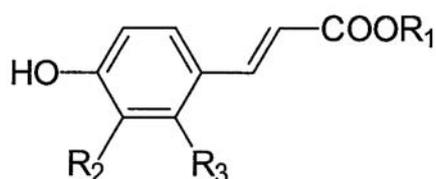
2.3.2.1 Phenolcarbonsäuren

Anhand der Unterscheidung des chemischen Grundgerüsts lassen sich aus der Gruppe der Phenolcarbonsäuren zwei Untergruppen bilden – die Hydroxymtsäuren und die Hydroxybenzoesäuren. Dieses Grundgerüst ist bei den Hydroxymtsäuren ein C₆-C₃-Körper und bei den Hydroxybenzoesäuren ein C₆-C₁-Körper.

Hydroxymtsäuren

In den Pflanzen kann die acide Carboxylgruppe der Hydroxymtsäuren mit Alkoholen, Aminen, Kohlenhydraten oder anderen Phenolen umgesetzt werden. Dadurch werden

eine bessere Wasserlöslichkeit und eine bessere Transportfähigkeit erreicht. Die gebundenen Säuren sind in pflanzlichem Gewebe in höheren Anteilen enthalten als die freien Säuren. Die Spaltung der Bindung erfolgt meist durch enzymatische oder andere hydrolytische Prozesse bei Beschädigung der intakten Struktur der Pflanze. Die phenolischen Säuren lassen sich in der cis- und auch der trans-Form in den Pflanzen nachweisen, wobei die trans-Form überwiegt. Unter dem Einfluss von UV-Licht kann jedoch auch eine Isomerisierung zur cis-Form begünstigt werden (JEANDET ET AL., 1995). Neue phenolische Substanzen können durch Esterbindungen zwischen den Hydroxycimtsäuren und Hydroxycarbonsäuren entstehen. Seltener werden in Pflanzen glykosidische Bindungen angetroffen (NIKFARDJAM, 2001).

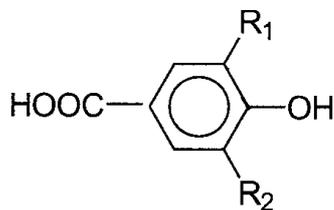


R ₁	R ₂	R ₃	Name
H	H	H	p-Cumarsäure
H	OH	H	Kaffeesäure
H	OCH ₃	H	Ferulasäure

Abbildung 2-5: Strukturen häufiger Hydroxycimtsäuren, nach FEUCHT ET AL. (1989).

Hydroxybenzoesäuren

Im Gegensatz zu den Hydroxycimtsäuren liegen die Hydroxybenzoesäuren in der Regel als freie Säuren vor. Die Konzentrationen der Hydroxybenzoesäuren in Pflanzen liegen in einem Konzentrationsbereich < 1 mg/kg Frischmasse, einzig für die Salicylsäure werden in Weintrauben Gehalte von bis zu 21 mg/kg Frischmasse beschrieben (NIKFARDJAM, 2001). Salicylsäure wird durch die Abspaltung eines C₂-Fragmentes aus den Phenylpropanen (2-Hydroxybenzoesäure) gebildet. Ein Anstieg dieser Substanz findet sich in Pflanzen nach Infektionen oder nach UV-Bestrahlung. Wahrscheinlich wird dadurch die Biosynthese von Abwehrstoffen induziert (HELDT, 1996).



R ₁	R ₂	Name
H	H	p-Hydroxybenzoesäure
OH	H	Protocatechusäure
OCH ₃	H	Vanillinsäure
OH	OH	Gallussäure

Abbildung 2-6: Strukturen häufiger Hydroxybenzoesäuren, nach FEUCHT ET AL. (1989).

2.3.2.2 Flavonoide

Die weitaus größte Gruppe in der Klasse der Polyphenole bilden mit über 4000 verschiedenen, isolierten und charakterisierten Substanzen die Flavonoide.

Sie alle leiten sich strukturell vom Flavan (2-Phenyl-benzo-dihydropyran) ab. Bedingt durch die große Anzahl der Verbindungen wird innerhalb dieser Gruppe weiter unterschieden. Wichtige Vertreter dieser Klasse, die häufig in Obst und Gemüse angetroffen werden und zu deren Farbe und Geschmack beitragen sind:

Anthocyanidine

Die Anthocyanidine zeichnen sich durch ihre rote, violette oder blaue Färbung aus, die vom vorherrschenden pH-Wert abhängig ist (BELITZ ET AL., 1992). Sie kommen in Pflanzen nur in ihrer glykosidisch gebunden Form vor und werden in dieser Form als Anthocyane bezeichnet. Im Pflanzenreich spielen die Anthocyane eine wichtige Rolle bei der Blütenfärbung (MAZZA ET AL., 1993).

Flavan-3-ole

Substanzen dieser Gruppe der Phenole sind Bestandteile von Pflanzen und Früchten. Die wichtigsten monomeren Vertreter dieser Gruppe sind das Diastereomerenpaar (+)-Catechin und (-)-Epicatechin. Weniger häufig sind ihre Gallussäureester bzw. (+)-Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin, welche charakteristische Polyphenole des grünen und des schwarzen Tees sind (POON, 1998). Durch chemische und enzymatische Kondensation entstehen polymere Strukturen der Flavan-3-ole, die Proanthocyanidine. Während Strukturen mit geringer Kettenlänge farblos sind, kann sich ihre Farbe mit zunehmender Kettenlänge über eine gelbe bis hin zu einer braunen Farbe ändern (LEA ET AL., 1978). Die chemischen Vorstufen der Anthocyane, die Flavan-3,4-diole, werden als Leucoanthocyanidine bezeichnet (LEA, 1979).

Proanthocyanidine

Diese Stoffe sind die Dimere, Oligomere oder Polymere der Flavan-3-ole, die durch enzymatische oder chemische Kondensation entstehen. Sie tragen zum adstringierenden Geschmack vieler Früchte bei, bei geringerem Polymerisationsgrad haben sie einen bitteren Geschmack. Die Farbe der Proanthocyanidine reicht in Abhängigkeit der Komplexität der Struktur von farblos über gelb bis zu einer braunen Farbe (RICHTER, 1996).

Flavone und Flavonole

Flavone und Flavonole kommen in Pflanzen meist in Form ihrer Glykoside, seltener frei als gelbe Farbstoffe vor. Die für pharmazeutische Zwecke bedeutendsten Flavone, die als Spasmolytikum bzw. Antihämorrhagikum eingesetzt werden, sind 5,7,4'-Trihydroxyflavon (Apigenin) und 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavon (Luteolin). Unter den Flavonoiden ist die Gruppe der Flavonole die größte und auch die verbreitetste. Wichtige Vertreter sind Kämpferol, Quercetin, Myricetin und Isorhamnetin (FEUCHT ET AL, 1989).

2.3.2.3 Cumarine

Die Ausgangsverbindung dieser Gruppe von phenolischen Verbindungen ist das Cumarin. Die Synthese der Cumarine geht von der trans-Zimtsäure aus, welche durch Hydroxylierung in trans-2-Cumarsäure überführt und intermediär mit β -Glucose verestert wird. In einer photochemisch unterstützten Reaktion lagert sich dieses Glucosid von trans nach cis um. Aus dieser gebundenen Form kann freies Cumarin freigesetzt werden, wenn die Struktur der Pflanze verletzt wird. Die Bildung weiterer Vertreter der Familie der Cumarine geht von der 4-Cumarsäure aus. Entsprechend den Substituierungen am aromatischen Ring können so verschiedene Verbindungen entstehen. So stellt Umbelliferon die Monohydratverbindung, Äsculetin die Dihydroxy-Verbindung dar (RICHTER, 1996).

2.3.2.4 Biosynthese der Polyphenole

Während die Grundbausteine der Polyphenolsynthese aus dem Kohlenhydrat-Stoffwechsel stammen, kann die Biosynthese des aromatischen Anteils in drei Teilbereiche unterteilt werden.

1. Im so genannten Shikimisäure-Bereich werden die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan synthetisiert.
2. Im Phenylpropanoid-Bereich werden die Hydroxyzimtsäure-Derivate sowie Vorstufen der Flavonoide und des Lignins synthetisiert.
3. Im Flavonoid-Bereich läuft die Synthese der Flavonoide ab.

Die Biosynthese der Polyphenole ist in Abbildung 2-7 schematisch dargestellt.

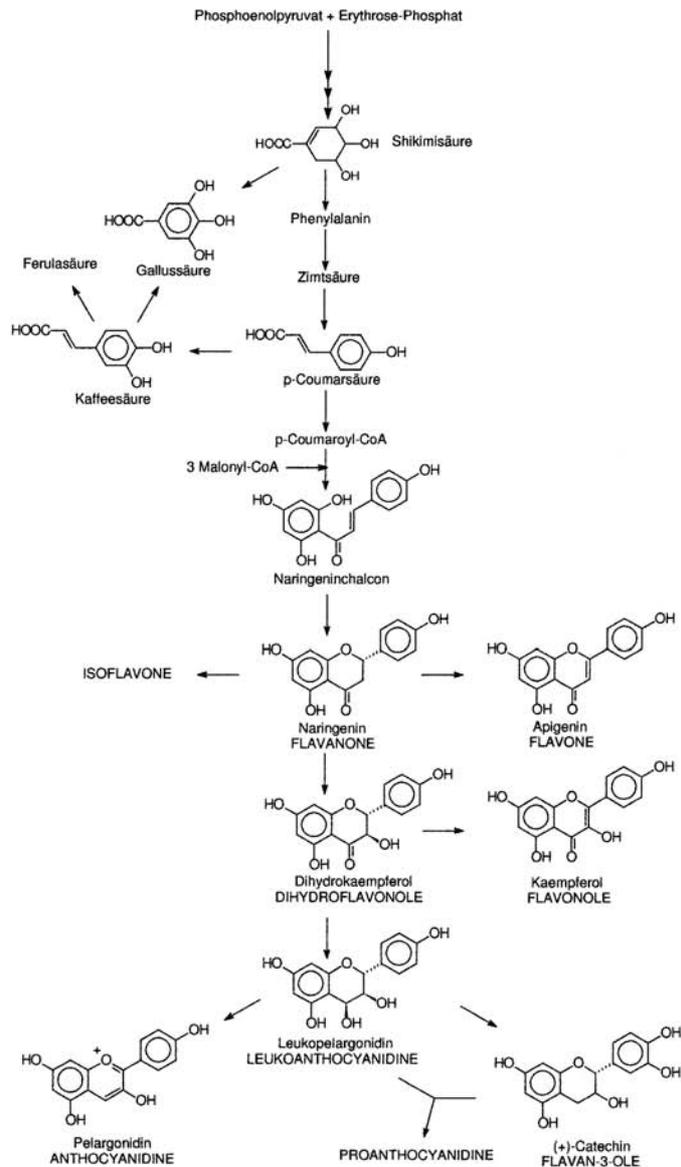


Abbildung 2-7: Schematische Darstellung der Polyphenolsynthese in Pflanzen (aus RECHNER, 2001).

2.3.2.5 Bedeutung für den pflanzlichen Organismus

Entsprechend der großen strukturellen Vielfalt haben die Polyphenole ein breites Wirkungsspektrum für den pflanzlichen Organismus selbst. In der Form von farbigen Pig-

menten, wie beispielsweise den Anthocyanen tragen sie zu einer Attraktivitätssteigerung gegenüber bestäubenden Insekten bei. Eine weitere Funktion wird in der Abwehr von Fraßfeinden durch die Bildung verholzender Strukturen, wie dem Lignin gesehen. Abwehreffekte ergeben sich darüber hinaus auch durch Bitterstoffe, bakterizide und toxische Prinzipien. Neben der Abwehr von Pathogenen erfüllen die Polyphenole aber auch Aufgaben in der Abwehr gegenüber Konkurrenten am Standort. In diesem Zusammenhang sind die Beeinflussung der Chlorophyllsynthese, die Beeinflussung des Membranpotenzials und die Hemmung des Wurzelwachstums von Konkurrenten am Standort zu nennen. Im pflanzlichen Metabolismus haben sie die Aufgabe von Mediatoren im Hormonhaushalt und die des Schutzes von Chlorophyll gegenüber UV-Strahlung (FEUCHT ET AL., 1989).

2.3.2.6 Einflüsse auf den Gehalt phenolischer Substanzen in Pflanzen und pflanzlichen Lebensmitteln

Der Polyphenolgehalt einer Pflanze bzw. eines pflanzlichen Lebensmittels ist keine definierte Größe. Bedingt durch die Vielzahl verschiedener Substanzen mit unterschiedlichen Funktionen und eine Reihe von Reaktionswegen, wird der Phenolstoffwechsel praktisch durch jede Größe, die das Pflanzenwachstum beeinflusst, verändert. Dabei spielen sowohl endogene Faktoren wie Sorte oder Pflanzenalter als auch exogene Faktoren eine wichtige Rolle.

Zwischen verschiedenen Pflanzen bestehen deutliche Unterschiede im Gehalt an Polyphenolen, die sich nach der Funktion dieser Substanzen in der Pflanze richten. Während beispielsweise die Flavonoide weit verbreitete Polyphenole in Äpfeln sind (RECHNER, 2001), werden in Möhren und Weizen die phenolischen Säuren als Hauptkomponenten aus der Klasse der phenolischen Verbindungen beschrieben (TALCOTT ET AL., 1999; ALASALVAR ET AL., 2001). Aber auch innerhalb einer Art können signifikante Sortenunterschiede bestehen. Von ZHOU ET AL. (2004) werden signifikante quantitative Unterschiede im Gehalt phenolischer Säuren in 7 Weizensorten gefunden. Daneben bestehen auch qualitative Unterschiede in der Zusammensetzung der phenolischen Bestandteile innerhalb einer Art. Beim Vergleich von Möhren werden von KAMMERER ET

AL. (2004) in schwarzen Möhren der Subspezies *Daucus carota* ssp. *sativus atrorubens* var. *Atrorubens* Alef die 4'-caffeoyle-Chinasäure beschrieben, die in orangen Möhren bislang nicht nachgewiesen wurde. Der Gehalt der phenolischen Bestandteile ist darüber hinaus vom verwendeten Pflanzenteil abhängig. Sowohl für Möhren als auch für Weizen besteht eine inhomogene Verteilung der phenolischen Säuren. Im Weizen und in anderen Getreidearten finden sich diese Substanzen fast ausschließlich in der Kleie und im Keim (ZIELINSKI ET AL. 2000; ADOM ET AL., 2005). Zusätzlich enthalten die Wurzeln von Weizenkeimlingen höhere Konzentrationen phenolischer Säuren als die Sprossachse (WU ET AL., 2000). Eine ungleiche räumliche Verteilung der Phenole wird von TALCOTT ET AL. (2000) auch in Möhren beschrieben. Im Vergleich von Möhren, die mit bzw. ohne Schale verarbeitet worden waren, enthalten Proben mit Schale höhere Konzentrationen phenolischer Säuren.

Modifikationen im Phenolstoffwechsel können zusätzlich durch Stressfaktoren ausgelöst werden. Veränderungen in der Zusammensetzung des Phenolspektrums von Möhren werden von TALCOTT ET AL. (1999) nach Hagelschäden beschrieben. Wasserstress führt in einer Studie von ROBBINS ET AL. (2005) zu einer verminderten Produktion von Phenolen.

Neben dem Einfluss der aufgeführten endogenen Faktoren auf den Phenolstoffwechsel spielen zusätzlich noch exogene Faktoren wie Nährstoffversorgung, Standort, Anbau-techniken und auch Nachernteverfahren wie Lagerung und Verarbeitung eine Rolle.

Bei der Nährstoffversorgung hat bezüglich des Phenolgehaltes besonders das Element Stickstoff eine bedeutende Rolle (FEUCHT ET AL., 1989). Ein Zusammenhang zwischen dem Phenolstoffwechsel und dem konkurrierenden Stickstoff-Stoffwechsel wird bereits 1977 von MARGNA angenommen. Mit einer Erhöhung der Stickstoffversorgung soll es demnach zu einer Bevorzugung des Primärstoffwechsels gegenüber dem energieaufwendigeren Sekundärstoffwechsel kommen. Dieses wird von RÜHMANN ET AL. (2002) für Äpfel bestätigt. Stark wachsende Apfelbäume weisen danach einen niedrigeren Phenolgehalt auf als schwächer wachsende Bäume. Standortfaktoren werden als Einflussgrößen auf die Phenolzusammensetzung verschiedener Weizensorten von MPOFU ET AL. (2006) und YU ET AL. (2003) beschrieben. Nach MPOFU haben die Standortfaktoren Wasserversorgung und Sonneneinstrahlung einen stärkeren Einfluss auf die Phenolsyn-

these als die Sortenwahl. Sowohl die Schnittstelle zwischen dem Primär- und dem Sekundärstoffwechsel, das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (CHAPPELL ET AL., 1984) als auch die Anthocyanidinsynthese sind vom Faktor Licht beeinflussbar (DRUMM-HERREL, 1987). Der Einfluss der Wasserversorgung auf den Phenolstoffwechsel wird bei FEUCHT ET AL. (1989) beschrieben.

Nachdem Umwelteinflüsse den Phenolstoffwechsel beeinflussen können, wurde der Einfluss des ökologischen Anbaus auf die Pflanzen untersucht. Die Ergebnisse fallen für verschiedene Pflanzen jeweils unterschiedlich aus, tendenziell haben die Produkte aus ökologischem Anbau einen höheren Polyphenolgehalt.

Die Abhängigkeit der gemessenen Ergebnisse von der angewandten Methode und der Messgröße wird in einer vergleichenden Studie zu ökologisch und konventionell angebauten Kohllarten (*Brassica oleracea rapa chinensis* = Pak Choi, *Brassica oleracea acephalo*) deutlich (YOUNG ET AL., 2005). Während mit Messungen mittels HPLC-Analytik keine signifikanten Unterschiede gefunden werden, ergeben photometrische Messung des Gesamtphenolgehaltes an den gleichen Proben mit Folin-Ciocalteu Phenolreagenz einen signifikant höheren Gesamtphenolgehalt der ökologisch erzeugten Pak Choi Proben. Der Gesamtphenolgehalt ökologisch erzeugter Maisproben liegt in einer Studie von ASAMI ET AL. (2003) höher als der in konventionell erzeugten. An dieser Stelle wird zusätzlich auch der Einfluss einiger Nachernteverfahren untersucht. In Mais, Erdbeeren und Brombeeren (*Rubus ursinus*) werden die phenolischen Komponenten durch die Gefriertrocknung besser erhalten als die herkömmliche Lufttrocknung. Ebenso wird bei SAMARAS (2005) eine Abnahme von Catechin und Ferulasäure in Abhängigkeit von der Hitzeeinwirkung während der Verarbeitung von Malz beschrieben.

Die Polyphenole gehören zu den reaktivsten Inhaltsstoffen der Pflanzen. Als Reaktionspartner kommen dabei Substrate aus dem Primärstoffwechsel, wie Proteine und Kohlenhydrate und auch Vertreter der eigenen Stoffklasse in Frage. Schon im Laufe der Verarbeitung oder während der Aufbereitung von Proben für die Analyse von Früchten und Gemüse werden durch die Zerstörung der Zellstruktur enzymatische und nicht-enzymatische Prozesse in Gang gesetzt, die zumeist hydrolytischer bzw. oxidativer Natur sind. Während die hydrolytischen Prozesse zu einer Freisetzung der freien Phenole aus den korrespondierenden Glykosiden führen, werden in den oxidativen Prozessen aus

den Phenolen die Chinone gebildet. Durch diese Substanzen, die wiederum reaktive Zwischenstufen im Verarbeitungs- bzw. Analysenprozess darstellen, werden sowohl Farbe als auch Geschmack, Stabilität und chemische Zusammensetzung des Endproduktes bzw. der Probe entscheidend geprägt. Aufgrund solcher Eigenschaften ist es, um eine Vergleichbarkeit von analysierten Proben zu gewährleisten, von besonderer Bedeutung, die Probenaufbereitung möglichst schonend und für alle Proben in gleicher Art durchzuführen.

2.3.2.7 Polyphenole in Möhren

Den größten Anteil an den phenolischen Komponenten in Möhren machen die Phenolsäuren aus (BABIC, 1993; DONGLIN ZHANG, 2004; HABEGGER, 2005). Bei diesen Verbindungen handelt es sich jedoch um Substanzen, die ubiquitär in Gemüse und Obst anzutreffen sind und keineswegs charakteristisch für Möhren sind.

Schon von SARKAR ET AL. (1979) wird beschrieben, dass der Polyphenolgehalt in Möhren unter dem Einfluss von Ethylen während der Lagerung um das 7-fache ansteigt und die Bräunungsreaktionen der Oberfläche mit verschiedenen phenolischen Inhaltsstoffen assoziiert ist. An dieser Stelle werden in orangen Möhrensorten die Substanzen Kaffeesäure, Chlorogensäure und Isochlorogensäure sowie vier weitere nicht identifizierte Phenole nachgewiesen.

Sortenabhängige Unterschiede des Chlorogensäuregehaltes werden von COLE (1985) beschrieben. Dabei wird der Einfluss auf das Resistenzverhalten von Möhrensorten mit unterschiedlichem Chlorogensäuregehalt gegenüber der Möhrenfliege (*Psila rosae*) untersucht. Möhrensorten mit hohem Chlorogensäuregehalt werden nach den Ergebnissen dieser Untersuchung von der Möhrenfliege bevorzugt.

Sortenabhängige Unterschiede im Gehalt der phenolischen Säuren Chlorogensäure, Kaffeesäure, p-Hydroxybenzoesäure, Ferulasäure, Vanillinsäure und p-Cumarsäure sowie eine ungleichmäßige Verteilung dieser Stoffe in Möhren werden auch von OLSSON ET AL. (1996) ermittelt. Die Gehalte nehmen von der Wurzeloberfläche nach innen ab. Der Chlorogensäuregehalt der Haut (Periderm und pericyklisches Parenchym) ist dem-

nach ungefähr sechsmal höher als der Gehalt 1 mm unterhalb der Haut und ungefähr 60-mal höher als der des dahinter liegenden Gewebes (Phloem).

Die phenolischen Inhaltsstoffe von Möhren werden detaillierter in einer Studie von ALASALVAR ET AL. (2001) in Bezug zu den geschmacklichen Eigenschaften gesetzt. Dafür wurden vier verschiedenfarbige Möhrensorten analytisch mit der HPLC untersucht. Hinsichtlich der Polyphenole wird in allen Sorten die Chlorogensäure als vorherrschender phenolischer Bestandteil beschrieben, wobei jedoch Unterschiede in der Konzentration zwischen den einzelnen Sorten nachgewiesen werden. Die Identifizierung und die Quantifizierung der einzelnen Stoffe erfolgt bei Einsatz eines Dioden-Array-Detektors, durch den Vergleich der Retentionszeiten und den Vergleich der UV-Spektren mit Standardsubstanzen. Zusätzlich werden Co-Chromatographien mit Standardsubstanzen angewendet. In rohen Möhren aller Sorten werden hauptsächlich Hydroxyzimtsäuren und deren Derivate identifiziert. Im einzelnen handelt es sich um die Substanzen 3'-caffeoyl-Chinasäure, *cis*-3'-caffeoyl-Chinasäure (Neochlorogensäure), 5'-caffeoyl-Chinasäure (Chlorogensäure), Kaffeesäure, 3'-*p*- coumaroyl-Chinasäure, 3'- feruloyl-Chinasäure, 3',4'-dicaffeoyl-Chinasäure, 5'-feruloyl-Chinasäure, *cis*-5'-caffeoyl-Chinasäure, 5'-*p*-coumaroyl-Chinasäure, 4'-feruloyl-Chinasäure, 3',5'-dicaffeoyl-Chinasäure, 3',4'- diferuloyl-Chinasäure und 3',5'- diferuloyl-Chinasäure. Jedoch werden nicht alle Substanzen in allen Möhrensorten gleichermaßen gefunden. Bis auf die Chlorogensäure, 3',4'- diferuloyl-Chinasäure und 3',5'-diferuloyl-Chinasäure liegen in den orangen Möhrensorten dieser Studie alle Substanzen nur in Konzentrationen < 1mg/100g FM vor. Von den Autoren wird weiterhin eine Veränderung des Phenolgehaltes im Verlauf der Lagerung beschrieben.

Sortenunterschiede im Gehalt und in der Zusammensetzung der phenolischen Bestandteile, namentlich der *p*-Hydroxybenzoesäure, der Vanillinsäure, der Kaffeesäure, der Chlorogensäure und der Syringasäure von Möhren werden auch in einer Arbeit von TALCOTT ET AL. (1999) beschrieben. Zusätzlich wird an dieser Stelle auf den Einfluss von Stressfaktoren auf die Pflanzen in der Vorerntezeit hingewiesen, der sich in einer verstärkten Synthese bitter schmeckender phenolischer Verbindungen auswirken soll.

Als ein Vertreter der Familie der Flavonoide wird von BÖHM ET AL. (1996) das Flavon Luteolin-7-*o*-Glucosid in Möhren genannt.

Mit Papierchromatographie können in den Blättern von *Daucus carota* L. ssp. sativa die Flavonoide Luteolin-7- β -D-Glucosid, Luteolin-4'- β -D-Glucosid, Luteolin-7 β -D-Glucuronid, Apigenin 7- β -D-Glucosid, Apigenin 7- β -D-Glucosid, Apigenin 7-Rutinosid und Luteolin 7- Rutinosid dargestellt werden (TEUBERT ET AL., 1977).

2.3.2.8 Wirkungen auf die menschliche Gesundheit

Auch wenn die Polyphenole nicht als essentielle Nahrungsbestandteile gelten, gibt es nach neueren Forschungen Erkenntnisse über ihre positiven Wirkungen auf die menschliche Gesundheit. Seit einigen Jahren gibt es in der wissenschaftlichen Literatur vermehrt Veröffentlichungen, die sich mit positiven physiologischen Wirkungen von Polyphenolen befassen.

Tabelle 2-5: Antikarzinogene Wirkungen von Polyphenolen

Substanzen	Wirkungen	Quelle
Flavonoide und Hydroxyzimtsäuren (p-Cumarsäure)	Hemmung des Tumorwachstums und der Metastasenbildung	HERRMANN, (1999)
Chlorogensäure, Catechine	Hemmung der Bildung mutagener Nitrosierungsprodukte	HERRMANN, (1990).
Epigallocatechingallat, Quercetin	Hemmung der Bildung von Hauttumoren	RANDALL ET AL., (1989) WANG ET AL., (1989) AGARWAL ET AL., (1991) WANG ET AL., (1992)
Epigallocatechingallat, Quercetin	Hemmung der Bildung von Tumoren in Lunge, Vormagen, Dünndarm, Speiseröhre und Leber	WANG, (1992)
Catechine und andere Inhaltsstoffe aus grünem Tee und dessen Extrakten	Allgemeine antikarzinogene Wirkung	ENGELHARDT, (1992); GALENSA ET AL., (1995A, B); SCHLESIER ET AL., 2001).
Flavonoide, Hydroxyzimtsäure, Chlorogensäure, Kaffeesäure und Ferulasäure	Blockieren der Bildung stark karzinogener Nitrosamine	NEWMARK (1992)

Zusammengefasst bestehen die gesundheitsfördernden Aspekte der phenolischen Verbindungen in antikanzerogenen (Tabelle 2-5), antioxidativen (Tabelle 2-6) und anti-

mikrobiellen Wirkungen (Tabelle 2-7). Seltener werden antithrombotische, immunmodulierende, entzündungshemmende und blutdrucksteuernde Wirkungen beschrieben (Tabelle 2-8). Darüber hinaus besitzen die Catechine noch eine entzündungshemmende Wirkung und scheinen eine Schutzwirkung auf Collagen und andere Bindegewebsproteine auszuüben (HERRMANN, 1990).

Tabelle 2-6: Antioxidative Wirkungen der Polyphenole

Substanzen	Wirkungen	Quelle
Catechin > Cyanidin > Kaffeesäure > p-Cumarsäure > Ferulasäure > Chlorogensäure > Quercetin > Ellagsäure	Allgemeine antioxidative Wirkung	MEYER ET AL. (1998 A, B)
Flavonoide, Cumarin- und Zimtsäureverbindungen	Allgemeine antioxidative Aktivität	FOTI (1996)
Catechin < Quercetin < Rutin < Kämpferol	Antioxidative Wirkung	TOREL ET AL., (1986)
Gallussäure, Ferulasäure, Rutin	Antioxidative Eigenschaften Quencher radikalischer Reaktionsketten.	WALTERS ET AL., (1996); TAKAHASHI ET AL., (1999)
Phenolische Säuren und deren Ester	Allgemeine antioxidative Eigenschaften	CHEN ET AL. (1997); TAGASHIRA ET AL. (1998)

Tabelle 2-7: Antimikrobielle Wirkungen von Polyphenolen (nach TSCHONE, 2001)

Substanzen	Wirkung auf
Anthocyanine, Leucoanthocyanine Phenolische Säuren	Allgemeine Hemmung der Atmung und Vermehrung von Bakterien
Salicylsäure	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas ovalis</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Kaffeesäure, Catechin, Protocatechusäure	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus lutea</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Aspergillus niger</i>
Sinapinsäure	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella enteritidis</i>
4-Hydroxybenzoesäure, trans-4- Hydroxyzimtsäure	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Lactobacillus planterum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Saccharomyces ce-</i>

	<i>revisiae, Candida albicans, Pseudomonas syringae, Erwinia carovora ssp. carotovora, Xanthomonas campestri</i>
Vanillinsäure 4-Hydroxybenzoesäure	<i>Cladosporium herbarum</i>
Umbelliferon und Scopoletin	<i>Candida albicans, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Geotrichum candidum, Trichophyton rubrum, Epidermophyton floccosum.</i>
Umbelliferon	<i>Candida tropicalis, Aspergillus flavus</i>
Salicylsäure	<i>Helicobacter pylori</i>

Tabelle 2-8: Sonstige Wirkungen auf die menschliche Gesundheit

Substanzen	Wirkungen	QUELLE
Flavonolglykosid	Positiver Einfluss auf koronare Herzerkrankungen, Auswirkungen auf die Leberfunktionen	GÜNZLER ET AL., (1997)
Salicylsäure	Therapeutische Anwendung als Analgetikum, Antipyretikum, Antiphlogistikum sowie äußerlich als dermatologisches Antiseptikum und Keratolytikum	BHALLA ET AL., (1994); BOSS ET AL., (1994)
Scopoletin, Aesculin	Entzündungshemmende, harntreibende und krampflösende Eigenschaften	TSUKAMOTO ET AL., (1985); BERGENDORFF ET AL., (1995)
Umbelliferon	Spasmolytische Eigenschaften	BERGENDORFF ET AL., (1995)
Kaffeensäure, Umbelliferon	Analgetische und antipyretische Eigenschaften	CHEN, (1994)
Gallussäure, Ellagsäure, p-Hydroxybenzoesäure, Aesculin, Vanillinsäure, Protocatechualdehyde, Kämpferol, Quercetin, 4-Hydroxicumarin, Umbelliferon	Antimutagene Eigenschaften	KURODA ET AL., (1986); EDENHARDER ET AL., (1997)
Aesculin	Enzymhemmende Aktivität auf Laktatdehydrogenase, Alanintransaminase und Xanthinoxidase	LIN ET AL., (2000)
Chlorogensäure	Hemmung von Trypsin, Chymotrypsin und Carboxypeptidase	DAO ET AL., (1994)
Chlorogensäure	Hemmwirkung auf die Entstehung von Sauerstoffperoxid	PAYÁ ET AL., (1993)

2.3.3 Analytik sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe - Stand der Methoden

Es gibt bisher keine etablierten und validierten HPLC-Methoden zur Klassifizierung ökologisch erzeugter Lebensmittel anhand des Polyphenol- bzw. Carotinoidspektrums. Zur Analytik der Polyphenole wird in der Regel ihre Fähigkeit zur Lichtabsorption genutzt. Das Absorptionsmaximum der Phenole hängt dabei von ihrer Struktur ab (MABRY ET AL., 1970). Die Größe und die Komplexität des Moleküls entscheiden darüber, ob ein Phenol farbig erscheint oder lediglich UV-Licht absorbiert. Diese UV-Absorption (zwischen 220 und 300 nm) ist allen Phenolen gemeinsam. Für den Nachweis von Polyphenolen in Pflanzenproben werden photometrische Methoden sowie Papier- oder Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Gelegentlich wurde auch die Gaschromatographie für die Trennung von Phenolen verwendet. Dies setzt jedoch eine Derivatisierung von nicht flüchtigen Polyphenolen voraus. Ein direkter Nachweis von Polyphenolen, das heißt ohne vorherige Derivatisierung, kann mittels der reversed-phase-HPLC geführt werden. Zur Detektion werden meistens Spektralphotometer verwendet, deren Wellenlänge frei wählbar ist. Durch die Wahl einer bestimmten Wellenlänge können einzelne Klassen von Polyphenolen selektiv detektiert werden. Dioden-Array-Detektoren (DAD) sind in der Lage, gleichzeitig die Lichtabsorption mehrerer Wellenlängen zu messen. Mit einem DAD ist es somit möglich, während einer Analyse die Absorptionsspektren aller Peaks zu messen und damit Hinweise auf die Identität einzelner Substanzen zu erhalten. HPLC-Methoden sind in der Literatur (RECHNER, 2001; TCHONÉ, 2002; TREUTTER, 1988) für die Analytik des Polyphenolspektrums in unbekanntem Proben beschrieben. Neben der Bestimmung der Polyphenole mit der HPLC und der Trennung einer Probe in die einzelnen Bestandteile kann der Gesamtphenolgehalt als Summenparameter bestimmt werden. Das Prinzip der Methode beruht auf der Reduktionskraft phenolischer Verbindungen. Leicht oxidierbare Verbindungen wie die Polyphenole können im alkalischen Milieu aus Wolframat- und Molybdat-Ionen und Phosphorsäure gebildete Komplexe zu blauen Farbpigmenten reduzieren. Die Konzentration der gebildeten Färbung wird photometrisch bestimmt (SINGLETON ET AL., 1965).

Die einfachste Methode der Messung von Carotinoiden in Lösungen ist die photometrische Bestimmung. Bei Carotinoid-Lösungen, die verschiedene nicht identifizierte Carotinoide in unbekannter Konzentration enthalten, kann die photometrische Bestimmung mangels adäquater Absorptionskoeffizienten jedoch nicht genau erfolgen. Konventionsgemäß kann die photometrische Bestimmung am Absorptionsmaximum unter Verwendung der Absorptionskoeffizienten von β -Carotin erfolgen und die Gesamtkonzentration bzw. der Gesamtgehalt als β -Carotin-Äquivalente angegeben werden. Eine solche photometrische Bestimmung stellt jedoch nur einen Schätzwert der Gesamtkonzentration an Carotinoiden einer Lösung dar. Eine spezifischere Trennungsmethode für Carotinoide besteht in der Dünnschichtchromatographie (STEINEGGER ET AL., 1992). Zu weiteren Fortschritten in der Analytik von Carotinoiden hat die Entwicklung von HPLC-Methoden beigetragen. Dabei wird zwischen isokratischen Trennungen und Trennungen im Gradientenbetrieb sowohl in der reversed-phase als auch der normal-phase HPLC unterschieden (NELLS ET AL., 1983; KHACHIK ET AL., 1986; CRAFT ET AL., 1992). Aufgrund der Tatsache, dass Carotinoide leicht oxidiert werden, erweist es sich als nützlich, der mobilen Phase Antioxidantien wie Butyl-Hydroxy-Toluol (BHT) zuzusetzen und die Säulentemperatur konstant niedrig zu halten (SCOTT ET AL., 1993; HART ET AL., 1995). Die Kopplung an einen DAD gewährleistet eine fortlaufende Sammlung von spektrophotometrischen Daten während der gesamten Analyse (NG ET AL., 1988) und kann so zur Identifizierung einzelner Komponenten beitragen. Jedoch ist die Komplexität von Pflanzen- und Lebensmittelextrakten, in denen Carotinoide gefunden wurden, ziemlich hoch. Deshalb wurden Methoden zur HPLC-MS Kopplung mit „atmospheric pressure ionisation Interface“ (APCI) oder „electrospray ionisation“ Schnittstellen (ESI) (VAN BREEMEN, 1995; VAN BREEMEN ET AL, 1996; RENTEL ET AL., 1998) zur genaueren Identifizierung einzelner Carotinoide und deren Isomeren entwickelt. Darüber hinaus wird die MS als Möglichkeit beschrieben, Fragmentationen von struktureller Relevanz zu erhalten, die als ein zusätzlicher „Fingerabdruck“ für das Identifizieren von Carotinoiden in hoch komplexen Mischungen (VAN BREEMEN ET AL., 1996) verwendet werden können. Diese Methoden sind im Vergleich mit reinen HPLC-Methoden mit einem erheblich höheren apparativen Aufwand im Labor verbunden.

Für die Analytik von Proben nicht bekannter Zusammensetzung und zur Ermittlung des Carotinoidmusters sind für Möhren (KAH ET AL., 1992; HART ET AL., 1995; RAUSCHER ET AL., 1998; HUCK ET AL., 2000; SCHMITT ET AL., 2002) und Weizen (HENTSCHEL ET AL., 2002) verschiedene HPLC-Methoden beschrieben. Die Auftrennung und Quantifizierung von Carotinoiden mit Hilfe der HPLC erfolgt bei Verwendung geeigneter Trennsysteme und Detektoren präzise und wird im Kapitel 4 beschrieben.

3 Material und Methoden

Die Fragestellung der vorliegenden Untersuchungen besteht darin zu prüfen, ob es möglich ist, Möhren (*Daucus carota* L.), Mais (*Zea mays*) und Weizen (*Triticum aestivum* L.) aus jeweils unterschiedlichen Anbausystemen auf der Basis der Profile bestimmter sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe zu differenzieren und messbare Unterschiede im Gehalt der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe mit einem bestimmten Anbausystem in Verbindung zu setzen. Als Untersuchungsparameter dienen die Stoffklassen der Polyphenole und der Carotinoide.

Die Messungen des Polyphenol- und des Carotinoidgehaltes sowie die Messung der Summenparameter wurden innerhalb der Projekte „Validierung ganzheitlicher Verfahren“ (Bundesprogramm Ökolandbau des BMVEL 020E170) sowie „Differenzierung und Klassifizierung von Öko-Produkten mittels validierter, analytischer und ganzheitlicher Methoden“ (Bundesprogramm Ökolandbau, Projekt 020E170/F) durchgeführt. Weizen, Mais und Möhren standen aus diesen Projekten als Probenmaterial zur Verfügung.

Als Grundvoraussetzung für einen validen Probenvergleich wurden die Messungen als Blindmessungen an codierten Proben vorgenommen. Eine Decodierung des Probenmaterials fand erst nach Abschluss der Messungen innerhalb der genannten Projekte statt. Listen der verwendeten Geräte, Materialien und Chemikalien finden sich im Anhang.

3.1 Weizenproben

3.1.1 Probenmaterial

Die Untersuchungen der Carotinoide mit Messungen mittels HPLC-Analytik und als Summenparameter wurden, wie auch die Untersuchungen der Möhrenproben, innerhalb der oben genannten Projekte durchgeführt. Weizenproben standen aus diesen Projekten zum einen aus einem Anbauversuch (DOK-Versuch) und zum anderen als Erzeugerproben zur Verfügung. Für die Bestimmung des Carotinoidgehaltes und für photometrische Messungen der Gelbpigmente standen aus diesem Versuch Proben für das Jahr 2004 zur Verfügung.

3.1.1.1 Probenmaterial aus dem DOK-Versuch

Die Weizenproben stammen aus dem seit 1977 laufenden DOK-Versuch in Therwil in der Schweiz (<http://www.FIBL.ch/english/research/annual-crops/dok/index.php>).

Für die vorliegenden Untersuchungen lagen die folgenden fünf Anbauvarianten in jeweils vierfacher Feldwiederholung vor. Diese Proben werden im weiteren Verlauf DOK-Weizenproben genannt.

Tabelle 3-1: Charakterisierung der DOK-Weizenproben (Zusatzbezeichnungen gemäß MÄDER, 2002)

Code	Anbauvariante
A	Ungedüngt (N)
B	Mineralisch gedüngt (NPK in Menge der Mistdüngung konventionell) (M)
C	Biologisch-dynamisch, 1,4 DGVE/ha (D 2)
D	Organisch-biologisch mit 1,4 DGVE/ha (O 2)
E	Konventionell Integrierte Produktion, Mistdüngung (K 2)

Die Verfahrensunterschiede liegen dabei in der Düngung und im Pflanzenschutz, nicht in der Fruchtfolge und der Bodenbearbeitung. Eine Beschreibung des Versuches und eine Charakterisierung der Anbausysteme finden sich bei MÄDER (2002).

3.1.1.2 Erzeugerproben

Bei den Erzeugerproben handelt es sich um Weizen, der für den Verkauf produziert worden war. Von der FAL (Trenthorst) wurden Weizenproben (Körner) konventionell wirtschaftender und ökologisch wirtschaftender Erzeugerbetrieben zusammengestellt, so dass es Paare gleicher Sorte aus unterschiedlichem Anbau gab. Die Erzeugerbetriebe innerhalb eines Paares sollten sich möglichst in geografischer Nähe zueinander befinden. Für jede Probe standen ca. 800 g zur Verfügung. Diese Proben werden im weiteren Verlauf Weizen-Erzeugerproben bezeichnet.

Tabelle 3-2: Weizen-Erzeugerproben des Jahres 2004

	Sorte	Variante	Herkunft	Bodenart (Ökobetrieb)	Vorfrucht (Ökobetrieb)	Anbau- verband
A 1	'Capo'	Öko,	Wilmsdorf, Brandenburg	Sandiger Lehm	Klee gras	Bioland
A 2	'Capo'	Konventionell	Wilmsdorf, Brandenburg			
B 1	'Capo'	Konventionell	Poppenhausen, Bayern	Lehm / Löss	Klee gras	Natur- land
B 2	'Capo'	Öko	Ramsthat, Bayern			
C 1	'Capo'	Konventionell	Orsingen-Nenzingen, Baden-Württemberg			
C 2	'Capo'	Öko	Dettighofen, Baden-Württemberg	Sandiger Lehm	Rotklee	Bioland
D 1	'Bussard'	Öko	Reußenköge	Sandiger Lehm	Klee gras	Demeter
D 2	'Bussard'	Konventionell	ATR Landhandel	Lehm	Futtererbse	Bioland
E 1	'Asketis'	Öko	Allgermissen, Niedersachsen			
E 2	'Asketis'	Konventionell	Bierbergen, Niedersachsen			
F 1	'Asketis'	Konventionell	Grande, Schleswig-Holstein			
F 2	'Asketis'	Öko	Trenthorst, Schleswig-Holstein			

3.1.2 Carotinoide in Weizen

Die Carotinoide wurden in den Weizenproben aus dem Jahr 2004 mit Messungen mittels HPLC-Analytik analysiert. Untersucht wurden die Weizen-Erzeugerproben und die DOK-Weizenproben. Dabei wurden die Proben des DOK-Weizens auf zwei verschiedene Arten extrahiert und vermessen. Diese Probenvorbereitung, die Extraktion und die Messung mittels HPLC-Analytik wurden einerseits im September/Okttober 2004 und andererseits im April/Mai 2005 durchgeführt.

Zusätzlich wurde in allen Proben der Gehalt der Gelbpigmente, deren chemische Natur bislang den Carotinoiden und deren Derivaten zugeschrieben wird, photometrisch nach einer ICC (152) Methode bestimmt.

3.1.2.1 HPLC Messungen des Carotinoidgehaltes und des Carotinoideusters in Weizen (2004)

Die HPLC-Analytik wurde in Anlehnung an die Form durchgeführt, die von HENTSCHEL ET AL. (2002) beschrieben wird.

Probenvorbereitung

Direkt nach der Lieferung wurden alle Proben visuell auf Verunreinigungen in Form von Spelzen, Mutterkornbesatz und Fremdkörpern untersucht und gereinigt.

Bis zum Mahlen wurden die Proben in den Lieferverpackungen belassen und vor Licht geschützt bei 8 °C gelagert. Direkt vor der Extraktion wurde der bis zu einer Restfeuchte von durchschnittlich 11 % getrocknete Weizen mit einer Zentrifugalmühle (Retsch) mit einer Siebgröße von 0,5 mm gemahlen. Verarbeitet wurde dabei jeweils die gesamte Probenmenge.

Extraktion

2 g Weizenmehl und 0,2 g Magnesiumhydroxidcarbonat (Merck) wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) eingewogen. Danach wurden die freien Carotinoide mit 10 ml eines Gemisches aus THF (p.a., Merck) und MeOH (p.a., Merck) (1:1, v/v + 1 ml β -apo-8'-Carotenal-Lösung (Fluka, Konzentration = 0,002 mg/ml) als interner Standard

im gekühlten Ultraschallbad (Sonorex Bandelin, IKA, Temperatur (Ultraschallbad) ≤ 10 °C) für 15 Minuten extrahiert und anschließend für 10 Minuten zentrifugiert (Hettich Biofuge R, 4 °C, 4000 rpm). Der Überstand wurde in ein weiteres Zentrifugenröhrchen dekantiert und der Rückstand noch zweimal mit jeweils 10 ml MeOH/THF extrahiert. Der Überstand wurde in einem 50 ml Rotationsverdampferkolben (Heidolph) zusammengefasst und im Rotationsverdampfer (Heidolph) bis zur Trockene eingengt (Temperatur (Wasserbad) = 40 °C, Vakuum = 337 mbar). Der Rückstand wurde im Ultraschallbad in 0,8 ml Mischung aus THF und MeOH (1:1 v/v) aufgenommen und mit einer Einmalspritze (Braun) durch einen Spritzenfilter (Merck) in ein 2 ml Eppendorf Probengefäß filtriert. Von der filtrierten Lösung wurden 150 μ l mit einer Eppendorf-Pipette in ein 1,5 ml HPLC Vial (VWR) mit 150 μ l Mikroinsert (VWR) pipettiert und mit einem Schraubdeckel verschlossen.

Extrakte dieser Art wurden von allen Weizen-Erzeugerproben in 5-facher Probenwiederholung und von den Weizen DOK-Proben in jeweils 6-facher Probenwiederholung aufbereitet und direkt anschließend an die Extraktion mit der HPLC vermessen.

Messungen mittels HPLC-Analytik

Die Trennung erfolgte isokratisch bei einer Flussrate von 1,0 ml/min und einer Säulentemperatur von 20 °C \pm 2 °C mittels einer Vydac 201TP54 Säule. Als mobile Phase dienten Methanol (gr. gr., Merck)/Acetonitril (gr. gr., Merck)/ 2-Propanol (gr. gr., Merck) (54/44/2, v/v/v). Das Injektionsvolumen betrug 25 μ l. Alle Injektionen wurden vom Autosampler durchgeführt. Die Laufzeit für eine HPLC-Untersuchung einer Probe betrug 14 Minuten.

HPLC-Bedingungen

HPLC-System: Waters Alliance, Säulenofen mit Thermostat
Detektor: DAD (Waters 2489) Auswertungen bei 450 nm
Säulenmaterial: Vydac 201TP54 Säule (MZ Analystechnik, Mainz)
Software: Empower

Identifizierung

Die Identifizierung einzelner Carotinoide in Weizen wurde durch den Vergleich der Retentionszeiten und der UV-Spektren von Standardlösungen und Weizenrealproben vorgenommen. Dafür wurden Lösungen der Standardsubstanzen Lutein, α -Carotin, β -Carotin und Zeaxanthin mit einer Konzentration von jeweils 0,05 mg/ml angesetzt und der Behandlung der beschriebenen Carotinoidextraktion für Weizenproben unterzogen. Diese Lösungen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Weizenproben mit der HPLC untersucht, wobei während der gesamten Dauer eines HPLC-Laufes mit einem DAD die UV-Spektren in einem Bereich zwischen 210–470 nm aufgezeichnet wurden. Zur Auswertung wurden die Absorptionsmaxima und die Retentionszeiten der Standardlösungen mit denen der einzelnen Peaks der Realproben verglichen.

Darüber hinaus wurden Co-Chromatographien mit Weizenextrakten und Lutein-Standardsubstanz durchgeführt. Die Weizenextrakte wurden nach der beschriebenen Prozedur hergestellt, wobei der Probe vor dem ersten Extraktionsschritt im Ultraschallbad 1 ml einer Lösung der Standardsubstanzen Lutein mit einer Konzentration von 0,02 mg/ml zugegeben wurde. Diese Proben wurden unter den für die Realproben beschriebenen Bedingungen für die HPLC eingesetzt.

3.1.2.2 HPLC-Analytik des Carotinoidgehaltes und des Carotinoidmusters in DOK-Weizen (2005)

Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung entsprach der Vorbereitungen der DOK-Weizenproben im Jahr 2004 (Kap. 3.1.2.1).

Extraktion

2 g Weizenmehl wurden zusammen mit 0,2 g Magnesiumhydroxidcarbonat (Merck) in ein Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) eingewogen und mit 10 ml eines Gemisches aus THF (p.a., Merck) und MeOH (p.a., Merck) (1:1, v/v) sowie 1 ml des internen Standards β -apo-8'-Carotenal (Fluka, 18 μ g/ml) versetzt. Die freien Carotinoide wurden durch eine

15-minütige Behandlung im gekühlten Ultraschallbad (Sonorex Bandelin, IKA, Soll-Temperatur (Ultraschallbad) ≤ 10 °C) extrahiert. Die entstandene Suspension wurde für 10 Minuten zentrifugiert (Hettich, Biofuge R, 4 °C, 4000 rpm) und der Überstand in ein weiteres Zentrifugenröhrchen dekantiert. Der Rückstand wurde noch zweimal mit jeweils 10 ml THF/MeOH (1:1, v/v) unter den beschriebenen Bedingungen extrahiert. Der Überstand wurde jeweils dekantiert, in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt und mit 10 ml Petrolether (Merck) + 0,1 % BHT (Merck) und 10 ml 10%iger NaCl Lösung (p.a., Merck) vorsichtig ausgeschüttelt. Nachdem sich die Phasentrennung eingestellt hatte, wurde die Petrolether Phase abgezogen und in einem 50 ml Rotationsverdampferkolben (Heidolph) gesammelt. Die untere (MeOH/Wasser) Phase wurde noch zweimal mit jeweils 10 ml Petrolether ausgeschüttelt. Die zusammengefassten Petroletherphasen wurden schließlich im Rotationsverdampfer (Heidolph) bis zur Trockene eingedampft. Im Ultraschallbad wurde der Rückstand in 400 μ l THF/MeOH (1:1, v/v) und 400 μ l der mobilen Phase aufgenommen und durch einen 0,45 μ m PTFE Spritzenfilter (Merck) filtriert. Jede Probe wurde direkt im Anschluss an die Aufbereitung mit der HPLC vermessen.

Messung

Die Trennung erfolgte isokratisch bei einer Flussrate von 0,5 ml/min und einer Säulentemperatur von 20 °C \pm 2 °C mittels einer Vydac 201TP54 Säule. Als mobile Phase dienten Methanol (gr. gr., Merck) / Acetonitril (gr. gr., Merck) / 2-Propanol (gr. gr., Merck) (54/44/2, v/v/v). Das Injektionsvolumen betrug 15 μ l. Alle Injektionen wurden vom Autosampler durchgeführt. Die Laufzeit für die Untersuchung einer Probe betrug 32 Minuten. Durch den kontinuierlichen Einsatz des Diodenarraydetektors konnten über die gesamte Laufzeit UV-Spektren aufgenommen werden. Die Aufnahme als Chromatogramm und die Bestimmung der Peakflächen erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Jede Probe wurde in 6-facher Wiederholung aufbereitet und vermessen. Nach jeder untersuchten Probe wurde die Säule für 10 Minuten equilibriert, nach 5 untersuchten Proben wurde eine Leerprobe untersucht.

HPLC-Bedingungen

HPLC System : Waters Alliance

Detektor: DAD (Waters 2489) Auswertungen bei 450 nm

Säulenmaterial: Vydac 201TP54 Säule (MZ Analystechnik, Mainz)

Software: Empower

3.1.3 Photometrische Messung der Summe der Gelbpigmente in Weizen

Das Prinzip der Bestimmung der Gelbpigmente in gemahlene Weizenproben als Summenparameter beruht auf einer Modifikation der ICC Methode 152 (ICC, 1991). Die Methode ist neben der Untersuchung der Gelbpigmente in Weizengrieß auch für die Untersuchung der Gelbpigmente in Vollkornmehl und Vollkornmehlprodukten anwendbar (ICC 152, 1991). Die Methodik wurde in Anlehnung an eine von HENTSCHEL ET AL. (2002) beschriebene, modifizierte Form durchgeführt.

Für die vorliegende Arbeit wurden die Gelbpigmente aus den gemahlene Proben extrahiert, die Konzentration der Gelbfärbung wurde photometrisch bestimmt und anhand einer Kalibriergeraden mit Lutein-Standardlösungen als Lutein berechnet. Wie bei HENTSCHEL ET AL. (2002) beschrieben, wurden die Proben im Gegensatz zur ICC Methode 152 nicht mit n-Butanol sondern mit MeOH/THF extrahiert.

Bei unveränderten UV-Spektren und unveränderten Analytkonzentrationen konnte durch die höhere Flüchtigkeit des eingesetzten Extraktionsmittels bei der Anzahl der untersuchten Proben ein Zeitgewinn realisiert werden.

Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung für die Bestimmung der Summe der Gelbpigmente entsprach der Probenvorbereitung für die HPLC-Analytik der Carotinoide in Weizen (Kap. 3.1.2.1).

Extraktion

Die Extraktion der Proben entsprach der Probenvorbereitung für die ersten Messungen mittels HPLC-Analytik der Carotinoide im Herbst 2004 und ist im Kapitel 3.1.2.1 beschrieben. Im Gegensatz zu diesen Proben wurde während der Extraktion kein interner Standard zugesetzt. Der Rückstand wurde nach der Trocknung im letzten Schritt der Extraktion in 1 ml einer Lösung aus THF/MeOH (1:1, v:v) aufgenommen.

Messung

Die Extrakte wurden mit der Mischung aus THF (p.a., Merck) / MeOH (p.a., Merck) (1:1, v:v) im Verhältnis 1:9 verdünnt und in einer Kunststoffküvette (Brand) bei 447 nm gegen eine Mischung aus THF/MeOH (1:1, v:v) im Photometer (Thermo Spectronic) gemessen. Aus der Extinktion wurde der Gehalt der Gesamtcarotinoide als Lutein berechnet.

3.2 Maisproben

3.2.1 Probenmaterial

Die Maisproben stammen aus dem seit 1977 laufenden DOK-Versuch des FiBL in Therwil, Schweiz (<http://www.FIBL.ch/english/research/annual-crops/dok/index.php>). Aus diesem Versuch standen Proben der folgenden fünf Anbauvarianten der Sorte 'Magister' zur Verfügung:

Tabelle 3-3: Beschreibung der Maisproben für die Untersuchungen mit der HPLC und die photometrischen Messungen der Carotinoide (Zusatzbezeichnungen nach MÄDER, 2002)

Code	Anbauvariante	Probenumfang (g)
H	Ungedüngt (N)	2400
I	Konventionell-mineralische Düngung seit 2. FFP 1,0 Normdüngung (M2)	2400
K	Biologisch-dymanische Düngung, 1,4 DGVE/ha (D2)	2400
L	Organisch-biologische Düngung, 1,4 DGVE/ha (O2)	2400
P	Konventionelle Düngung, 1,0 Normdüngung (K2)	2400

Eine genaue Beschreibung der Anbauvarianten findet sich bei MÄDER (2002).

3.2.2 HPLC-Analytik des Carotinoidgehaltes und des Carotinoidmusters in Mais

Probenvorbereitung

Nach der Lieferung wurden alle Maisproben bis zum Vermahlen in den Lieferverpackungen belassen und vor Licht und Feuchtigkeit geschützt bei 8 °C gelagert. Vor der weiteren Verarbeitung wurden alle Proben visuell auf Verunreinigungen untersucht. Nachdem Fremdkörper, beschädigte oder verfärbte Körner aussortiert worden waren, wurde der Mais in einer Zentrifugalmühle (Retsch) mit einer Siebgröße von 0,5 mm gemahlen. Die Extraktion der Carotinoide erfolgte direkt im Anschluss an das Vermahlen der Proben, nicht benötigtes Material wurde in lichtundurchlässige Weithalsflaschen mit Schraubdeckelverschluss gefüllt und bei -18 °C gelagert.

Extraktion

Für diese Untersuchungen wurden 4 g gemahlener Mais und 0,2 g Magnesiumhydroxidcarbonat (p.a., Merck) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) eingewogen und nach Zugabe von 10 ml eines Gemisches aus THF (p.a.; Merck) und MeOH (p.a., Merck) (1:1, v/v) sowie 1 ml β -apo-8`Carotenal Standardlösung (Fluka, 16 μ g/ml) als interner Standard für 15 Minuten im gekühlten Ultraschallbad (Bandelin Sonorex, IKA, Soll-Temperatur (Ultraschallbad) \leq 10 °C) extrahiert. Die entstandene Suspension wurde bei

4 °C für 10 Minuten mit 4000 rpm zentrifugiert (Hettich, Biofuge R), der Überstand dekantiert und in einem weiteren Zentrifugenröhrchen gesammelt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt und der Überstand mit dem der vorhergegangenen Extraktion in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt. Die Zugabe des internen Standards erfolgte nur vor der ersten Extraktion. Der Gesamtüberstand wurde mit 10 ml Petrolether (50-70 °C, Merck) + 0,1 % BHT (Merck) und 10 ml einer 10 %igen NaCl Lösung (p.a., Merck) 1 Minute ausgeschüttelt. Die Petrolether-Phase wurde abgezogen und in einem Rotationsverdampferkolben (Heidolph) gesammelt. Die untere (THF/MeOH/Wasser) Phase wurde noch zweimal mit jeweils 10 ml Petrolether ausgeschüttelt. Die jeweiligen Petrolether-Phasen wurden abgezogen und in einem Rotationsverdampferkolben zusammengeführt. Nachdem die Proben im Rotationsverdampfer (Heidolph) bis zur Trockene eingedampft worden waren, wurde der Rückstand im Ultraschallbad in 3 ml einer Mischung aus THF und MeOH (1:1, v/v) und 3 ml der mobilen Phase aufgenommen. Diese Lösung wurde mit einer Einmalspritze (Braun) und einer Injektionsnadel (Becton) aufgenommen und durch einen Spritzenfilter (Merck) in ein Schnappdeckelgefäß (VWR) filtriert. 1,5 ml der filtrierten Probe wurden in ein dunkles HPLC Vial (VWR) überführt und direkt anschließend an die Aufbereitung mit der HPLC vermessen.

Während des gesamten Vorganges der Extraktion wurden die Proben soweit möglich gekühlt und vor Lichteinwirkung geschützt.

Messung

Die Trennung erfolgte isokratisch bei einer Flussrate von 0,75/min und einer Säulentemperatur von 20 °C ± 2 °C mittels einer Vydac 201TP54 Säule. Als mobile Phase dienten MeOH (gr. gr., Merck)/Acetonitril (gr. gr., Merck)/2-Propanol (gr. gr., Merck) (85/13/2, v/v/v). Das Injektionsvolumen betrug 15 µl. Die Laufzeit für die Untersuchung einer Probe betrug 25 Minuten. Durch den kontinuierlichen Einsatz des Diodenarraydetektors konnten über die gesamte Laufzeit UV-Spektren in einem Bereich zwischen 210 – 480 nm aufgenommen werden. Die Aufnahme als Chromatogramm und die Bestimmung der Peakflächen erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm.

HPLC Bedingungen

HPLC System : Waters Alliance, Säulenofen mit Thermostat
Detektor: DAD (Waters 2489) Auswertungen bei 450 nm
Säulenmaterial: Vydac 201TP54 Säule (MZ Analystechnik, Mainz)
Software: Empower

Jede Probe wurde in 6-facher Wiederholung aufbereitet und vermessen. Nach jeder untersuchten Probe wurde die Säule für 10 Minuten equilibriert, nach 5 untersuchten Proben wurden eine Leerprobe und eine reine Standardlösung untersucht.

Identifizierung

Die Identifizierung einzelner Carotinoide in den Maisproben wurde durch den Vergleich der Retentionszeiten und der UV-Spektren von Standardlösungen und Realproben vorgenommen. Dafür wurden Lösungen der Standardsubstanzen Lutein, Zeaxanthin und β -Cryptoxanthin mit einer Konzentration von jeweils 0,05 mg/ml angesetzt und der Behandlung der beschriebenen Carotinoid-Extraktion unterzogen. Diese Lösungen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Maisproben mit der HPLC untersucht, wobei während des gesamten HPLC-Laufes mit einem DAD die UV-Spektren in einem Bereich zwischen 210–470 nm aufgezeichnet wurden. Zur Auswertung wurden die Absorptionsmaxima und die Retentionszeiten der Standardlösungen mit denen der einzelnen Peaks der Realproben verglichen.

Zur weiteren Identifizierung wurden Co-Chromatographien mit Maisextrakten und Standardsubstanzen durchgeführt. Die Maisextrakte wurden nach der beschriebenen Prozedur hergestellt, wobei der Probe vor dem ersten Extraktionsschritt im Ultraschallbad jeweils 1 ml einer Lösung der Standardsubstanzen Lutein, Zeaxanthin und β -Cryptoxanthin zugegeben wurden. Die Konzentration der Lösungen betrug für β -Cryptoxanthin 0,03 mg/ml, für Lutein und Zeaxanthin jeweils 0,075 mg/ml. Pro Probe wurde jeweils nur eine Standardsubstanz zugesetzt. Diese Proben wurden unter den für die Realproben beschriebenen Bedingungen für die HPLC eingesetzt.

Ein struktureller Nachweis der Einzelkomponenten, beispielsweise mittels HPLC-MS Kopplung, konnte im Rahmen der vorliegenden Messungen nicht erfolgen.

3.3 Möhrenproben

3.3.1 Probenmaterial

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an ausgewählten ökologisch und konventionell erzeugten Möhrenproben aus definierten Anbauversuchen und an Erzeugerproben ausgesuchter ökologisch bzw. konventionell wirtschaftender Anbaubetriebe durchgeführt.

3.3.1.1 Probenmaterial aus Anbauversuchen

Die in den Messungen als Proben verwendeten Möhren stammen aus 2 verschiedenen Anbauversuchen.

Zum einen handelt es sich um Möhren aus einem Anbauversuch am Forschungsinstitut für Biologischen Landbau (FiBL) in Frick (Schweiz), in welchem alte und neue Sorten miteinander verglichen werden (www.FIBL.org). Für die Untersuchungen standen Möhren der Sorten 'Samson' (OP), 'Nipomo' (F₁), 'Boléro' (F₁) und 'Tiptop' (OP) zur Verfügung. Möhren aus diesem Versuch, die im weiteren Verlauf als „FiBL-Möhren“ bezeichnet werden, standen in den Jahren 2002 und 2003 für die Messungen mittels HPLC-Analytik des Polyphenolgehaltes und des Polyphenolmusters zur Verfügung.

Zum anderen handelt es sich um Möhren aus einem Anbauprojekt auf dem seit 1999 ökologisch bewirtschafteten Versuchsbetrieb der Universität Kassel/Witzenhausen am Standort Frankenhausen. Die Möhren für die vorliegenden Untersuchungen stammen aus einem Anbauversuch zur N-Düngung. In den Jahren 2002 und 2003 wurden Möhren der Sorte 'Rodelika' und im Jahr 2004 Möhren der Sorten 'Rodelika' und 'Rothild' verwendet. Der Versuch ist in FLECK ET AL. (2005) beschrieben. Für die vorliegenden Messungen standen die Möhren der Anbauvarianten „ohne biologisch dynamische Spritzpräparate + 150 kgN/ha“ (N+) sowie „ohne biologisch-dynamische Spritzpräparate

ohne N-Düngung“ (N-) zur Verfügung. Die Düngungsvariante wurde mit 150 kg N/ha in Form von Hornspänen gedüngt.

Proben aus diesem Versuch, die im weiteren Verlauf als UniK-Möhren bezeichnet werden, standen für die Untersuchungen der Polyphenole in den Jahren 2002, 2003 und 2004 zur Verfügung. Für die Untersuchungen der Carotinoide standen solche Proben im Jahr 2004 zur Verfügung.

FiBL-Möhren

Tabelle 3-4: FiBL-Möhren des Jahres 2002

Code	Sorte	Lieferumfang
E	‘Boléro’ (F ₁)	16 Stück
F	‘Nipomo’ (F ₁)	17 Stück
G	‘Samson’ (OP)	16 Stück

Die Lieferung dieser Möhren erfolgt am 11.11.2002.

Eine zweite Lieferung Möhren erfolgte in Oktober 2003 (Ernte 2003). Geliefert wurden 4 Bulkproben mit den Bezeichnungen A, B, C und D. Von jeder Probe wurde eine nach Größen- und Gewichtsverteilung repräsentative Probe zusammengestellt und weiter verarbeitet.

Tabelle 3-5: FiBL-Möhren des Jahres 2003

Code	Sorte	Lieferumfang (kg)
A	‘Tiptop’ (OP)	7,2
B	‘Boléro’ (F ₁)	7,2
C	‘Nipomo’ (F ₁)	7,2
D	‘Samson’ (OP)	7,2

UniK-Möhren

Eine kurze Charakterisierung dieser Proben erfolgt in den Tabellen 3-6 und 3-7.

Tabelle 3-6: UniK-Möhren2002 und 2003

Code	Sorte, Anbauvariante	Probenumfang	Lieferdatum
M 33	'Rodelika' ohne N-Düngung	20 Stück	28.10.2002
M 66	'Rodelika' plus Hornspäne	20 Stück	28.10.2002
M 77	'Rodelika' plus Hornspäne	50 Stück	24.02.2003
M 88	'Rodelika' ohne N- Düngung	50 Stück	24.02.2003

Tabelle 3-7: UniK-Möhren 2004

Code	Sorte, Anbauvariante	Probenumfang	Lieferdatum
G 1	'Rodelika', ohne N-Düngung (N-)	50 Stück	05.10.2004
G 2	'Rodelika' plus Hornspäne (N+)	50 Stück	05.10.2004
H 1	'Rothild', ohne N-Düngung (N-)	50 Stück	05.10.2004
H 2	'Rothild', plus Hornspäne (N+)	50 Stück	05.10.2004

3.3.1.2 Erzeugerproben

Erzeugerproben

Bei den Erzeugerproben handelt es sich um Möhren, die für den Verkauf produziert worden waren. Von der FAL (Trenthorst) wurden Möhren konventionell wirtschaftender bzw. ökologisch wirtschaftender Erzeugerbetrieben in Nordwestdeutschland zusammengestellt, die sich in möglichst großer geografischer Nähe (< 2 km) zueinander befinden. Verwendung fanden Möhren der Sorten 'Narbonne' und 'Nerac'. Die Proben wurden so zusammengestellt, dass es Paare gleicher Sorte aus unterschiedlichem Anbau gab.

Diese Proben werden im weiteren Verlauf als Möhren-Erzeugerproben bezeichnet, eine kurze Charakterisierung der Proben erfolgt in der Tabelle 3-8.

Tabelle 3-8: Beschreibung der Möhren-Erzeugerproben

Code	Sorte	Variante	Herkunft	Bodenart (Ökobetrieb)	Vorfrucht (Ökobetrieb)	Probe (kg)
O 1	'Narbonne'	Öko	Friedrichsgaben- koog		Kartoffel	4,89
O 2	'Narbonne'	Konventio- nell	Friedrichskoog			4,54
P 1	'Nerac'	Konventio- nell	Kronprinzenkoog			5,24
P 2	'Nerac'	Öko	Westerdeichskoog	Sandiger Lehm	Weißkohl	4,86
Q 1	'Nerac'	Konventio- nell	Hedwigenkoog			3,67
Q 2	'Nerac'	Öko	Hedwigenkoog	Schluffiger Ton	Weißklee	4,72
R 1	'Nerac'	Öko	Friedrichsgaben- koog	Schluffiger Lehn		6,37
R 2	'Nerac'	Konventio- nell	Kronprinzenkoog			4,67
S 1	'Narbonne'	Konventio- nell	Hedwigenkoog			4,51
S 2	'Narbonne'	Öko	Hedwigenkoog	Schluffiger Ton	Kartoffel	4,76

Solche Proben standen für die Messung des Polyphenolgehaltes und –musters sowie für die Messung des Carotinoidgehaltes und –musters im Jahr 2004 zur Verfügung. Lieferdatum: 25.10.04.

3.3.2 Carotinoide in Möhren

Die qualitative und die quantitative Carotinoidzusammensetzung der Möhrenproben wurde mit Messungen mittels HPLC-Analytik in den Möhren-Erzeugerproben und den UniK-Möhren des Jahres 2004 untersucht. Zusätzlich wurde der Gesamtcarotinoidgehalt der Möhrenproben mit photometrischen Messungen bestimmt.

3.3.2.1 HPLC-Analytik des Carotinoidgehaltes und des Carotinoidmusters in Möhren

Die beschriebene Extraktion lehnt sich an die von HART ET AL. (1994) beschriebene Methode zur Extraktion von Carotinoiden aus Möhren an. Unterschiede ergaben sich

hinsichtlich der Probenvolumina. Die HPLC-Analytik des Carotinoidgehaltes und der Carotinoidzusammensetzung wurde mit den UniK-Möhren des Jahres 2004 und den Erzeugerproben desselben Jahres mit gefriergetrockneten Möhren durchgeführt.

Probenvorbereitung

Die Möhren wurden unter fließendem Wasser gründlich von anhaftenden Erdpartikeln gereinigt, wobei eine Verletzung der äußeren Schale vermieden wurde. Anschließend wurden die gewaschenen Möhren zu Dokumentationszwecken fotografiert und der Zustand der einzelnen Gesamtproben dokumentiert.

Für die weitere Verarbeitung wurden die Möhrenproben in ca. 4 mm dicke Scheiben geschnitten, schadhafte Stellen wurden verworfen. Die Scheiben wurden gefriergetrocknet (Christ, Gefrier Trocknungsanlage, Verweildauer 72h) und in einer Zentrifugalmühle (Retsch, ZMP 100) mit einer Siebgröße von 0,5 mm gemahlen und zu einer Gesamtprobe zusammengefasst. Nicht sofort für die Analytik benötigtes Probenmaterial wurde in einer braunen undurchsichtigen LDPE Flasche mit Schraubdeckel (VWR) bei -18 °C gelagert. Die Vorbereitung erfolgte für die UniK-Möhren sowie der Möhren-Erzeugerproben auf gleiche Weise.

Extraktion

2,5 g einer Probe wurden mit 0,2 g Magnesiumcarbonat (Merck) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) eingewogen und mit 10 ml eines Gemisches aus Tetrahydrofuran (THF) (Merck) und Methanol (MeOH) (p.a., Merck) (1:1 v/v) und jeweils 1 ml β -apo-8-Carotenal Lösung (= 0,03 mg/ml, Fluka) als interner Standard für 10 Minuten im gekühlten Ultraschallbad (Sonorex Bandelin, Ika) extrahiert. Anschließend wurde die Suspension für 10 Minuten (4 °C , 4000 rpm) zentrifugiert (Hettich, Biofuge R) und der Überstand dekantiert. Der Probenrückstand wurde noch zweimal mit jeweils 10 ml der Mischung aus THF und MeOH (1:1 v/v) resuspendiert und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde nach jedem Durchgang dekantiert und mit dem der vorhergegangenen Extraktionen in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt. Danach wurde der gesammelte Überstand mit 10 ml Petrolether (Merck) +0,1 % BHT (Merck) und 10 ml NaCl Lösung (10 %, Merck) ausgeschüttelt. Nach der Phasentren-

nung wurde die obere Petrolether-Phase abgezogen, die untere THF/MeOH/Wasser-Phase noch zweimal mit je 10 ml Petrolether ausgeschüttelt. Die Petrolether-Phasen wurden in einem Rotationsverdampferkolben zusammengeführt und im Rotationsverdampfer (Heidolph) bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 3 ml der MeOH/THF Mischung und 3 ml der mobilen Phase aufgenommen und vor der Messung durch einen 0,45 µl PTFE Spritzenfilter (Merck) filtriert.

Jede Probe wurde anschließend an die Probenaufbereitung mit der HPLC vermessen.

Messung

Die Trennung der Proben erfolgte isokratisch bei einer Temperatur von 20 °C (+/- 4 °C) und einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Während der gesamten Dauer eines HPLC-Laufes wurde von einem Diodenarraydetektor das UV-Spektrum in einem Wellenlängenbereich zwischen 210–470 nm gemessen. Die Berechnung der Peakflächen und die Auswertung erfolgte bei 450 nm.

HPLC Bedingungen

HPLC System : Water Alliance
Detektor: DAD (Waters 2489) Auswertungen bei 450 nm
Säulenmaterial: Vydac 201TP54 Säule (MZ Analysentechnik, Mainz)
Mobile Phase: A: 54 % Acetonitril (gr. gr., Merck)
B: 44 % Methanol (gr. gr., Merck)
C: 2 % Isopropanol (gr. gr., Merck)
Software: Empower

Identifizierung

Die Identifizierung einzelner Carotinoide in den Möhrenproben wurde durch den Vergleich der Retentionszeiten und der UV-Spektren von Standardlösungen und Möhrenrealproben vorgenommen. Dafür wurden Lösungen der Standardsubstanzen Lutein, α -Carotin, β -Carotin und β -Cryptoxanthin mit einer Konzentration von jeweils 0,05 mg/ml angesetzt und der Behandlung der beschriebenen Carotinoideextraktion unterzogen. Diese Lösungen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Möhrenproben mit der HPLC untersucht, wobei während der gesamten Dauer eines HPLC-Laufes mit

einem DAD die UV-Spektren in einem Bereich zwischen 210 –475 nm aufgezeichnet wurden. Zur Auswertung wurden die Absorptionsmaxima und die Retentionszeiten der Standardlösungen mit denen der einzelnen Peaks der Realproben verglichen.

Zur weiteren Identifizierung wurden Co-Chromatographien mit Möhrenextrakten und Standardsubstanzen durchgeführt. Die Möhrenextrakte wurden nach der beschriebenen Prozedur hergestellt, wobei der Probe vor dem ersten Extraktionsschritt im Ultraschallbad jeweils 1 ml einer Lösung der Standardsubstanzen Lutein, α -Carotin, β -Carotin und β -Cryptoxanthin zugegeben wurden. Die Konzentration der Lösungen betragen für Lutein und β -Cryptoxanthin jeweils 0,03 mg/ml, für α -Carotin, β -Carotin jeweils 0,1 mg/ml. Pro Probe wurde jeweils nur eine Standardsubstanz zugesetzt. Diese Proben wurden unter den für die Realproben beschriebenen Bedingungen für die HPLC eingesetzt. Zur Auswertung wurden die Absorptionsmaxima und die Retentionszeiten der Standardlösungen mit denen der einzelnen Peaks der Realproben verglichen.

3.3.2.2 Photometrische Messung des Gesamtcarotinoidgehaltes in Möhren

Das Prinzip der Messung des Gesamtcarotinoidgehaltes lehnt sich an eine von WALBRAUCH (1984) beschriebene Methode an. Aus der Extinktion der einzelnen Proben bei 452 nm wurden die Gesamtcarotinoide als β -Carotin berechnet.

Probenaufbereitung

Die Probenaufbereitung und Extraktion entsprach der Aufbereitung für die Untersuchungen mittels der HPLC-Analytik (Kap. 3.3.2.1). Im Unterschied zu diesen Extrakten wurde den Proben für die photometrische Untersuchung des Gesamtcarotinoidgehaltes kein interner Standard zugesetzt. Vermessen wurden Möhrenextrakte der UniK-Möhren des Jahres 2004 und der Erzeugerproben des Jahres 2004 in jeweils 5-facher Probenwiederholung.

Photometrische Messung der Proben

Die Extrakte wurden mit der Mischung aus THF (Merck)/MeOH (Merck) (1:1, v:v) im Verhältnis 1:9 verdünnt und in einer Kunststoffküvette (Brand) bei 452 nm gegen eine

Mischung aus THF/MeOH (1:1, v:v) im Photometer (Thermo Spectronic) gemessen. Aus der Extinktion wurde der Gehalt der Gesamtcarotinoide als β -Carotin berechnet.

3.3.3 Polyphenole in Möhren

Der Polyphenolgehalt der Möhrenproben wurde als Einzelstoffanalytik mittels HPLC-Analytik untersucht.

Die Untersuchungen wurden in 3 Versuchsreihen am Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW) im Jahr 2002 und an der Universität Kassel/Witzenhausen in den Jahren 2003 und 2004 durchgeführt. Dafür wurde eine bereits etablierte HPLC-Methode zur Bestimmung des Polyphenolmusters in Äpfeln (TREUTTER, 1988) an die Bestimmung dieser Substanzklasse in gefriergetrockneten Möhrenproben angepasst.

Für die Untersuchungen wurden methanolische Extrakte mit der HPLC verwendet.

3.3.3.1 HPLC-Analytik des Polyphenolgehaltes und des Polyphenolmusters in Möhren (2002, Freising)

Probenvorbereitung

Die Möhren wurden unter fließendem Wasser gründlich von anhaftenden Erdpartikeln gereinigt, wobei eine Verletzung der äußeren Schale vermieden wurde. Anschließend wurden die gewaschenen Möhren zu Dokumentationszwecken fotografiert und der Zustand der einzelnen Gesamtproben dokumentiert. An beiden Enden jeder Möhre wurde ein 2 cm langes Stück abgeschnitten und verworfen. Der verbliebene Rest wurde als Probe weiter verarbeitet.

Für die weitere Verarbeitung wurden die Möhrenproben in ca. 4 mm dicke Scheiben geschnitten, schadhafte Stellen wurden verworfen. Die Scheiben wurden gefriergetrocknet, in einer Schwingmühle (Retsch, MM2) staubfein gemahlen und zu einer Gesamtprobe zusammengefasst. Die Extraktion der Proben wurde direkt im Anschluss durchge-

führt. Nicht für die Extraktion benötigtes Probenmaterial wurde in einem LDPE Probengefäß (VWR) bei -18°C aufbewahrt.

Die Vorbereitung erfolgte für die UniK-Möhren sowie für die FiBL-Möhren gleichermaßen.

Extraktion

Von dem gefriergetrockneten Pulver wurden 0,5 g mit jeweils 1 ml Methanol (p.a., Merck) + Standard (6-Methoxyflavon = 0,1 mg/ml, Extra Synthèse) versetzt und bei 4°C für 30 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Nach dem Zentrifugieren (Hettich Mikro, 22 R, 10 min, 4°C) wurden die Proben dekantiert und im Rotationsvakuumverdampfer (Uniequip) bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 150 μl Methanol aufgenommen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde zur HPLC eingesetzt.

Von jeder Probe wurden 5 Wiederholungen angefertigt und anschließend vermessen.

Messung

Die Trennung erfolgte im Gradientenbetrieb Eluent A= 5%ige Ameisensäure (Merck), B = Methanol (gr. gr. Merck) bei einer von Flussrate 0,5 ml/min. Das Probenvolumen betrug 15 μl , alle Injektionen wurden von Hand ausgeführt. Der Injectionport wurde nach jeder Injektion mit Methanol gespült.

Das Gradientenprogramm ist in der folgenden Tabelle 3-9 dargestellt.

Tabelle 3-9: Gradientenbedingungen für die HPLC-Untersuchungen der Polyphenole in Möhren

Zeit (min)	% B (=Methanol)	Zeit (min)	% B (=Methanol)
0	0	150	30
5	2,5	165	40
15	2,5	180	50
30	5	195	90
40	5	215	90
65	10	230	0
105	20	255	0

HPLC-Bedingungen

HPLC System : Beckmann

Detektor: UV-vis Detektor (Beckmann) Messungen bei 280 nm

Säulenmaterial: Shandon Hypersil 0,3 μm , Innendurchmesser 4mm, 145 mm

Software: Gynkosoft

3.3.3.2 HPLC-Analytik des Polyphenolgehaltes und des Polyphenolmusters in Möhren (2003, Witzenhausen)

Probenvorbereitung

Die Vorbereitung der Proben erfolgte gemäß der unter 3.3.3.1 beschriebenen Vorgehensweise. Die gefriergetrockneten Scheiben wurden in einer Zentrifugalmühle (Retsch, ZMP 100, Sieb 0,5 mm) gemahlen. Nicht sofort für die Analytik benötigtes Probenmaterial wurde in einer braunen undurchsichtigen LDPE Flasche mit Schraubdeckel (VWR) bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Vorbereitung erfolgte für die UniK-Möhren sowie für die FiBL-Möhren auf gleiche Weise.

Methanolische Extrakte

Von dem Möhrenpulver wurden jeweils 5 g in ein Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) eingewogen und mit 20 ml Methanol (p.a., Merck) + 6-Methoxyflavon (= 0,03 mg/ml, Aldrich) für 30 Minuten im Ultraschallbad (Bandelin) extrahiert. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten zentrifugiert (Hettich, Biofuge R, 4000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min). Der Überstand wurde dekantiert und in einem Rotationsverdampfer (Heidolph) bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 3 ml Methanol (p.a) aufgenommen, nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und anschließend mit einem Spritzenfilter (Brandt) filtriert.

Lösungen dieser Art wurden für alle untersuchten Proben in jeweils 5-facher Ausführung angefertigt und mit der HPLC vermessen.

Messungen mittels HPLC-Analytik

Die Bedingungen für die Messungen sind im Kapitel 3.3.3.1 beschrieben. Durch einen Säulenofen konnte die Säulentemperatur konstant bei $25\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ gehalten werden. Alle Injektionen wurden vom Autosampler ausgeführt. Nach jeweils 5 untersuchten Proben wurde ein HPLC-Lauf mit 100 % Methanol durchgeführt.

HPLC Bedingungen

HPLC System : Waters Alliance

Detektor: Waters Diodenarraydetektor, 2489

Säulenmaterial: Shandon Hypersil 0,3 μm , Innendurchmesser 4mm, 145 mm

Software: Empower

3.3.3.3 HPLC-Analytik des Polyphenolgehaltes und des Polyphenolmusters in Möhren (2004, Witzenhausen)

Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgte entsprechend der Vorbereitung der Möhren für die Messungen im Jahr 2003. Alle Erzeugerproben und die UniK-Möhren wurden gleichermaßen behandelt.

Methanolische Extrakte

Von dem Möhrenpulver wurden jeweils 5 g in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) eingewogen und mit 20 ml Methanol (p.a., Merck) + 6-Methoxyflavon (Aldrich) (= 0,03 mg/ml.) für 30 Minuten im Ultraschallbad (Sonorex Bandelin) extrahiert. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten zentrifugiert (Hettich, 4000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und in einem Rotationsverdampfer (Heidolph) bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 3 ml Methanol (gr. gr., Merck) aufgenommen und nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Spritzenfilter (Brandt) filtriert und für die HPLC verwendet.

Lösungen dieser Art wurden für alle Proben in jeweils 5-facher Ausführung angefertigt und mit der HPLC vermessen.

Messungen mittels HPLC-Analytik

Die Messbedingungen entsprachen den unter 3.3.3.2 beschriebenen Umständen.

HPLC-Bedingungen

Die HPLC Bedingungen sind unter 3.3.3.2 beschrieben.

Identifizierung

Die Identifizierung einzelner phenolischer Substanzen in den Möhrenproben wurde durch den Vergleich der Retentionszeiten und der UV-Spektren von Standardlösungen und Möhrenrealproben vorgenommen. Untersucht wurden Substanzen, die in der Literatur (OLSSON ET AL. 1996) bereits als Inhaltsstoffe beschrieben wurden. Dafür wurden Lösungen der Standardsubstanzen Chlorogensäure, Ferulasäure, p-Cumarsäure, p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, Kaffeesäure und Syringasäure mit einer Konzentration von jeweils 0,01 mg/ml angesetzt und der Behandlung der beschriebenen methanolischen Extraktion unterzogen. Diese Lösungen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Möhrenproben mit der HPLC untersucht, wobei während des gesamten HPLC-Laufes mit einem DAD die UV-Spektren in einem Bereich zwischen 210 – 350 nm aufgezeichnet wurden. Zur Auswertung wurden die Absorptionsmaxima und die Retentionszeiten der Standardlösungen mit denen der einzelnen Peaks der Realproben verglichen.

Zur weiteren Identifizierung wurden Co-Chromatographien mit methanolischen Möhrenextrakten und Standardsubstanzen durchgeführt. Die Möhrenextrakte wurden nach der vorher beschriebenen Prozedur hergestellt, wobei der Probe vor dem ersten Extraktionsschritt im Ultraschallbad jeweils 1 ml einer Lösung der Standardsubstanzen Chlorogensäure, Ferulasäure, p-Cumarsäure, p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, Kaffeesäure und Syringasäure zugegeben wurden. Die Konzentration der Lösungen betrug jeweils 0,01 mg/ml, pro Probe wurde jeweils nur eine Standardsubstanz zugesetzt. Diese Proben wurden unter den beschriebenen Bedingungen für die HPLC eingesetzt.

Zur Absicherung wurde eine eindimensionale Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Dafür wurden methanolische Möhrenextrakte der Realproben auf die dreifache Konzentration aufkonzentriert und mit der HPLC in Fraktionen (3 min) aufgetrennt. Zur Dünnschichtchromatographie wurden mit Cellulose beschichtete Glasplatten (Schleicher & Schüll) verwendet. Jeweils 5 µl einer Probenfraktion wurden auf die Platte aufgetragen und mit einem Gemisch aus Butanol, Eisessig und Wasser (4:1:2,2, v, v, v) getrennt. Als Referenzen wurden zusätzlich jeweils 5 µl Lösung der Standardsubstanzen Chlorogensäure, Ferulasäure, p-Cumarsäure, p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, Kaffeesäure und Syringasäure auf der selben Platte untersucht. Der Phenolnachweis erfolgte unter einer UV-Lampe (350 nm):

- vor dem Bedampfen mit NH₃,
- nach dem Bedampfen mit NH₃,
- nach dem Besprühen mit Benedicts Reagenz (Fluka),
- nach dem Besprühen mit Naturstoffreagenz (Roth).

Durch die Einwirkungen der Sprühreagenzien können Farbreaktionen hervorgerufen werden, die Rückschlüsse auf die molekulare Struktur der phenolischen Bestandteile ermöglichen und so zur Identifikation von Phenolgruppen beitragen können. Benedicts Reagenz ist ein basischer Kupfercitratkomplex in wässriger Lösung. Das Cu²⁺ kann nur von Stoffen mit ortho-Dihydroxygruppen aus dem Citratkomplex verdrängt werden. Dadurch werden stabilere Komplexe gebildet die nicht fluoreszieren. Eine Verstärkung der Fluoreszenz kann durch Substanzen mit isolierten Hydroxylen hervorgerufen werden. Mit Naturstoffreagenz A können Flavonoide und Kaffeesäurederivate sichtbar gemacht werden, außerdem verstärkt es ihre Fluoreszenz (KERN, 1996).

3.4 Validierung der verwendeten Verfahren

Die Durchführung der Validierungsmaßnahmen dieser Arbeit erstreckt sich auf den analytischen Teil der Verfahren, wobei die Methodiken der HPLC-Analytik als Trennmethoden, und die photometrischen Messungen der Summenparameter einen Teil des je-

weiligen Gesamtverfahrens darstellen. Diese sind immer mit einer Fragestellung verbunden, nach denen sich der Umfang der Validierung richtet.

3.4.1 Validierungsfragen

Die Validierungsfragen der vorliegenden Untersuchungen zielten auf folgende Punkte ab:

1. Ist es möglich Unterschiede im Carotinoid- bzw. Polyphenolspektrum definierter Proben aus unterschiedlichen Anbausystemen zu ermitteln, um diese dadurch zu differenzieren? Dafür wurden methodisch der Carotinoidgehalt und der Polyphenolgehalt auf der Basis von Einzelsubstanzen mittels HPLC-Analytik untersucht. Daneben wurde der Gehalt der Gesamtcarotinoide photometrisch als Summenparameter für die Klasse der Carotinoide bestimmt.
2. Können messbare Unterschiede in diesen Proben trotz der im Kapitel 2 beschriebenen Variabilität in der Ausprägung mit einem bestimmten Anbausystem in Verbindung gesetzt werden und können die Proben dadurch klassifiziert werden?

Die Validierung gliedert sich also in zwei Teilschritte:

Zum einen wurden Validierungsmaßnahmen zur Charakterisierung jeder analytischen Messmethode durchgeführt. Dabei ist der Umfang dieser Maßnahmen abhängig von der Art der analytischen Fragestellung (Kap. 2.1). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb, soweit es sich als sinnvoll erwies, auf einige Schritte verzichtet. So wurden die linearen Bereiche nur so weit überprüft, dass sich alle Messwerte innerhalb dieser Bereiche befanden. Weiterhin wurde auf die Bestimmung der Nachweisgrenzen verzichtet. Diese sind nur dann erforderlich, wenn in speziellen Fällen Inhaltsstoffe nicht nachgewiesen werden oder es sich um Grenzprüfungen handelt. Bei der Durchführung der Validierung wurden jeweils frisch bereitete Extrakte verwendet.

Zum anderen sollte der Nachweis erbracht werden, dass das Gesamtverfahren ausreichend differenziert. Die Validität jeder Methodik ergibt sich nach Auswertung der

Messergebnisse der zum Zeitpunkt der Messungen codierten Proben durch geeignete statistische Verfahren. Die Validierungsfragen beziehen sich auf die mögliche Differenzierung und Klassifizierung der Probenmatrices Möhren, Weizen und Mais vor dem Hintergrund unterschiedlicher Kulturverfahren.

3.4.2 Validierungsumfang der analytischen Messmethoden

Der Validierungsumfang der eingesetzten analytischen Methoden enthielt die im Folgenden aufgeführten Punkte.

Linearität

Der Zusammenhang zwischen dem Messwert und der Konzentration wurde nach der Durchführung sämtlicher Prozessschritte an Standardlösungen durchgeführt. Dabei wurden Standardsubstanzen verwendet. Der lineare Messbereich der Realproben wurde anhand der Untersuchung von Proben unterschiedlicher Konzentrationsstufen ermittelt. Die bei KROMIDAS (1999) genannten Anforderungen an die Überprüfung auf drei bis zehn Konzentrationsniveaus, Konzentrationsniveaus in Äquidistanzen, ein konstantes Volumen der gemessenen Proben und die gleiche Anzahl von Messpunkten auf jedem Konzentrationsniveau wurden als Richtlinie zur Aufnahme der Kalibriergeraden verwendet.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die Linearität so überprüft, dass der Gehalt der Analyten in den Proben im Messbereich der linearen Datenaufnahme lag.

Präzision

Für die Durchführung dieser Arbeit wurden die Gerätepräzision, die Messpräzision, die Methodenpräzision und die Laborpräzision im Sinne der „intermediate precision“ mit jeweils einer weiteren Prüfperson bestimmt. Als Maß für die Präzision wurde der Variationskoeffizient (V_K) aus den Daten einer Mehrfachbestimmung verwendet.

Ob die Präzision einer Methode für die Fragestellung nach der Trennung von Proben auf der Grundlage des Gehaltes einzelner Inhaltsstoffe ausreicht, ist neben der Präzision

der Nachweismethode auch von den Unterschieden zwischen den zu unterscheidenden Proben abhängig. Die Kriterien für die akzeptierte Präzision ergeben sich deshalb aus den Unterschieden zwischen den untersuchten Proben. Für die Proben wurde deshalb der prozentuale Fehler untereinander errechnet. Anhand dieser Werte konnte vor dem Hintergrund der jeweiligen Methodenpräzision eine Eignung im Sinne der Fragestellung bewertet werden. Unterschiede, die in der Streubreite der Methodenpräzision liegen gelten nicht als signifikant.

Richtigkeit

Da es sich bei den vorliegenden Untersuchungen um Messungen von Proben unbekannter Zusammensetzung handelte, wurde die Wiederfindungsrate durch Aufstockungsversuche mit Co-Chromatographien ermittelt. Einer zuvor unter Standardbedingungen gemessenen Probe mit bekanntem Analytgehalt wurde eine definierte Menge Standardsubstanz zugefügt und erneut vermessen. Aus der Differenz der unbehandelten und der aufgestockten Probe wurde die Wiederfindungsrate (WF) errechnet.

Spezifität

Die Spezifität wurde durch den Vergleich der UV-Spektren in den Peakmaxima sowie den Wendepunkten nach Form und Lage beschrieben. Zur Überprüfung der Spezifität wurden alle Bestimmungsmethoden mit Diodenarray-Detektion durchgeführt. Für die Messungen von Polyphenolen in Möhren am WZW im Jahr 2002 konnte die Diodenarray-Detektion nur in Einzelfällen durchgeführt werden. Bei Übereinstimmung der Spektren in den Peakmaxima sowie den Wendepunkten nach der Form und der Lage, ist die Spezifität gegeben.

Robustheit

In der Durchführung dieser Arbeit wurde die Untersuchung der Robustheit durch die Anwendungen von Lösungsmitteln anderer Chargennummer und eine Durchführung der Messung in einem anderen Temperaturbereich durchgeführt. Darüber hinaus wurde der Einfluss des Säulenmaterials durch den Einsatz verschiedener Säulen überprüft.

3.4.3 Validierung des Gesamtverfahrens - Differenzierung und Klassifizierung

Nach der Überprüfung der analytischen Methoden auf ihre Eignung zur Messung der untersuchten Analyten in den Probenmatrices, wurde die Möglichkeit zur Differenzierung und Klassifizierung auf der Grundlage der Messwerte überprüft.

Die Messungen der codierten Proben und die statistische Auswertung der Daten erfolgte innerhalb der Projekte „Validierung ganzheitlicher Verfahren“ (Bundesprogramm Ökolandbau, Projekt 020E170) sowie „Differenzierung und Klassifizierung von Öko-Produkten mittels validierter, analytischer und ganzheitlicher Methoden“ (Bundesprogramm Ökolandbau, Projekt 020E170/F).

Eine Identifizierung einzelner Inhaltstoffe in den unterschiedlichen Proben erfolgte bis zum Termin der Decodierung nicht. Zur Auswertung wurde deshalb der Quotient aus der gemessenen Peakfläche der Analyten und der Peakfläche der jeweiligen internen Standards ($PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$) herangezogen.

Die internen Standards wurden für die jeweiligen untersuchten Analyten (Polyphenole bzw. Carotinoide) aus Literatur bekannten Methoden gewählt. Die gewählten Substanzen entsprechen in ihren chemischen Eigenschaften den jeweils gemessenen Stoffklassen und sind keine natürlichen Bestandteile der Probenmatrices. Unter der Annahme des gleichen Extraktionsverhaltens der Analyten und des jeweiligen internen Standards konnten durch die Verwendung des Peakflächenquotienten die Messwerte um die Extraktionsausbeute bereinigt werden. Mittels Kontrolle der UV-Spektren wurde bestätigt, dass die Standardsubstanzen unter den gewählten HPLC-Bedingungen nicht mit den Analyten der Proben koeluieren.

Als interner Standard für die Carotinoidanalytik wurde β -apo-8-Carotenal gewählt. Diese Substanz ist als interner Standard für die Carotinoidanalytik in nicht chlorophyllhaltigen Probenmatrices in der Literatur beschrieben (HART ET AL., 1995; HENTSCHEL ET AL., 2002; RODRIGUEZ-AMAYA ET AL. 2004).

Für die Analytik der phenolischen Bestandteile in Möhren wurde die synthetische Substanz 6-Methoxyflavon ausgewählt (TREUTTER ET AL., 1988).

Im Hinblick auf die Validierungsfragen erfolgte die statistische Auswertung in zwei Schritten. Zum einen wurde die Fähigkeit zur Differenzierung von Proben durch die

Messergebnisse geprüft, zum anderen wurde die Möglichkeit der Klassifizierung verschiedener Proben anhand der Messergebnisse überprüft. Als Grundlage der Auswertung dienten die deskriptiven Kennzahlen Mittelwert, Standardabweichung und Probenumfang.

Für die Differenzierung der Möhrenproben aus den Jahren 2002 und 2003 wurden die Daten auf Homogenität der Varianzen überprüft und soweit zulässig erfolgte eine Auswertung mittels ANOVA. Bei Inhomogenität der Varianzen erfolgte die Auswertung mittels Tukey Kramer HSD. Die Gruppierung der codierten Proben wurde mittels linearer Diskriminantenanalyse (LDA) durchgeführt.

Für die Differenzierung der Daten des Carotinoidgehaltes in Weizen, des Carotinoidgehaltes in Möhren, des Carotinoidgehaltes in Mais sowie des Polyphenolgehaltes in Möhren (2004) wurden ANOVA und LME/pairwise tests berechnet. Tabellen der t- und der p-Werte finden sich im Anhang. Die Art und Qualität der Verteilung der Messwerte sowie die Lage des Medians in der gesamten Stichprobe wurden als Boxplot dargestellt.

Die Klassifizierung der codierten Proben erfolgte für die Messergebnisse des Polyphenolgehaltes in Möhren und des Carotinoidgehaltes in Mais mittels LDA. Eine prospektive Klassifizierung nach dem Anbausystem konnte aufgrund einer fehlenden Datengrundlage aus eigenen bzw. aus Literaturwerten nicht erfolgen. Eine datengestützte Klassifizierung der Proben nach dem Anbausystem mit dem CART (Classification and Regression Tree) Verfahren erfolgte erst nach der Decodierung.

Tree-Verfahren sind rekursiv partitionierende Verfahren, durch deren Anwendung Beziehungen von einzelnen oder mehreren Einflussgrößen (X-Variablen) auf eine abhängige (Y-)Variable (response variable) dargestellt werden. Die Ergebnisse der Gruppierungen werden als Baum dargestellt. Gruppen werden dabei durch Blätter symbolisiert und die Äste entsprechen den Trennungsschritten. Die Güte des Baumes (RSquare), die Anzahl der verarbeiteten Fälle (N) und die Gesamtzahl an ersetzten fehlenden Werten innerhalb aller beteiligten Variablen (Imputes) wird durch die Tabelle der Split Statistik dargestellt. Die Anpassungsgüte des Baums ist umso höher, je stärker sich RSquare dem Wert 1 nähert (KAHL ET AL., 2007).

Die statistischen Auswertungen zur Differenzierung und Klassifizierung wurden von der Firma Statcon (Dipl. Volkswirt, B. Schäfer, Witzenhausen) durchgeführt. Als Software wurden die Pakete R Version 2.1 und JMP Version 6.0 verwendet.

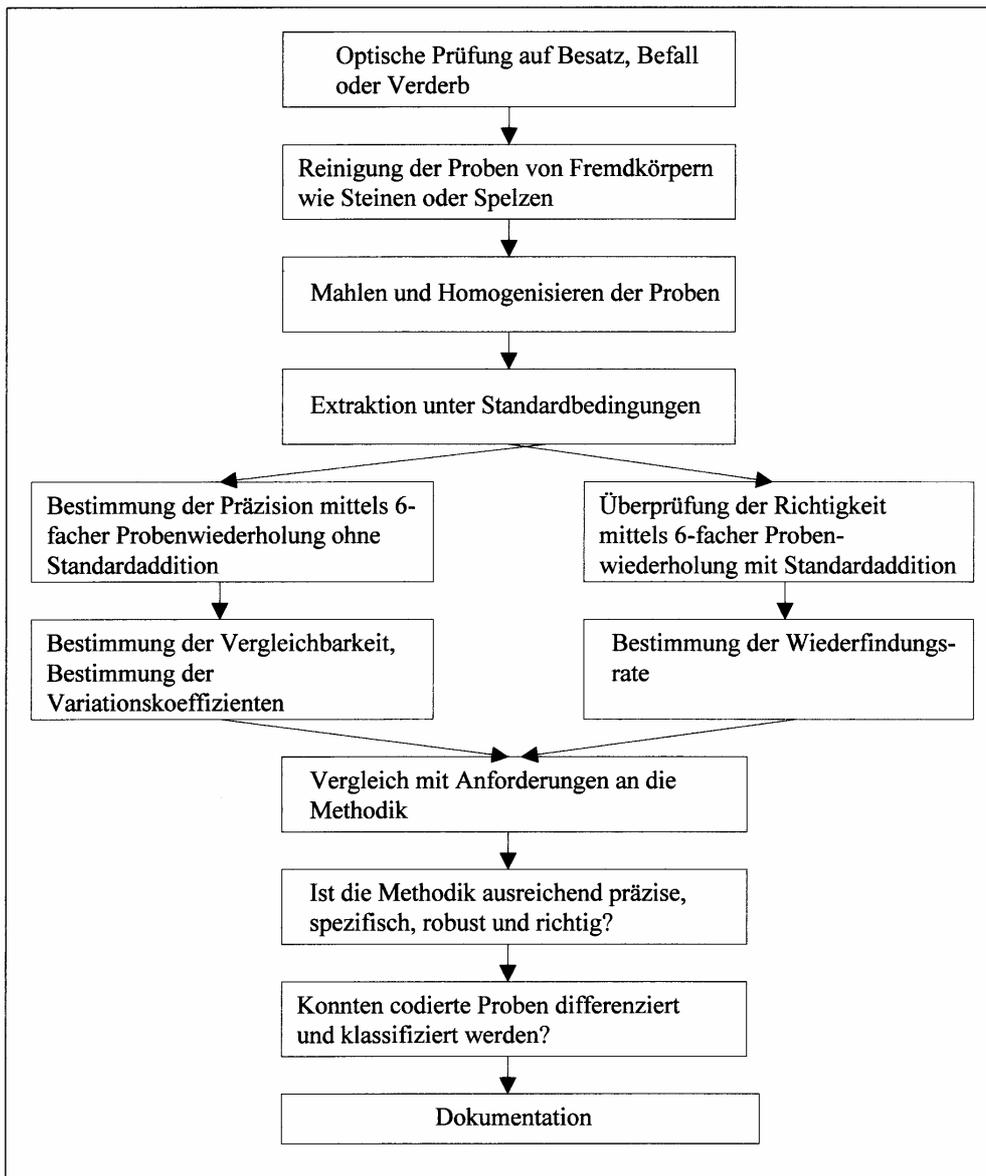


Abbildung 3-1: Fließschema einer Validierung am Beispiel der untersuchten Weizenproben.

4 Ergebnisse

In den vorliegenden Untersuchungen wurden die Verfahren zur Bestimmung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe in Möhren, Weizen und Mais als Gesamtverfahren validiert. Als Ergebnisse werden daher an dieser Stelle die Ergebnisse der Maßnahmen zur Prüfung der analytischen Verfahren (Eigenanteil) sowie die Differenzierung und die Klassifizierung der Proben gemäß den Validierungsfragen (Fa. Statcon) vorgestellt.

Für keines der untersuchten Produkte stand für die Messungen geeignetes Standardmaterial mit definiertem Gehalt dieser Substanzen zur Verfügung. Um eine Aussage über die Parameter Linearität einzelner Inhaltsstoffe, Spezifität und Richtigkeit des HPLC-Verfahrens treffen zu können, wurden die Inhaltsstoffe so weit wie möglich identifiziert. Eine Identifizierung beschränkte sich auf solche Substanzen, die aus der Literatur als Inhaltsstoffe der jeweiligen Produkte bekannt und als reine Standardsubstanzen erhältlich sind. Der Umfang der Identifizierung ist in den jeweiligen Kapiteln beschrieben.

Die Ergebnisse der Identifizierungen sind den Beschreibungen der Validierungsschritte vorangestellt. Nicht identifizierte Peaks werden im weiteren Verlauf als Peak + laufende Nummer bezeichnet und unter diesen Bezeichnungen als Unterscheidungsparameter im Sinne der Validierungsfragen einbezogen.

4.1 Messungen der Carotinoide in Weizen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Carotinoidgehalt in Weizenproben einer Sorte aus Anbau mit verschiedener N-Düngungsstufe aus dem DOK-Versuch und der Carotinoidgehalt in Weizen-Erzeugerproben untersucht. Diese Proben bestanden aus Betriebspaaren aus konventionellem und ökologischem Anbau, wobei Weizen verschiedener Sorten und unterschiedlicher geografischer Herkunft Verwendung fand.

4.1.1 Identifizierung

Die HPLC-Untersuchungen ergaben ein dreigipfliges Chromatogramm, in welchem der Peak Nr. 3 dem internen Standard β -apo-8-Carotenal entspricht. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der Abbildung 4-1 dargestellt.

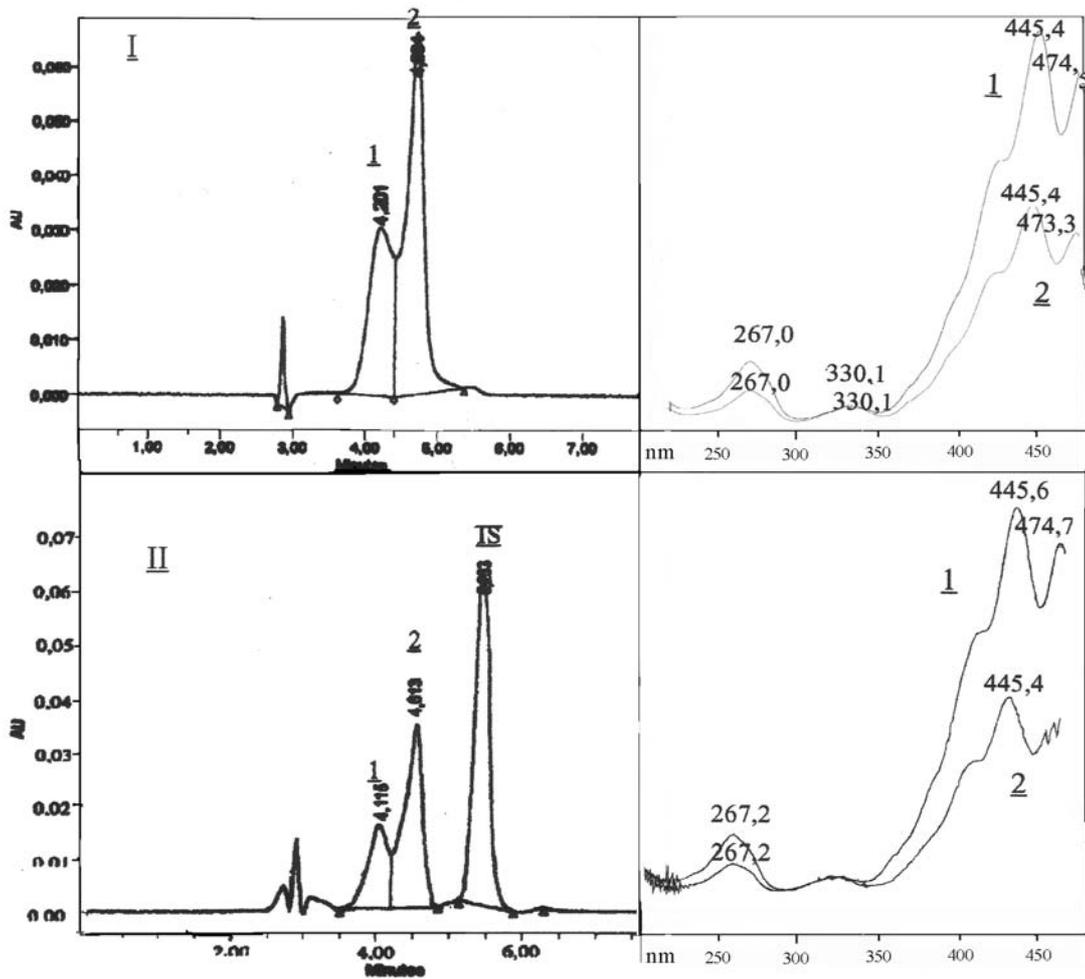


Abbildung 4-1: Identifizierung von Lutein in Weizenproben. Darstellung der Chromatogramme einer Lutestandardlösung (I) und einer Weizenprobe aus den Messungen 2004 (II), IS = Interner Standard. Nebenstehend die UV-Spektren der jeweiligen Peaks Nr. 1 und 2.

Die Peaks Nr. 1 und 2 entsprechen hinsichtlich der Retentionszeiten und den Absorptionsmaxima in den UV-Spektren denen von Lutein-Standardsubstanz. Für die Berech-

nungen des Luteingehaltes wurden der Peak Nr. 1 und der Peak Nr. 2 deshalb zusammengefasst und als Lutein berechnet. Die unvollständige Trennung der beiden Peaks könnte im Sinne eines Frontings erklärt werden. In späteren Untersuchungen am gleichen Material mit veränderter Extraktion der Proben stellte sich Lutein als einzelner Peak dar (Weizen-Messungen 2005). Eine mögliche Trennung in Luteinisomere erscheint aus diesem Grund unwahrscheinlich. In keiner der untersuchten Weizenproben konnten neben dem Lutein weitere Substanzen nachgewiesen werden. Hinweise auf die Anwesenheit der Substanzen β -Carotin und β -Cryptoxanthin ergeben sich aus diesen Messungen nicht.

Neben der Identifizierung einzelner Carotinoide dienten diese Messungen auch noch zur Bestimmung der Spezifität und der Richtigkeit des HPLC-Verfahrens. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in den jeweiligen Kapiteln vorgestellt.

4.1.2 Validierungsschritte der HPLC-Analytik von Carotinoiden in Weizen

4.1.2.1 Linearität

Linearität des internen Standards β -apo-8-Carotenal

Tabelle 4-1: Linearität des internen Standards β -apo-8-Carotenal in 6 Konzentrationsstufen

Nr.	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Peakfläche (AU*min)	s	V_K
1	100	54802464	920631	1,68
2	80	43804225	656461	1,50
3	60	32644838	495204	1,52
4	40	21959592	358557	1,63
5	20	12053696	309615	2,57
6	0,62	365038	9924	2,72

Die Linearität von β -apo-8-Carotenal wurde mit einer Standardverdünnungsreihe im Konzentrationsbereich zwischen 0,62 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt. Die Standardsub-

stanz hatte eine Reinheit von > 98 % (Fluka). Für die Bestimmung wurde eine Verdünnungsreihe aus 6 Konzentrationsstufen in 6-facher Probenwiederholung mit allen Prozessschritten der Extraktion erstellt und mit der HPLC vermessen.

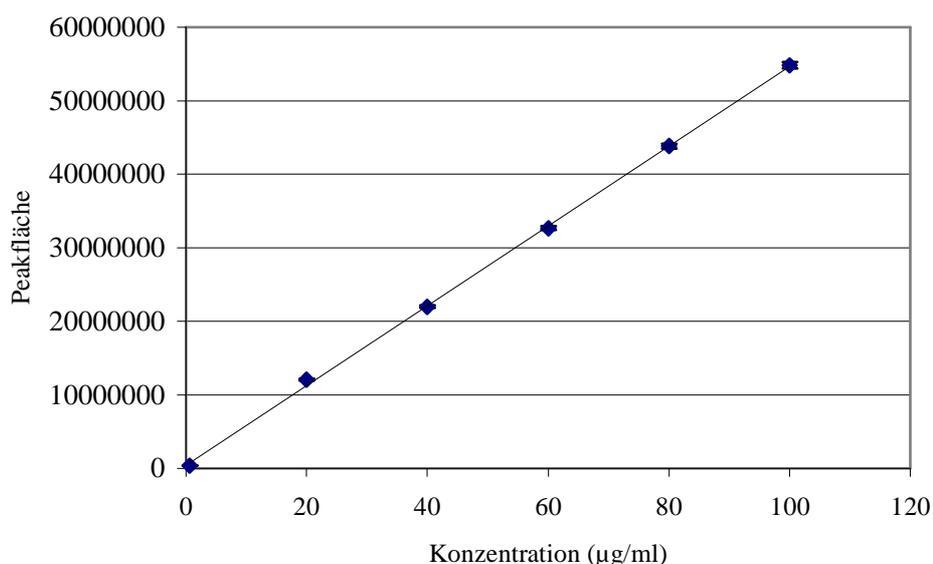


Abbildung 4-2: Linearität des internen Standards β -apo-8-Carotenol. Abgebildet sind die Mittelwerte der gemessenen Peakfläche (AU*min) einer 6-fachen Probenwiederholung und die Standardabweichungen.

Es ergibt sich eine lineare Regression mit hoher Korrelation.

Geradengleichung: $y = 542545x + 421664$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,999$

Linearität von Lutein-Standardlösungen

Die Linearität von Lutein wurde in einem Konzentrationsbereich von 3 µg/ml und 87,5 µg/ml bestimmt. Die eingesetzten Standardlösungen wurden aus kristalliner Lutein-Standardsubstanz mit einer Reinheit von > 98 % (Roth) als Lösung in einer Mischung aus THF/MeOH (1:1, v:v) in 6-facher Probenwiederholung mit allen Prozessschritten der Extraktion angefertigt und unter den Standardbedingungen vermessen. Aus den

Messungen mittels HPLC-Analytik der beschriebenen Standardlösungen ergab sich ein Chromatogramm in dem zwei Peaks mit den Retentionszeiten von R_t : 3,89 min und R_t : 4,44 min mit identischem UV-Spektrum reproduzierbar detektiert wurden. Für die Auswertung wurden die Messergebnisse beider Peaks addiert. Die Konzentrationsintervalle der Kalibriergeraden sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 4-2: Linearität von Lutein-Standardlösungen in verschiedenen Konzentrationsstufen

Nr.	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Peakfläche (AU*min)	s	V_K
1	3	498515	5104,85	3,72
2	12,5	2200594	30436,80	2,46
3	25	4469946	28945,23	2,23
4	37,5	6687160	45252,04	2,19
5	50	9387637	54750,91	2,13
6	62,5	11951167	218419,94	1,84
7	87,5	16087654	172333,75	1,59

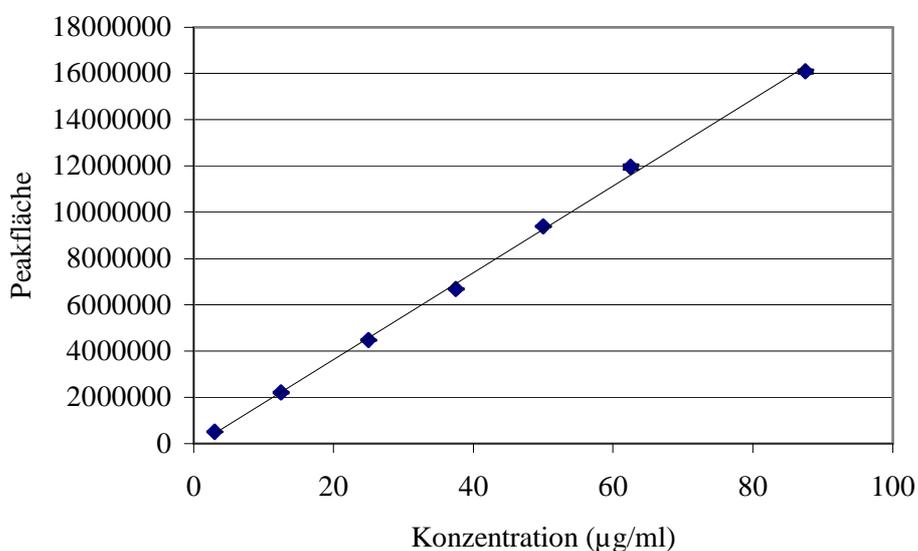


Abbildung 4-3: Linearität von Lutein-Standardlösungen in 7 verschiedenen Konzentrationen. Peak Nr. 1 ($R_t = 3,89$ min) und Peak Nr. 2 ($R_t = 4,44$ min) wurden für die Berechnung zusammengefasst.

Es ergibt sich eine lineare Regression mit hoher Korrelation.

Geradengleichung: $y = 187578 x - 123449$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,99$

Mit den Messungen kann die Linearität der Substanzen in den jeweiligen Messbereichen mit einem hohen Bestimmtheitsmaß bestätigt werden. Alle in den Probenmessungen erhobenen Messwerte liegen im Bereich der linearen Datenaufnahme der HPLC-Anlage. Die Messungen entsprechen den Anforderungen an mehrere Konzentrationsniveaus in Äquidistanzen. Die Methode erweist sich als linear.

4.1.2.2 Präzision

Die Bestimmung der Präzision wurde unterteilt in die Bestimmung der Gerätepräzision, der Messpräzision und der Methodenpräzision. Weiterhin wurde die intermediate precision mit einer zweiten Prüfperson bestimmt.

Für die Ermittlung der Gerätepräzision wurden Lösungen der Standardsubstanz Lutein und β -apo-8-Carotenal erstellt und in 6-facher Messwiederholung mit der HPLC vermessen. Um mögliche Einflüsse durch Faktoren aus der Probenmatrix zu ermitteln, wurde die Messpräzision mit Realproben ermittelt. Diese wurden in 6-facher Messwiederholung mit der HPLC unter Standardbedingungen untersucht.

Für die Ermittlung der Methodenpräzision wurden die Messergebnisse aller Probenwiederholungen ausgewertet. Berechnet wurden die Standardabweichung und der Variationskoeffizient. Für die Bestimmung des Luteins wurden der Peak Nr. 1 und der Peak Nr. 2 als Lutein zusammengefasst.

Tabelle 4-3: Präzision in Weizenproben

	Gerätepräzision V_K	Messpräzision V_K	Methodenpräzision V_K
Lutein	0,21 %	1,02 %	2,5 %
β -apo-8-Carotenal	0,34 %	1,36 %	2,18 %

Intermediate precision

Die Prüfung der laborinternen Präzision wurde exemplarisch mit der Weizenprobe A 1018 (DOK-Weizenproben) durchgeführt. Dafür wurde der Weizen von zwei Prüfern

unter den Standardbedingungen in jeweils 6-facher Probenwiederholung aufbereitet und extrahiert. Diese Extrakte wurden direkt im Anschluss an die Extraktion am selben Tag am selben Gerät unter den gleichen Bedingungen mit der HPLC vermessen.

Als statistische Größen der Präzision wurden die Standardabweichung (s) und der Variationskoeffizient (V_K) ermittelt.

Tabelle 4-4: Intermediate precision in Weizen

	Peakfläche (AU*min)	s	V_K (%)
Lutein (Prüfer 1)	1588415,67	48502,26	3,05
Lutein (Prüfer 2)	1507909,17	47549,10	3,15
β -apo-8-Carotenal (Prüfer 1)	1200627,33	25363,89	2,11
β -apo-8-Carotenal (Prüfer 2)	1235278,67	35536,99	2,88

Die Bestimmungen der Gerätepräzision und der Messpräzision beziehen sich nur auf den instrumentellen Messvorgang. Für Messungen mittels HPLC-Analytik liegen die Werte der akzeptierten Präzision in der Regel bei Werten des V_K von < 1 % (KROMIDAS, 1999). In den vorliegenden Messungen konnten diese Anforderungen an die Geräte- und die Messpräzision in allen Messungen erfüllt werden.

Als Voraussetzung für die Ermittlung der Präzision wurden alle Messungen der Präzision auf Normalverteilung mittels des Tests nach David (KROMIDAS, 1999) überprüft. Für die vorliegenden Untersuchungen konnte während der Messungen zur Mess- und Gerätepräzision die Normalverteilung bestätigt werden.

Die Richtwerte für den Pharmabereich hinsichtlich der Methodenpräzision von $V_K = 1$ -10 % bei einem Analytgehalt < 1 % (KROMIDAS, 1999) konnten in allen Messungen der Methodenpräzision erfüllt werden. Die Luteingehalte der Proben liegen mit Werten von 2,80 $\mu\text{g/g}$ und 3,69 $\mu\text{g/g}$ in einem Bereich < 1 %. Die Anforderungen an die Präzision können für diese Substanzen somit erfüllt werden.

Die Präzision nimmt beim Übergang von der Geräte- zur Messpräzision bis zur Methodenpräzision ab, was durch den Vorgang der Extraktion und mögliche Einflüsse durch die Probenmatrix erklärt werden kann. Die Grenzen für die Methodenpräzision können ebenfalls von den Messungen der intermediate precision eingehalten werden, obwohl in diesen Messungen mit einer weiteren Prüfperson eine zusätzliche „Fehlerquelle“ vorhanden ist. Die Methodenpräzision kann vor dem Hintergrund der erwähnten Richtwer-

te als gut bezeichnet werden. Das Zusammenfassen des Peaks Nr. 1 und des Peaks Nr. 2 als Lutein erscheint damit berechtigt. Die Präzision ist nach diesen Kriterien gegeben. Die Güte der Methodenpräzision für die vorliegenden Fragestellungen zur Differenzierung und Klassifizierung von Weizen durch den Luteingehalt, ergibt sich jeweils vor dem Hintergrund der Unterschiede der jeweiligen Proben. Für alle gemessenen Proben wurden die Probenunterschiede berechnet und vor dem Hintergrund der jeweiligen Methodenpräzision ausgewertet.

4.1.2.3 Wiederfindung

Durch die Ermittlung der Wiederfindungsrate wurde die Richtigkeit der Methode überprüft. Dafür wurden 6 bereits vermessene Ansätze der Weizenproben mit einer bekannten Menge der Standardsubstanz Lutein versetzt und mit der HPLC gemessen. Aus der Differenz der Analyten in den aufgestockten Proben und den nicht aufgestockten Proben wurde die Wiederfindungsrate (WF) berechnet.

Tabelle 4-5: Wiederfindung von Lutein in aufgestockten Weizenproben

Lutein, zugesetzt (µg)	Lutein, berechnet (µg)	Lutein, gemessen (µg)	WF (%)
1	8,85	8,56	96,71
2	9,72	9,46	97,29
4	12,40	12,04	97,05
6	14,10	13,57	96,26
8	16,57	16,11	97,22
10	18,07	17,55	97,08

Die Bestimmung der Wiederfindung des internen Standards wurde aus den Messwerten zur Messpräzision, zur Methodenpräzision und zur Bestimmung der intermediate precision errechnet. Zur Bestimmung des wahren Wertes wurden nach jeweils 5 HPLC-Läufen Lösungen des internen Standards, die der rechnerischen Konzentration der Proben entsprachen, unter den Standardbedingungen mit der HPLC vermessen. Aus der Differenz der Messergebnisse wurde die Wiederfindungsrate berechnet und in der fol-

genden Tabelle (4-6) dargestellt. Als Berechnungsgrundlage diente die gemessene Peakfläche.

Tabelle 4-6: Wiederfindungsrate von β -apo-8-Carotenal in Weizenproben

Wiederfindungsrate (%) des internen Standards bei Messungen zur:		
Messpräzision	Methodenpräzision	Intermediate precision
98,39 % - 99,81 %	96,48 % - 99,28 %	95,14 % - 102,35 %

In allen Messungen zur Wiederfindung liegt der Gehalt der Standardsubstanzen in einem Bereich < 1 %. Für Wirkstoffgehalte < 1 % liegen die Richtwerte für die akzeptierte Wiederfindung mit Messungen mittels HPLC-Analytik in einem Bereich zwischen 95,0 % - 105,0 % (KROMIDAS, 1999). Die Ergebnisse der Messungen entsprechen demnach den Anforderungen an die Wiederfindung. Die Richtigkeit der Methode kann damit bestätigt werden.

Wiederfindungsraten > 100 % können durch chromatographisch nicht getrennte Bestandteile der Probenmatrix bedingt sein (KROMIDAS, 1999). Derartige Größenordnungen können auch in den vorliegenden Wiederholungsmessungen beobachtet werden. Einflüsse der Weizenmatrix auf die Wiederfindung der Carotinoide in den Proben sind daher nicht auszuschließen, beziehen sich jedoch nur auf einzelne Proben. Ein Zusammenhang mit einzelnen Gesamtproben kann nicht beobachtet werden. Die Eignung des internen Standards für die vorliegenden Messungen ist damit gegeben.

4.1.2.4 Robustheit

Zur Überprüfung der Robustheit der Methode wurde die Störanfälligkeit gegenüber dem Methodenparameter der Säulentemperatur ermittelt. Darüber hinaus wurde der Einfluss durch die Wahl der HPLC-Säule mit einer weiteren Säule überprüft.

Einfluss der Säulentemperatur

Weizen aus dem DOK-Versuch der Anbauvariante „ohne Düngung“ wurde nach den Standardbedingungen aufbereitet und in 5-facher Probenwiederholung mit der HPLC vermessen. Alle Probenmessungen wurden jeweils bei einer Säulentemperatur von 20 °C (Standardbedingungen) und zum Vergleich bei 25 °C und 40 °C wiederholt. Die resultierenden Chromatogramme sind in der Abbildung 4-4 (nächste Seite) dargestellt.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt sich eine Verschiebung der Retentionszeiten, die bei allen Proben gemessen werden konnte. Gleichzeitig lässt die Trennleistung des Systems nach. Mit der Verschiebung der Peaks geht eine zunehmende Überlappung der Peaks des Luteins einher. Gleichzeitig nimmt bei allen Substanzen mit steigender Säulentemperatur das Messsignal ab, während sich die Standardabweichungen und die jeweiligen Variationskoeffizienten erhöht. Von diesen Veränderungen sind die Peaks Nr. 1 und Nr. 2 (Lutein) stärker betroffen als der interne Standard β -apo-8-Carotenal.

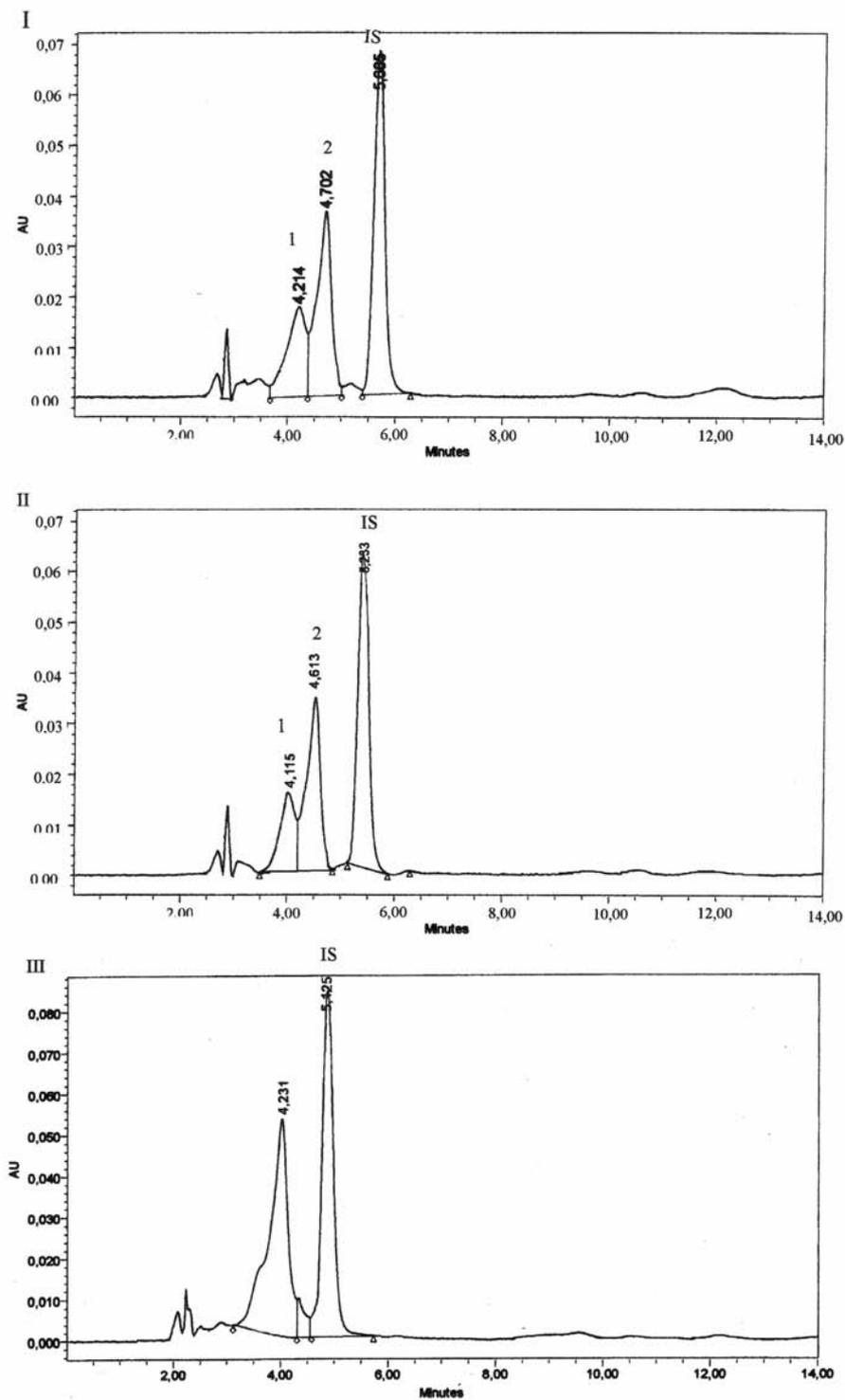


Abbildung 4-4: Chromatogramme von Weizenproben mit einer Vydac 201TP Säule bei unterschiedlichen Säulentemperaturen. I = HPLC-Lauf bei 20 °C, II = HPLC-Lauf bei 25 °C, III = HPLC-Lauf bei 40 °C. Darstellung der Chromatogramme einer DOK-Weizenprobe der Variante ohne Düngung.

Einfluss der HPLC-Säule

In der Durchführung wurden Weizenproben unter den Standardbedingungen mit der HPLC vermessen, wobei zur Trennung eine andere Säule (Waters, Nova-Pak, C18, 3,9 x 150 mm) zum Einsatz kam.

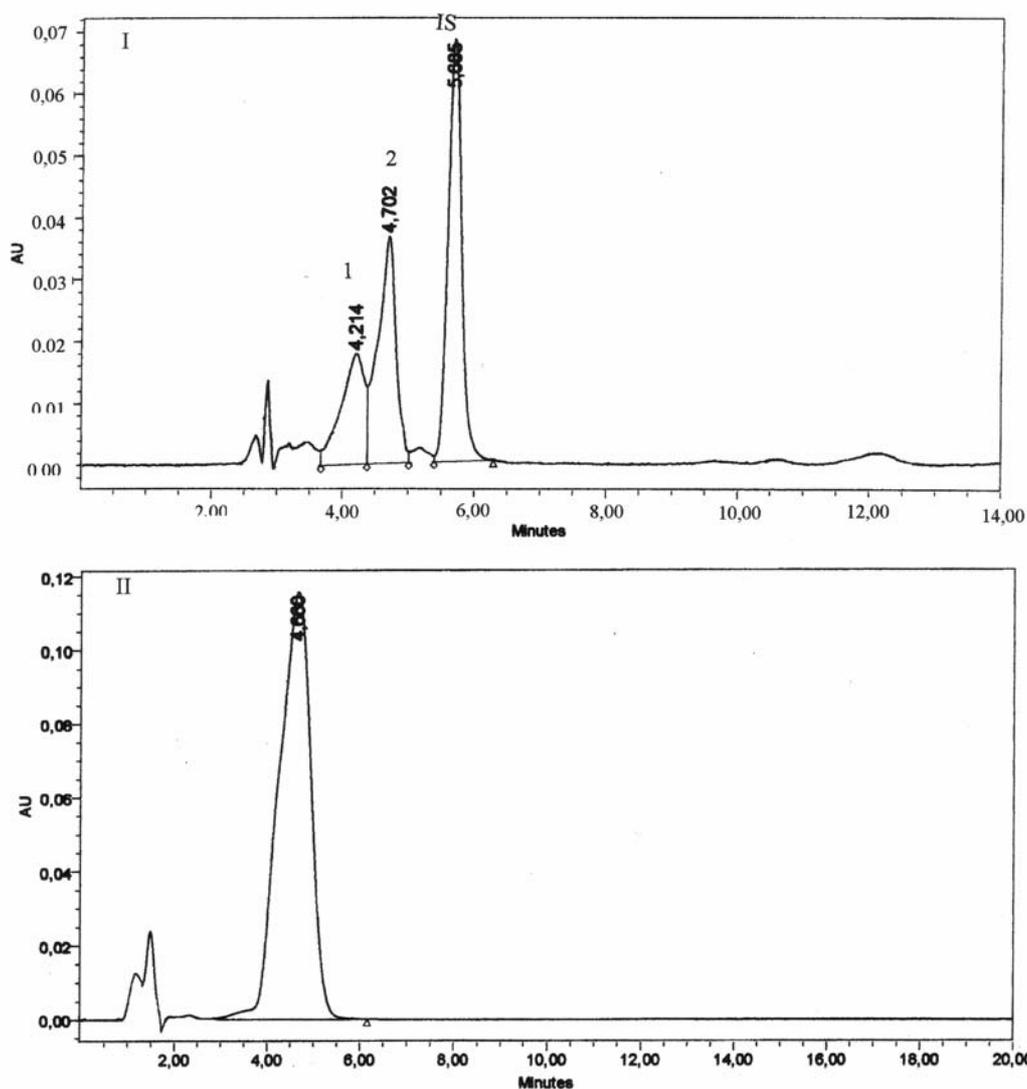


Abbildung 4-5: Chromatogramme von Weizenproben mit unterschiedlichen Säulen. I = Säule: Vydac 201TP54, II = Säule: Waters, Nova-Pak, C18, 3,9 x 150 mm.

Durch den Einsatz einer zweiten Säule kann die Störanfälligkeit des Messergebnisses gegenüber diesem Faktor gezeigt werden. In der zweiten Untersuchung verschiebt sich

die Retentionszeit der Analyten, dabei wird ein einzelner Peak mit einer Retentionszeit von 4,66 min detektiert. Eine Trennung von Lutein und dem internen Standard ist unter den veränderten Bedingungen nicht möglich.

4.1.3 Photometrische Bestimmung der Summe der Carotinoide in Weizen

Die Untersuchung des Gehaltes der Gelbpigmente in den Weizenproben erfolgte nach einer ICC Methode (152) mit bei HENTSCHEL (2001) beschriebenen Modifikationen. Für die vorliegenden Messungen beschränkte sich die Prüfung der Methode auf eine Grundkalibrierung, welche die Punkte der Linearität und der Präzision umfasst.

4.1.3.1 Präzision

Die Ermittlung der Präzision wurde in die Messung der Gerätepräzision und der Methodenpräzision unterteilt. Dafür wurde eine Kalibriergerade mit Lutein-Standardlösungen (Roth) in THF/MeOH (1:1, v:v) im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 µg/ml und 13 µg/ml aufgenommen und ausgewertet.

Die Gerätepräzision wurde durch die 6-fache Messwiederholung der Standardlösungen ermittelt.

Die Messpräzision wurde durch Messungen der Lutein-Standardlösungen in den unterschiedlichen Konzentrationen als 6-fache Probenwiederholung ermittelt. Als Ausgangslösung diente eine Lutein-Standardlösung der Konzentration 0,1 mg/ml.

Die Methodenpräzision wurde aus allen Messungen berechnet. Die Methode zur photometrischen Bestimmung von Lutein erweist sich in einem Konzentrationsbereich zwischen 1,5 µg/ml und 13 µg/ml als präzise.

Die Methodenpräzision in diesem Bereich liegt bei 2,62 %. Störende Einflüsse aus der Probenmatrix auf das Messergebnis scheinen somit nicht vorzuliegen.

Tabelle 4-7: Gerätepräzision und Messpräzision der photometrischen Messungen des Gesamtcarotinoidgehaltes

Lutein ($\mu\text{g/ml}$)	Gerätepräzision			Messpräzision		
	MW	s	V_K	MW	s	V_K
13	2,11	0,02	0,72	2,12	0,05	2,37
9	1,50	0,01	0,73	1,51	0,03	2,23
6,3	1,05	0,01	0,66	1,08	0,03	2,77
3	0,53	0,00	0,76	0,53	0,01	2,75
1,5	0,26	0,00	1,60	0,26	0,01	2,98
0,1	0,02	0,00	9,09	0,02	0,00	11,08

4.1.3.2 Linearität

Die Überprüfung der Linearität und die Bestätigung des Messbereiches für die Proben erfolgten mittels einer Kalibriergeraden, die auf der Basis der Messergebnisse für die Bestimmung der Messpräzision errechnet wurde. Die Quantifizierung des Gesamtcarotinoidgehaltes erfolgte mittels dieser Kalibriergeraden als Lutein.

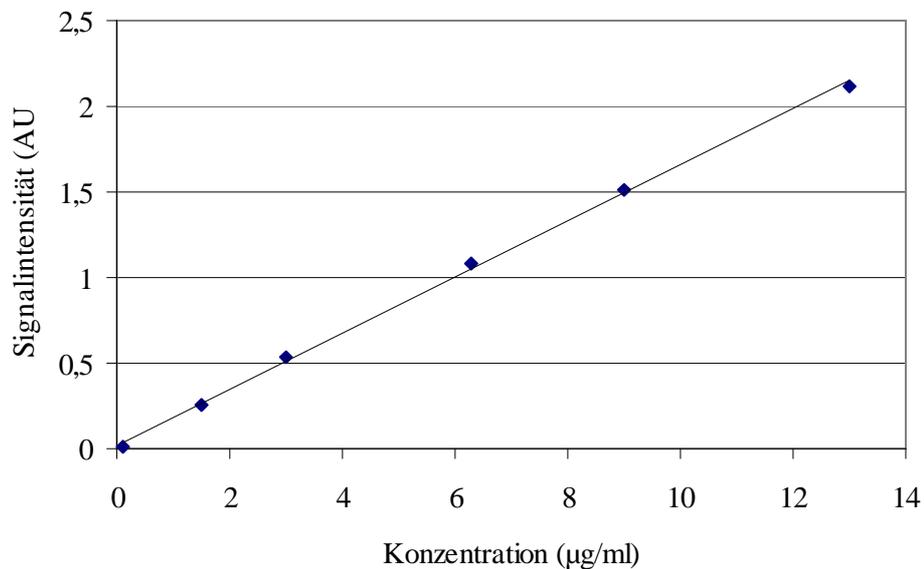


Abbildung 4-6: Kalibriergerade für Lutein. Dargestellt sind die Mittelwerte einer 6-fachen Probenwiederholung und die Standardabweichung mit Lutein-Standardlösungen bei 447 nm.

Es ergibt sich eine lineare Regression mit einer hohen Korrelation.

Geradengleichung: $y = 0,1633x + 0,0254$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,991$

Für die Referenzsubstanz der Messungen, das Lutein, besteht in einem Bereich zwischen 0,1 µg/ml und 13 µg/ml ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten und dem Messsignal. Dabei erweist sich die Methode sich in einem Konzentrationsbereich zwischen 1,5 µg/ml und 13 µg/ml als präzise. Damit ist der Arbeitsbereich relativ klein, die Proben konnten in den durchgeführten Messungen durch Verdünnung an den benötigten Messbereich angepasst werden.

4.1.4 Carotinoide in Weizen – Ergebnisse

Nach der erfolgreichen Prüfung der Methodiken zur Messung von Carotinoiden in Weizen sollte anschließend an die Quantifizierung der identifizierten Inhaltsstoffe die Eignung der Methodik zur Differenzierung und Klassifizierung von Weizenproben überprüft werden.

Aus dem Probenmaterial ergeben sich Differenzierungs- und Gruppierungsmöglichkeiten auf der Grundlage der unterschiedlichen Düngung und den unterschiedlichen Anbausystemen.

4.1.4.1 Messungen des Carotinoidgehaltes in Weizen (2004)

Messungen mittels HPLC-Analytik

Für die Berechnungen des Luteingehaltes wurden der Peak Nr. 1 und der Peak Nr. 2 zu einem Gesamtpeak zusammengefasst und als Lutein berechnet. Für die Berechnung des Luteingehaltes wurde die folgende Formel verwendet:

$$\mu\text{g Lutein/g} = \frac{b \cdot 0,8}{2}$$

b = durch lineare Regression erhaltener Wert

0,8 = Volumen des Gesamtextraktes (ml)

2 = eingesetzte Probe (g)

Photometrische Messungen des Gesamtcarotinoidgehaltes

Der Gehalt der Summe der Gelbpigmente wurde aus dem gleichen Material bestimmt, aus welchem auch der Carotinoidgehalt mittels HPLC bestimmt wurde. Für die Berechnung des Gehaltes der Gelbpigmente als Lutein wurde die folgende Formel verwendet:

$$\mu\text{g Lutein/ml} = \frac{b \cdot v}{V}$$

b = durch lineare Regression erhaltener Wert in $\mu\text{g/ml}$

v = Volumen der Messlösung (ml)

V = eingesetztes Probenvolumen (ml)

Die Ergebnisse der Einzelstoffmessungen mittels HPLC und die Ergebnisse der photometrischen Messungen sind der Tabelle 4-8 dargestellt.

Tabelle 4-8: Luteingehalt, Gesamtcarotinoidgehalt und Gehalt gelber Pigmente in Weizen

Code	Probenvariante	Lutein ($\mu\text{g/g TM}$), HPLC-Analytik	Lutein ($\mu\text{g/g TM}$), Photometrische Messung	Nicht identifizierte Gelbpigmente ($\mu\text{g Lutein/g}$)
A 1	'Capo', Öko	3,24	4,67	1,43
A 2	'Capo', Konventionell	3,31	4,57	1,26
B 1	'Capo', Konventionell	3,09	4,87	1,79
B 2	'Capo', Öko	3,17	4,46	1,28
C 1	'Capo', Konventionell	3,12	4,86	1,74
C 2	'Capo', Öko	3,33	4,42	1,09
D 1	'Bussard', Öko	3,47	4,47	0,99
D 2	'Bussard', Konventionell	3,23	4,06	0,83
E 1	'Asketis', Öko	3,30	4,62	1,32
E 2	'Asketis', Konventionell	3,25	4,09	0,84
F 1	'Asketis', Konventionell	3,42	3,90	0,48
F 2	'Asketis', Öko	3,49	5,05	1,56
A	Ohne Düngung	3,67	6,28	2,61
B	Mineralische Düngung	2,93	5,60	2,62
C	Biologisch-dynamische Düngung	3,17	5,53	2,36
D	Organisch-biologische Düngung	3,07	5,48	2,39
E	Konventionelle Düngung	2,78	5,90	3,12

Durch den Vergleich der Messergebnisse des Luteingehaltes mittels der HPLC-Analytik und der Messungen des Gehaltes der Gelbpigmente zeigt sich, dass zwischen diesen Messwerten keine starke Korrelation besteht. Die Summe der Gelbpigmente kann nur zum Teil durch die Substanz Lutein erklärt werden, wobei diese Beobachtung in allen untersuchten Weizenproben bestätigt werden kann.

Aus der Differenz beider Messergebnisse wurde der Anteil der nicht identifizierten Gelbpigmente ermittelt. Der Anteil des Lutein an den Gelbpigmenten liegt in den Proben aus dem DOK-Versuch zwischen 47,48 % und 58,78 %, der Korrelationskoeffizient bei $r = 0,600$. In den Weizen-Erzeugerproben liegt der Anteil des Lutein an der Fraktion der Gelbpigmente zwischen 63,35 % und 87,69 %, der Korrelationskoeffizient beträgt $r = -0,154$.

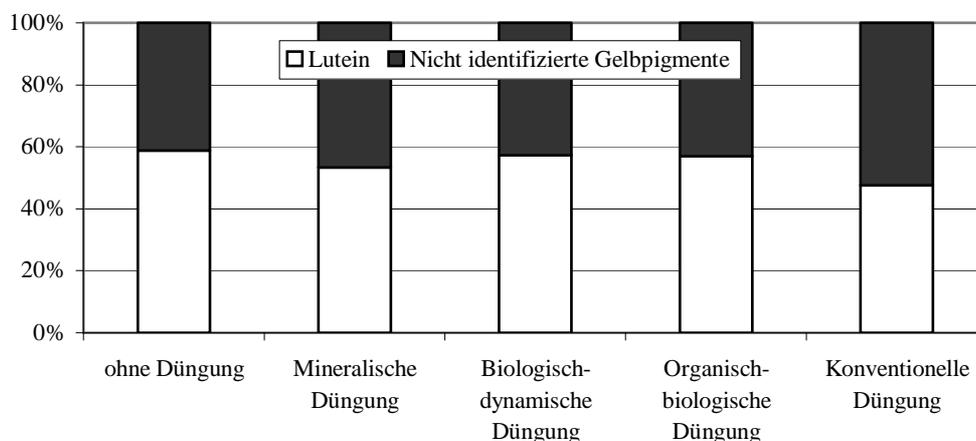
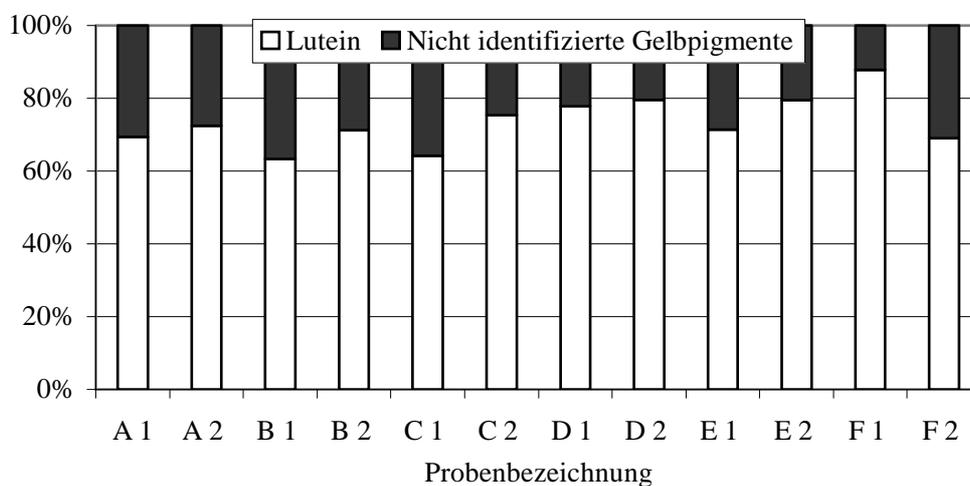


Abbildung 4-7: Anteil des Luteins an der Fraktion der photometrisch gemessenen Gelbpigmente in DOK-Weizenproben.



A 1:	‘Capo’, Öko	D 1:	‘Bussard’, Öko
A 2:	‘Capo’, Konventionell	D 2:	‘Bussard’, Konventionell
B 1:	‘Capo’, Konventionell	E 1:	‘Asketis’, Öko
B 2:	‘Capo’, Öko	E 2:	‘Asketis’, Konventionell
C 1:	‘Capo’, Konventionell	F 1:	‘Asketis’, Konventionell
C 2:	‘Capo’, Öko	F 2:	‘Asketis’, Öko

Abbildung 4-8: Anteil des Luteins an der Fraktion der photometrisch gemessenen Gelbpigmente in Weizen-Erzeugerproben. Gleiche Buchstaben bezeichnen die Proben eines Betriebspaares.

Eine Identifizierung unbekannter gelber Pigmente in den Extrakten konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nicht vorgenommen werden. Der Gehalt der Gelbpigmente wurde als Lutein berechnet und in dieser Form hinsichtlich der Fragestellungen zur Differenzierung und Klassifizierung unterschiedlicher Proben eingesetzt.

4.1.4.2 Messungen des Carotinoidgehaltes in Weizen (2005)

Um die Ergebnisse der Messungen des Luteingehaltes aus den vorangegangenen Messungen zu überprüfen, wurden die Messungen im Jahr 2005 an den gleichen Proben mit einer veränderten Methode wiederholt. Mit der veränderten Art der Extraktion wurde Lutein mit der HPLC als einzelner Peak erfasst. Für die Berechnung des Luteingehaltes in den DOK-Proben wurden jeweils die Messergebnisse der 3-fachen Probenwiederholung aller Feldwiederholungen einer Düngungsvariante zu einer Gesamtprobe zusammengefasst. Die Messwerte für den Luteingehalt in den DOK-Weizenproben liegen in einem Bereich zwischen 3,52 µg/g TM und 4,34 µg/g TM, die Standardabweichung liegt in einem Bereich zwischen 0,14 und 0,55. Als Variationskoeffizienten können Werte in einem Bereich zwischen 3,68 % und 12,78 % berechnet werden.

Der Korrelationskoeffizient zwischen den Messungen im Jahr 2004 und im Jahr 2005 beträgt $r = 0,929$, die Messungen zeigen somit eine gute Korrelation.

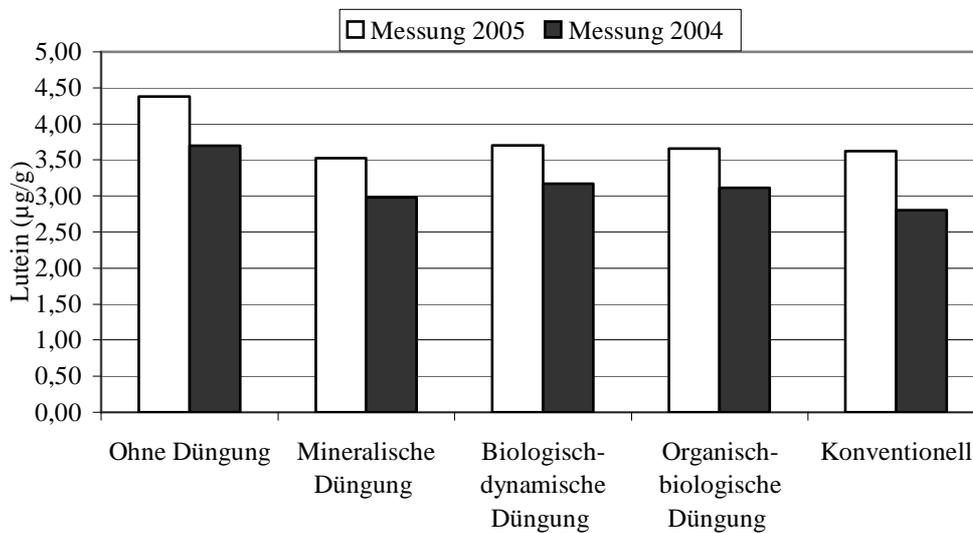


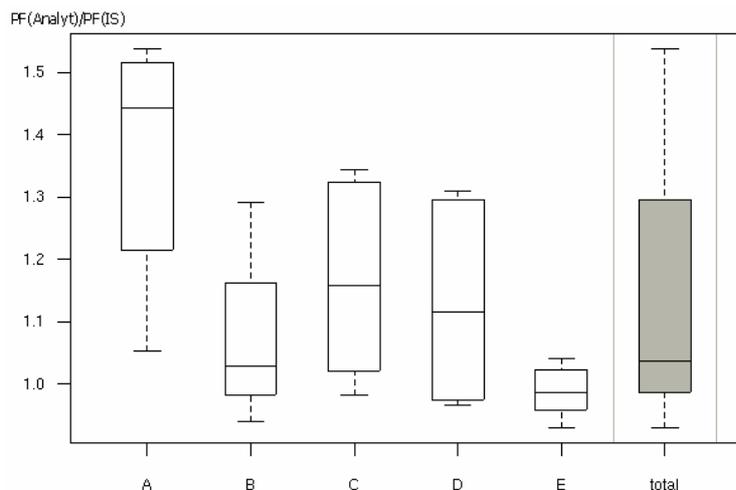
Abbildung 4-9: Ergebnisse der Messungen mittels HPLC-Analytik des Luteingehaltes in DOK-Weizen mit unterschiedlichen Extraktionsmethoden.

4.1.5 Differenzierung und Klassifizierung

Durch die Art der Proben ergeben sich Differenzierungsmöglichkeiten hinsichtlich der Sorten und dem Anbau (konventionell vs. ökologisch). Nach Prüfung auf Homogenität der Varianzen wurde die Differenzierung der Proben mittels ANOVA und anschließend LME/pairwise Test vorgenommen. Tabellen der jeweiligen t-Werte und p-Werte finden sich im Anhang. Die Messungen beziehen sich bei den DOK-Weizenproben auf Feldwiederholungen, bei den Erzeugerproben wurden repräsentative Proben aus dem Erntegut gezogen und bestimmt. Daher beziehen sich die t- und p-Werte direkt auf die Unterscheidung der Anbausysteme.

4.1.5.1 Differenzierung und Klassifizierung von Weizen mit unterschiedlicher N-Düngung (DOK-Weizen)

Differenzierung auf der Grundlage des Luteingehaltes



- A: Ungedüngte Variante
 B: Mineralisch gedüngte Variante (NPK in Menge der Mistdüngung konventionell)
 C: Biologisch-dynamisch gedüngte Variante, 1,4 DGVE/ha.
 D: Organisch-biologisch gedüngte Variante mit 1,4 DGVE/ha.
 E: Variante aus konventionell, integrierter Produktion, Mistdüngung

Abbildung 4-10: Boxplot des Luteingehaltes (PF(Analyt)/PF(IS)) in DOK-Weizen Proben.

Die Differenzierung auf der Grundlage des Luteingehaltes (PF(Analyt)/PF(IS)) erfolgte getrennt nach allen 4 Feldwiederholungen. Es ergeben sich folgende Unterschiede:

Feldwiederholung 1:

	B	C	D	E
A	***	***	***	***
B		***	***	***
C				***
D				***

***= $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$

Feldwiederholung 2:

	B	C	D	E
A	***	***	***	***
B		***	***	***
C			-	***
D				***

***= $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$

Feldwiederholung 3:

	B	C	D	E
A	***	***	***	***
B		***	***	***
C				***
D				**

***= p < 0,001, ** = p < 0,01, * = p < 0,05

Feldwiederholung 4:

	B	C	D	E
A	***	***	***	***
B		**	***	***
C			***	***
D				***

***= p < 0,001, ** = p < 0,01, * = p < 0,05

Bis auf die Proben C (biologisch-dynamische Düngung) und D (biologisch-organische Düngung) in der Feldwiederholung 2 können alle Proben signifikant differenziert werden.

Klassifizierung auf der Grundlage des Luteingehaltes

Nachdem die Differenzierung der Proben erfolgreich vorgenommen werden konnte, sollten die Weizenproben gemäß der N-Düngung klassifiziert werden. Eine Klassifizierung mittels CART erbrachte in einem ersten Schritt die Trennung der ungedüngten Variante in eine eigene Gruppe. Die mineralisch und die organisch gedüngten Varianten können in diesem ersten Schritt nicht getrennt werden und bilden eine gemeinsame Gruppe. In zwei weiteren Trennungen kann die Mehrzahl der Proben (> 95 %) der organisch gedüngten Varianten in eine eigene Gruppe eingeordnet werden. Eine Klassifizierung gemäß der unterschiedlichen Düngung ist auf dieser Basis mit guter Qualität möglich (Abbildung 4-11).

	R Square	N	N-splits	Imputes
Included	0,964	607	3	836
excluded		0		

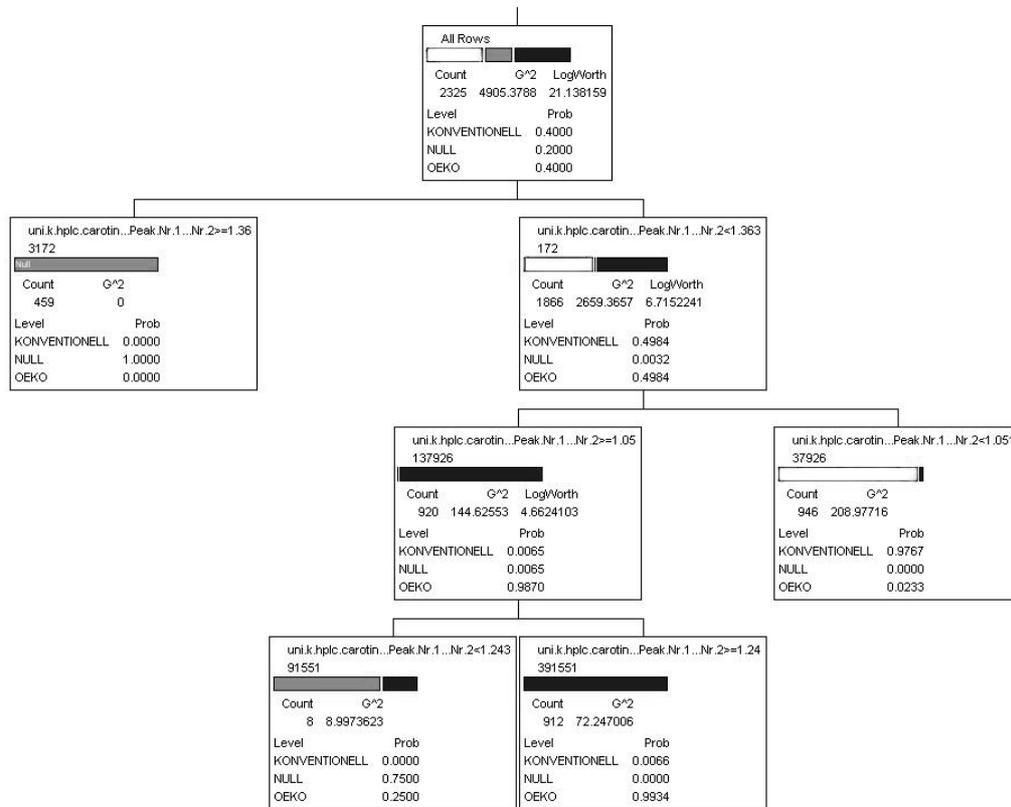
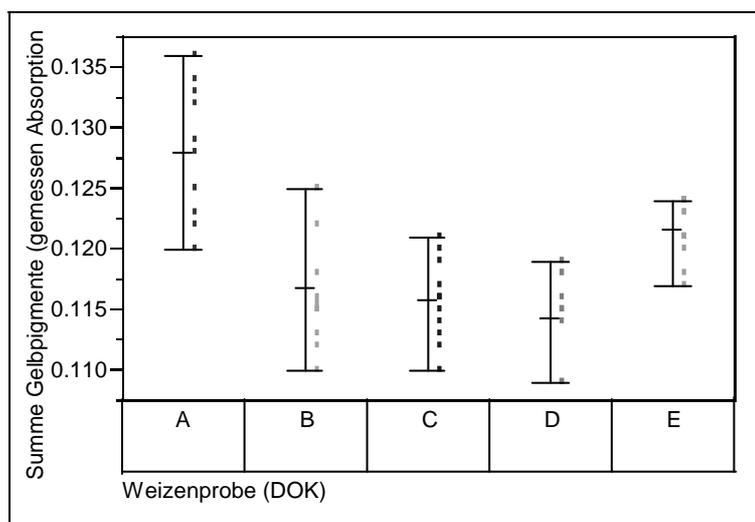


Abbildung 4-11: Klassifizierung von DOK-Weizenproben mit CART (helle Balken = konventionell gedüngte Proben, graue Balken = ungedüngte Proben, dunkle Balken = ökologisch gedüngte Proben).

Differenzierung auf der Grundlage des Gesamtcarotinoidgehaltes

Auf der Basis des Gesamtcarotinoidgehaltes ergibt sich folgendes Bild:



- A: Ungedüngte Variante
 B: Mineralisch gedüngte Variante (NPK in Menge der Mistdüngung konventionell)
 C: Biologisch-dynamisch gedüngte Variante, 1,4 DGVE/ha.
 D: Organisch-biologisch gedüngte Variante mit 1,4 DGVE/ha.
 E: Variante aus konventionell, integrierter Produktion, Mistdüngung

Abbildung 4-12: Streudiagramm der Messwerte des photometrisch gemessenen Gesamtcarotinoidgehaltes in DOK-Weizen.

Die Auswertung erfolgte für die Gesamtproben über Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test.

ANOVA Summe Gesamtcarotinoidgehalt: $\chi^2 = 35,2532$, Prob > $\chi^2 < 0,001$

Tabelle 4-9: Differenzierung von DOK-Weizen über den Gehalt der Gesamtcarotinoide

	Signifikanz			Mittelwert
A (ohne Düngung)	A			0,128
E (konventionelle Düngung)		B		0,122
B (mineralische Düngung)			C	0,117
C (biologisch-dynamische Düngung)			C	0,116
D (organisch-biologische Düngung)			C	0,114

Die Proben A (ohne Düngung) können von allen anderen Proben differenziert werden.

Die Proben E (mit konventioneller Düngung) können von allen anderen Proben getrennt werden.

Die Proben B (mineralische Düngung), C (biologisch-dynamische Düngung) und D (organisch-biologische Düngung) können nicht von einander getrennt werden.

Klassifizierung auf der Grundlage des Gesamtcarotinoidgehaltes

Durch die Klassifizierung mit CART Verfahren können aus der Gesamtheit der Proben zwei Gruppen gebildet werden. Danach bilden die Varianten ohne Düngung (A) und die Proben mit mineralischer Düngung eine Gruppe. In einer weiteren Gruppe werden die Proben B (mineralische Düngung), C (biologisch-dynamische Düngung) und D (organisch-biologische Düngung) in einer Gruppe zusammengefasst. Diese Gruppe wird in einer zweiten Trennung in zwei weitere Untergruppe unterteilt, die Proben D (biologisch-organische Düngung) bilden eine Gruppe, die zweite Untergruppe besteht aus den Proben B (mineralische Düngung) und C (biologisch-dynamische Düngung). Eine korrekte Klassifizierung der Proben nach der Düngung ist damit nicht möglich.

4.1.5.2 Differenzierung und Klassifizierung von Weizen-Erzeugerproben

Differenzierung auf der Grundlage des Luteingehaltes

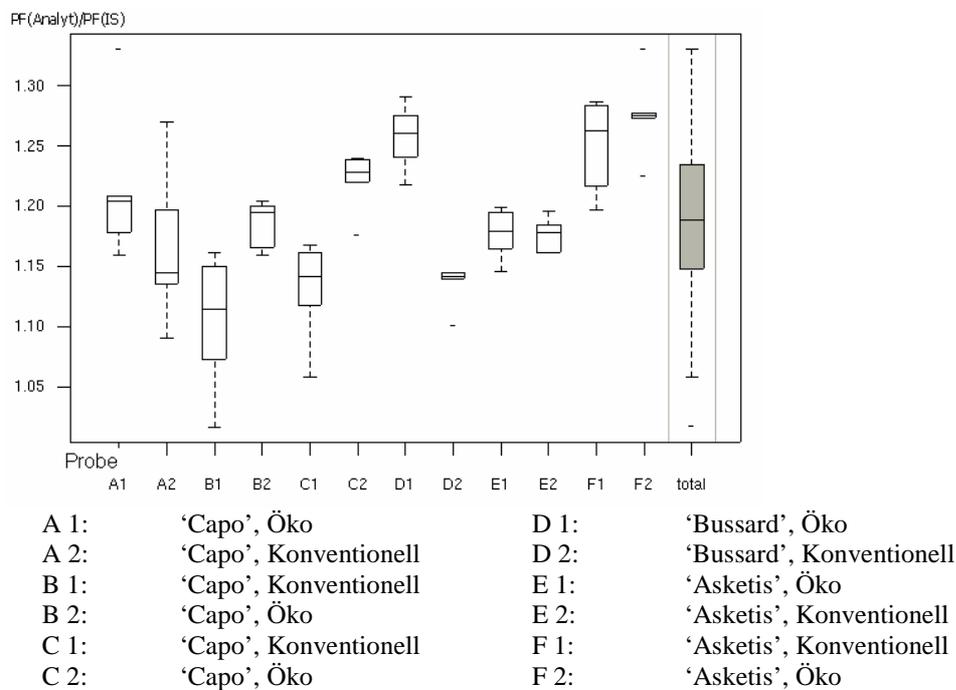


Abbildung 4-13: Boxplot des Luteingehaltes ($PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$) in Weizen-Erzeugerproben.

Eine Differenzierung der Proben mit LME/pairwise Test auf der Basis des Luteingehaltes zeigt das folgende Ergebnis:

Tabelle 4-10: Differenzierung auf der Grundlage des Luteingehaltes (PF(Analyt)/PF (IS)) in Weizen-Erzeugerproben

	A2	B 1	B2	C1	C2	D1	D2	E1	E ^o	F1	F2
A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	:
A2		-	-	-	-	* ₋	-	-	-	-	**
B1			-	-	**	***	-	**	*	***	***
B2				-	*	***	-	-	-	**	***
C1					**	***	-	*	-	***	***
C2						*	***	-	-	-	**
D1							***	***	***	-	-
D2								-	-	***	***
E1									-	-	***
E2										**	***
F1											-

***= $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$

Innerhalb der Betriebspaare haben, bis auf die Probe F, die Proben aus ökologischem Anbau gegenüber der Gegenprobe aus konventionellem Anbau den höheren Luteingehalt. Eine durchgängige, signifikante Trennung zwischen den Proben aus konventionellem Anbau und aus ökologischem Anbau innerhalb der Betriebspaare kann jedoch nicht erfolgen. Der prozentuale Unterschied zwischen den einzelnen Proben bezogen auf den Gehalt von Lutein liegt in einem Bereich zwischen 0,21 % und 6,48 %, die Methodenpräzision beträgt 2,5 %. Es ergeben sich folgende signifikante Unterschiede:

In den Betriebspaaren A und B der Sorte 'Capo' und in den Betriebspaaren E und F der Sorte 'Asketis' können die ökologisch erzeugten Proben nicht von den konventionell erzeugten Proben differenziert werden.

In den Betriebspaaren C und D der Sorten 'Capo' bzw. 'Bussard' können die ökologisch erzeugten Proben von den konventionell erzeugten Proben unterschieden werden. Eine durchgängige Trennung nach Sorten ist nicht möglich.

Eine Differenzierung von Proben aus dem gleichen Anbausystem kann in einzelnen Proben erfolgen.

Klassifizierung auf der Grundlage des Luteingehaltes

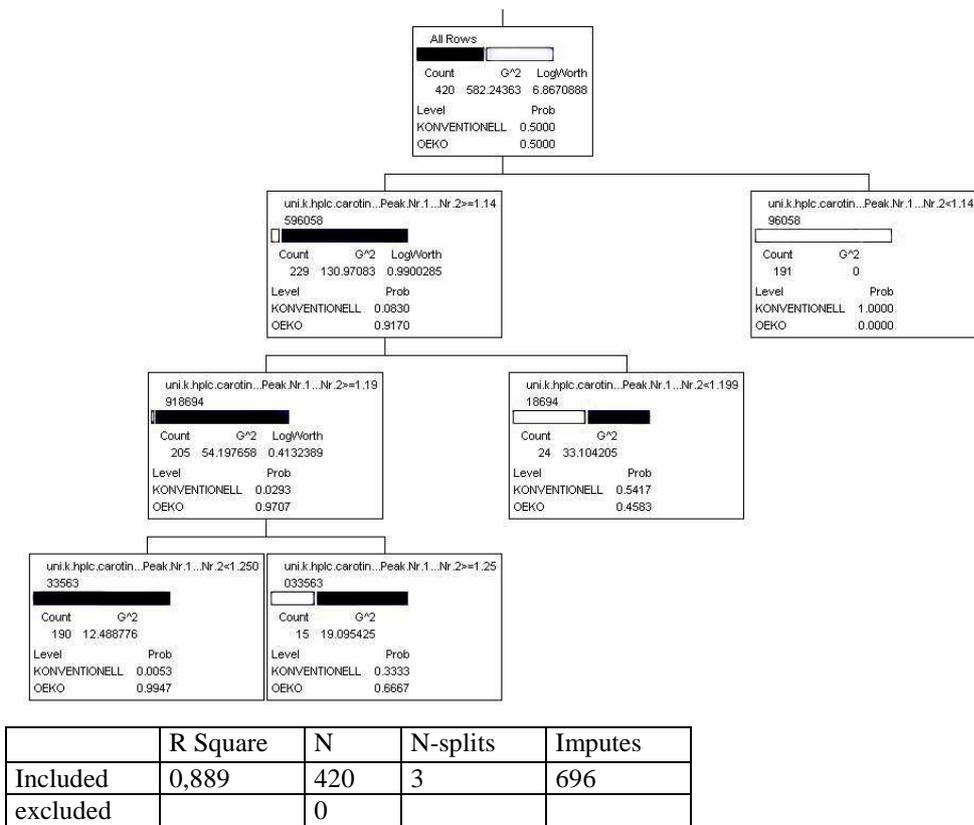


Abbildung 4-14: Klassifizierung von Weizen-Marktproben nach dem Anbau durch den Luteingehalt (helle Balken = konventionell erzeugte Proben, dunkle Balken = ökologisch erzeugte Proben).

Eine Klassifizierung und Gruppenbildung nach den unterschiedlichen Anbauvarianten (ökologischer vs. konventioneller Anbau) wurde nach dem CART Verfahren durchgeführt, die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung (4-14) dargestellt. Die Gruppierung erfolgt in 3 Splits, wobei bereits im ersten Schritt 90 % der Differenzierung richtig klassifiziert werden. Zwei weitere Trennungsschritte haben nur noch wenig Einfluss auf

das Gesamtergebnis. Nach 3 Splits wird ein großer Teil der Proben (92,92 %) gemäß dem Anbausystem richtig in Gruppen zusammengefasst.

Differenzierung auf der Grundlage des Gesamtcarotinoidgehaltes

Eine Differenzierung der Proben auf der Basis des Gesamtcarotinoidgehaltes ergibt das folgende Ergebnis: ***= $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$

Tabelle 4-11: Differenzierung auf der Grundlage des Gesamtcarotinoidgehaltes (PF(Analyt)/PF(IS)) in Weizen-Erzeugerproben

	A2	B 1	B2	C1	C2	D1	D2	E1	E‘	F1	F2
A1	-	*	*	**	**	**	**	-	***	-	**
A2		**	-	***	-	-	**	-	***	-	**
B1			***	-	***	***	***	**	**	-	-
B2				***	-	-	*	*	**	-	***
C1					***	***	**	**	***	-	-
C2						-	*	*	**	-	***
D1							*	*	***	-	***
D2								**	-	-	***
E1									***	-	*
E2										-	***
F1											-

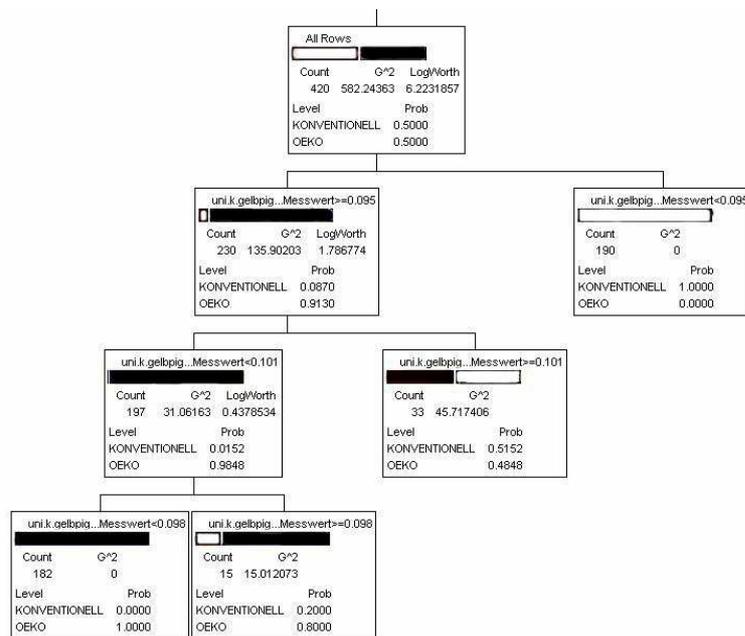
Die Proben des Betriebspaares A (‘Capo’) und die Proben des Betriebspaares F (‘Asketis’) können nicht gemäß dem Anbau (ökologisch – konventionell) voneinander unterschieden werden. Alle weiteren Betriebspaare können getrennt werden.

Eine Differenzierung von Proben aus jeweils einem Anbausystem ist in einzelnen Proben möglich.

Eine Differenzierung von Proben der gleichen Sorte ist in einigen Fällen möglich.

Klassifizierung auf der Grundlage des Gesamtcarotinoidgehaltes

Die Klassifizierung und die Gruppenbildung wurden mit dem CART-Verfahren durchgeführt, die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



	R Square	N	N-splits	Imputes
Included	0,896	420	3	696
excluded		0		

Abbildung 4-15: Klassifizierung von Weizen-Erzeugerproben durch den Gesamtcarotinoidgehalt (helle Balken = konventionelle Proben, dunkle Balken = ökologisch erzeugte Proben).

Die Klassifizierung verläuft in gleicher Weise wie bereits für die Klassifizierung durch den Luteingehalt beschrieben. Nach 3 Splits werden die Proben (90,73 %) - nach dem Anbausystem - richtig gruppiert.

4.2 Messungen der Carotinoide in Mais

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde der Carotinoidgehalt in getrocknetem und gemahlenem Mais der Sorte 'Magister' aus dem DOK-Versuch untersucht. Das Probenmaterial bestand aus 5 Anbauvarianten mit jeweils unterschiedlicher N-Düngung.

4.2.1 Identifizierung der Carotinoide in Mais – Ergebnisse

Es ergibt sich ein Chromatogramm mit 7 voneinander getrennten Peaks. Die Abbildung 4-16 zeigt das Chromatogramm einer Maisprobe (I = Variante mit konventionell-mineralischer Düngung). Die nummerierten Peaks können in allen Proben nachgewiesen werden und sind nach dem Vergleich der Retentionszeiten (Rt.) und der UV-Spektren identisch.

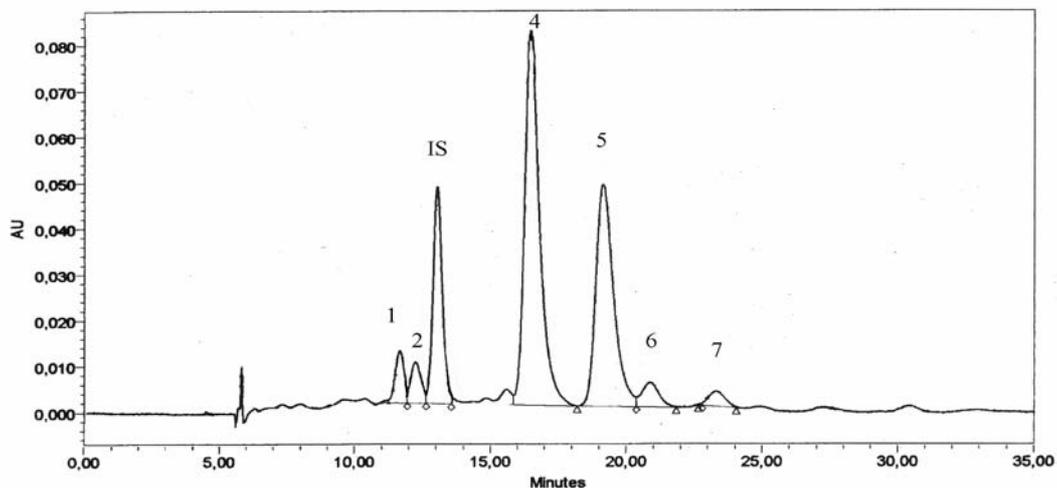


Abbildung 4-16: Exemplarische Darstellung des Chromatogrammes einer Maisprobe (I 3, Messung bei 450 nm). Peak Nr. 1 = nicht identifizierten Peak (Rt: 11,661 min), Peak Nr. 2 = nicht identifizierter Peak (Rt: 12,252 min), Peak Nr. 3 = Interner Standard (Rt: 13,039 min), Peak Nr. 4 = Lutein (Rt: 16,468 min), Peak Nr. 5 = Zeaxanthin (Rt: 19,133 min), Peak Nr. 6 = nicht identifizierter Peak (Rt: 20,867 min), Peak Nr. 7 = nicht identifizierter Peak (Rt: 23,305 min).

Von den detektierten Peaks wurden mittels Retentionszeitenvergleich und durch den Vergleich der UV-Spektren die Substanzen β -apo-8-Carotenal (Peak Nr. 3), Lutein (Peak Nr. 4) und Zeaxanthin (Peak Nr. 5) identifiziert. Der Peak Nr. 2 weist zwar das gleiche UV-Spektrum auf wie eine β -Cryptoxanthin-Standardlösung, weicht jedoch hinsichtlich der Retentionszeit um 2,3 min von dieser ab, so dass β -Cryptoxanthin nicht identifiziert werden kann. Die Substanz β -apo-8-Carotenal wurde allen Proben vor der Extraktion als interner Standard zugegeben.

4.2.2 Validierungsschritte der HPLC-Methode zur Bestimmung von Carotinoiden in Mais

4.2.2.1 Linearität

Linearität von β -apo-8-Carotenal

Die Linearität von β -apo-8-Carotenal wurde mit einer Standardverdünnungsreihe (Tabelle 4-12) bestimmt. Der Standard hatte eine Reinheit von > 98 % (Fluka). Als Lösungsmittel diente eine THF/MeOH Mischung (1:1, v:v). Für die Bestimmung wurde eine Verdünnungsreihe in 6-facher Probenwiederholung erstellt. Die Probe wurde dabei mit allen Schritten der Standardprozedur aufbereitet. Von jeder Probe wurden 15 μ l untersucht.

Tabelle 4-12: Linearität des internen Standards β -apo-8-Carotenal in verschiedenen Konzentrationsstufen

Nr.	Konzentration (μ g/ml)	Peakfläche (AU*min)	s	V _K
1	0,5	223381,5	7156,24	3,20
2	10	5478468	105663,16	1,93
3	20	11010138	237076,91	2,15
4	30	16541808	410140,58	2,48
5	40	22073478	352570,12	1,60
6	50	27605148	552014,76	2,00
7	60	33136818	410237,03	1,24

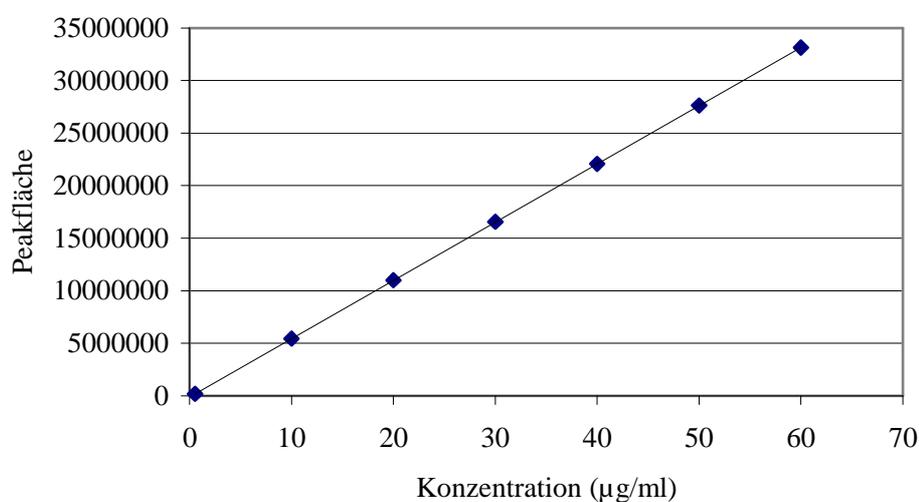


Abbildung 4-17: Linearität von β -apo-8-Carotenal Standardlösungen. Dargestellt sind die Mittelwerte einer 6-fachen Probenwiederholung und die errechnete Trendlinie.

Es ergibt sich eine lineare Regression mit hoher Korrelation.

Geradengleichung: $y = 553167x - 53202$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,999$

Linearität von Lutein

Die Linearität wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,1 µg/ml und 75 µg/ml bestimmt. Die Standardlösungen wurden aus kristalliner Lutein-Standardsubstanz (Roth, > 98 %) als Lösung in THF/MeOH (1:1, v:v) angefertigt. Jeweils 15 µl der Lösungen wurden in 6-facher Probenwiederholung mit der HPLC vermessen.

Tabelle 4-13: Linearität von Lutein in verschiedenen Konzentrationen

Nr.	Konzentration (µg/ml)	Peakfläche (AU*min)	s	V _K
1	0,1	186682	4668,94	2,50
2	15	3962059	91517,84	2,31
3	30	7762774	94259,12	1,21
4	45	11563489	390752,08	3,38
5	60	15364204	305355,98	1,99
6	75	19164919	429674,55	2,24

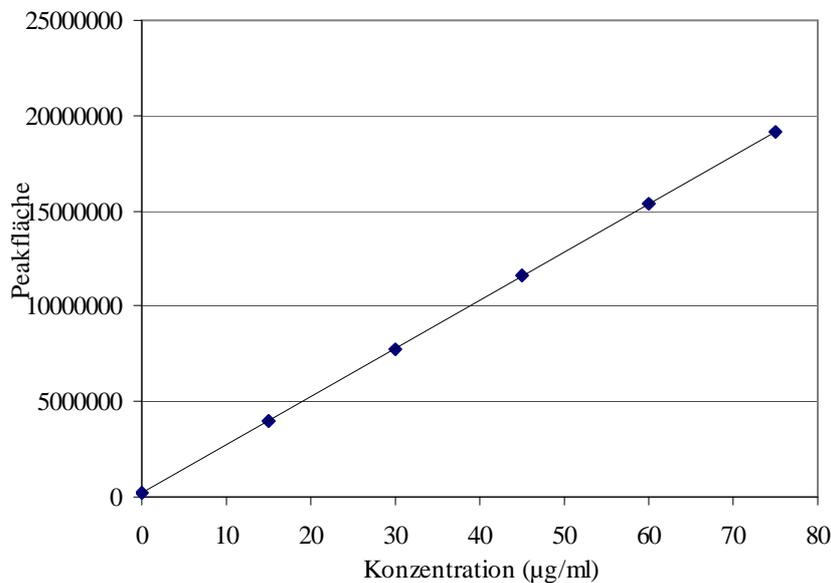


Abbildung 4-18: Linearität von Lutein-Standardlösungen. Dargestellt sind die Mittelwerte einer 6-fachen Probenwiederholung und die errechnete Trendlinie.

Es ergibt sich eine lineare Regression mit hoher Korrelation.

Geradengleichung: $y = 253381x + 161344$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,999$

Linearität von Zeaxanthin

Die Linearität von Zeaxanthin wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 µg/ml und 40 µg/ml bestimmt. Die eingesetzten Standardlösungen wurden aus kristalliner Standardsubstanz (Roth) mit einer Reinheit von > 98 % und angefertigt. Die jeweiligen Konzentrationsintervalle sind in der unten stehenden Tabelle dargestellt. Zur Bestimmung der Kalibriergeraden wurden die Standardlösungen in 6-facher Probenwiederholung angefertigt. Jeweils 15 µl der Lösungen wurden mit der HPLC gemessen.

Tabelle 4-14: Linearität von Zeaxanthin. Aufgeführt sind die jeweiligen Mittelwerte einer 6-fachen Probenwiederholung

Nr.	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Peakfläche ($\text{AU}\cdot\text{min}$)	s	V_K
1	40	10869213	272899	2,51
2	32	7637826	136815	1,79
3	25	6503892	88979	1,37
4	16	4581436	128804	2,81
5	8	2123727	50291	2,37
6	3	845803	18160	2,15
7	0,75	211957	6258	2,95

Es ergibt sich eine lineare Regression mit hoher Korrelation:

Geradengleichung: $y = 258746 + 70757x$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,99$

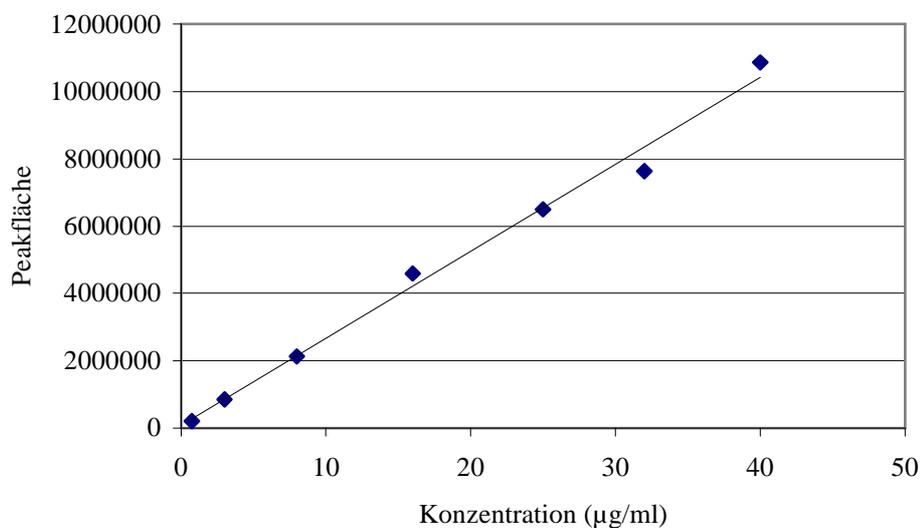


Abbildung 4-19: Linearität von Zeaxanthin-Standardlösung. Dargestellt sind die Mittelwerte einer 6-fachen Probenwiederholung und die errechnete Trendlinie.

Linearität von Realproben

Um sicherzustellen, dass auch die Messergebnisse der nicht identifizierten Substanzen im Bereich der linearen Datenaufnahme lagen, wurden Maisproben nach den Standard-

bedingungen aufbereitet und bis zur doppelten bzw. bis zu einem Zehntel der Konzentration der Arbeitslösungen aufkonzentriert bzw. verdünnt. Solche Verdünnungsreihen wurden in dreifacher Probenwiederholung erstellt und unter den Standardbedingungen mit der HPLC gemessen.

Tabelle 4-15: Untersuchungen zur Linearität der nicht identifizierten Peaks in Maisproben in verschiedenen Konzentrationen

Substanz	Retentionszeit (Mittelwert)	Geradengleichung	Bestimmtheitsmaß (R^2)
Peak Nr. 1	11,661 min	$y = 100,36x + 25,379$	$R^2 = 0,918$
Peak Nr. 2	12,252 min	$y = 86,393x + 37,982$	$R^2 = 0,954$
Peak Nr. 6	20,867 min	$y = 77,11x + 14,083$	$R^2 = 0,973$
Peak Nr. 7	23,305 min	$y = 88,923x - 13,942$	$R^2 = 0,958$

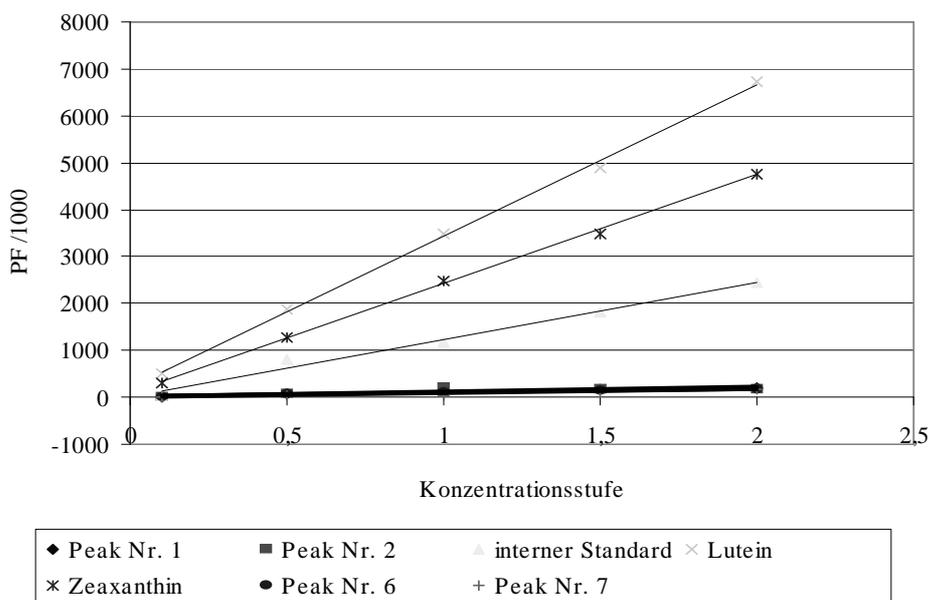


Abbildung 4-20: Linearität von Mais Realproben. Dargestellt sind die Mittelwerte einer 3-fachen Probenwiederholung. Die Konzentrationsstufe 1 entspricht der Konzentration einer nach der Standardprozedur erstellten Maisprobe.

Mit den Messungen zur Bestimmung der Linearität kann bestätigt werden, dass für alle Peaks ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten und der Signalintensität besteht. Die Kalibriergeraden der Standardlösungen erfüllen die Anforderungen.

derungen an die Äquidistanz, das Bestimmtheitsmaß der linearen Korrelationen liegt in einem Bereich von $R^2 > 0,99$. Für die Substanzen β -apo-8-Carotenal, Lutein und Zeaxanthin kann die Linearität damit bestätigt werden.

Der überprüfte Bereich der Linearität dieser Substanzen ist wie folgt:

β -apo-8-Carotenal: 0,5 $\mu\text{g/ml}$ - 60 $\mu\text{g/ml}$

Lutein: 0,1 $\mu\text{g/ml}$ - 75 $\mu\text{g/ml}$

Zeaxanthin: 0,75 $\mu\text{g/ml}$ - 40 $\mu\text{g/ml}$

Bei der Bestimmung der Linearität der Gesamtproben muss beachtet werden, dass in diesen Proben im Vergleich zu den Messungen zur Linearität von Standardlösungen durch das Verdünnen bzw. Aufkonzentrieren der Proben ein weiterer Prozessschritt eingeführt wurde. Darüber hinaus wurden diese Messungen in der kompletten Probenmatrix durchgeführt. Dadurch ist eine Abnahme der Präzision der Messungen verständlich, die in der oben stehenden Tabelle aufgeführten Korrelationen für die einzelnen Peaks scheinen unter diesen Bedingungen akzeptabel.

4.2.2.2 Präzision

In der Durchführung der Messungen zur Findung der Präzision für diese Arbeit wurde in die Gerätepräzision, die Methodenpräzision und die Wiederholpräzision unterschieden. Für die Ermittlung der Gerätepräzision wurden Lösungen der Standardsubstanzen Lutein, Zeaxanthin und β -apo-8-Carotenal in 6-facher Messwiederholung mit der HPLC vermessen. Um mögliche Einflüsse durch Faktoren aus der Probenmatrix zu ermitteln, wurde die Messpräzision mit Realproben ermittelt. Diese wurden in 6-facher Messwiederholung mit der HPLC unter Standardbedingungen untersucht. Für die Ermittlung der Methodenpräzision wurden die Messergebnisse aller Probenwiederholungen ausgewertet. Berechnet wurden die Standardabweichung und der Variationskoeffizient. Für nicht identifizierte Substanzen konnte die Gerätepräzision nicht bestimmt werden.

Tabelle 4-16: Gerätepräzision und Messpräzision in Maisproben

	Gerätepräzision V_K	Messpräzision V_K	Methodenpräzision V_K
Peak Nr. 1	-	0,32	3,09
Peak Nr. 2	-	0,43	4,07
β -apo-8-Carotenal	0,16	0,56	3,53
Lutein	0,17	0,39	4,46
Zeaxanthin	0,21	0,58	4,58
Peak Nr. 6	-	0,90	3,45
Peak Nr. 7	-	0,22	6,7

Die Konzentrationen der Substanzen Lutein und Zeaxanthin liegen in einem Bereich zwischen 17,68 $\mu\text{g/g}$ und 25,77 $\mu\text{g/g}$ bzw. 12,14 $\mu\text{g/g}$ und 16,48 $\mu\text{g/g}$, also in einem Bereich deutlich kleiner als 1 %. Die formellen Anforderungen an die Präzision konnten für diese Substanzen somit in allen Proben erfüllt werden. Die Identität der Peaks Nr. 1, Nr. 2, Nr. 6 und Nr. 7 konnte nicht aufgeklärt werden. Ein Konzentrationsbereich dieser Substanzen, und damit ein akzeptabler Fehlerbereich, konnten daher nicht bestimmt werden. Unter der Annahme, dass es sich bei diesen Peaks ebenfalls um Carotinoide bzw. Carotinoidisomere handelt, liegt deren Konzentration deutlich unter der Konzentration von Lutein und Zeaxanthin. In diesem Fall hätten auch für diese Peaks die Richtwerte für den Variationskoeffizienten von 10 % Geltung.

Für alle Proben untereinander wurde der prozentuale Unterschied berechnet. Bei Unterschieden, die im Streubereich der Methodenpräzision liegen, kann eine Differenzierung dieser Proben nicht präzise durchgeführt werden.

Als Voraussetzung der Bestimmung der Präzision wurden die Daten aller Messreihen mit dem Test nach David ($p = 5 \%$) auf Normalverteilung überprüft. Alle Messwerte für die Findung der Geräte- und der Messpräzision entsprechen den Anforderungen an die Normalverteilung der Werte. In den Messungen zur Bestimmung der Methodenpräzision kann eine Normalverteilung der Messwerte des Peaks Nr. 1 der Probe H (ungedüngte Variante) nicht gefunden werden. Eine Inhomogenität des Probenmaterials erscheint unwahrscheinlich, da eine Normalverteilung für alle anderen Inhaltsstoffe der Probe, einschließlich des internen Standards, bestätigt werden kann. Die Präzision dieser Messung ist daher kritisch zu betrachten.

Die Präzision der Methode zeigt sich in den Punkten der Geräte-, der Mess- und der Methodenpräzision - mit den erwähnten Einschränkungen bei der Probe H- als präzise.

4.2.2.3 Wiederfindung

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurden 6 bereits vermessene Maisproben mit bekanntem Gehalt der unterschiedlichen Inhaltsstoffe mit einer bekannten Menge der Standardsubstanzen Lutein und Zeaxanthin versetzt und mit der HPLC gemessen. Aus der Differenz der Analyten in den aufgestockten Proben und den nicht aufgestockten Proben wurde die Wiederfindungsrate (WF) berechnet (Tabellen 4-17 und 4-18). Die Zudosierexperimente wurden so durchgeführt, dass der lineare Messbereich für die einzelnen Proben nicht überschritten wurde.

Tabelle 4-17: Wiederfindungsrate von Lutein in aufgestockten Proben

Lutein, zugesetzt (µg)	Lutein, berechnet (µg)	Lutein, gefunden (µg)	WF (%)
2	9,72	9,66	99,40
3	9,41	9,23	98,18
4	9,80	9,63	98,41
6	8,68	8,44	97,39
8	9,42	9,21	97,91
10	8,95	8,76	97,95

Tabelle 4-18: Wiederfindungsrate von Zeaxanthin in aufgestockten Proben

Zeaxanthin, zugesetzt (µg)	Zeaxanthin, berechnet (µg)	Zeaxanthin, gefunden (µg)	WF (%)
2	7,06	7,01	99,36
3	8,40	8,31	99,027
4	9,07	9,02	99,44
6	11,12	10,97	98,71
8	12,75	12,62	98,99
10	15,04	14,75	98,09

Wiederfindung des internen Standards β -apo-8-Carotenal

Nach jeweils 4 untersuchten Maisproben wurde eine Probe mit reiner Standardsubstanz in der Konzentration des in den Proben enthaltenen Standards untersucht. Diese Stan-

Standardlösungen wurden mit allen Prozessschritten der Extraktion behandelt. Die Messergebnisse dieser Lösungen stellen die wahren Werte für die Konzentration des internen Standards für den jeweiligen Probensatz dar. Aus der Differenz des wahren Wertes und des gefundenen Wertes wurde die Wiederfindungsrate berechnet.

Tabelle 4-19: Wiederfindung des internen Standards β -apo-8-Carotenal in allen Maisproben

Probe	β -apo-8-Carotenal, wahrer Wert ($\mu\text{g/ml}$)	β -apo-8-Carotenal, gefundener Wert ($\mu\text{g/ml}$)	WF (%)
H	2,32	2,29	98,85
I	2,31	2,30	99,68
K	2,31	2,36	102,25
L	2,21	2,21	99,81
P	2,12	2,09	98,64

Mit der Wiederfindung des internen Standards nach allen Schritten der Probenextraktion kann die Eignung des internen Standards für die untersuchte Probenmatrix bewertet werden. Die Wiederfindungsrate des internen Standards wurde für alle Proben berechnet.

Für Analytgehalte $< 1 \%$ wird ein Bereich von 95% - $105,0 \%$ als akzeptierte Wiederfindungsrate genannt. Die maximale Wiederfindungsrate in den untersuchten Maisproben fand sich in Mais mit biologisch-dynamischer Düngung mit einem Wert von 102% . Wiederfindungsraten $> 100 \%$ können durch Einflüsse aus der Probenmatrix bedingt sein (KROMIDAS, 1999). Ob es sich bei der hohen Wiederfindungsrate in der biologisch – dynamisch gedüngten Probe um ein Charakteristikum dieser Matrix oder einen Messfehler handelt, konnte mit den vorliegenden Untersuchungen nicht geklärt werden.

Die Anforderungen an die Richtigkeit wurden von allen Proben erfüllt. Eine Eignung des internen Standards für die vorliegenden Untersuchungen kann damit bestätigt werden.

4.2.2.4 Spezifität

Die Spezifität eines HPLC-Verfahrens mit UV-Detektion wurde durch den Vergleich der UV-Spektren von Standardsubstanzen mit Analyt-Peaks einer Realprobe vorgenommen. In der praktischen Durchführung wurden dafür die UV-Spektren der Standardsubstanzen Lutein und Zeaxanthin aus den Versuchen zur Ermittlung der Linearität aufgezeichnet. Für den Vergleich mit den Analyt-Peaks aus den Realproben wurden Standardlösungen gewählt, die eine ähnliche Konzentration aufwiesen. Die aufgenommenen UV-Spektren sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

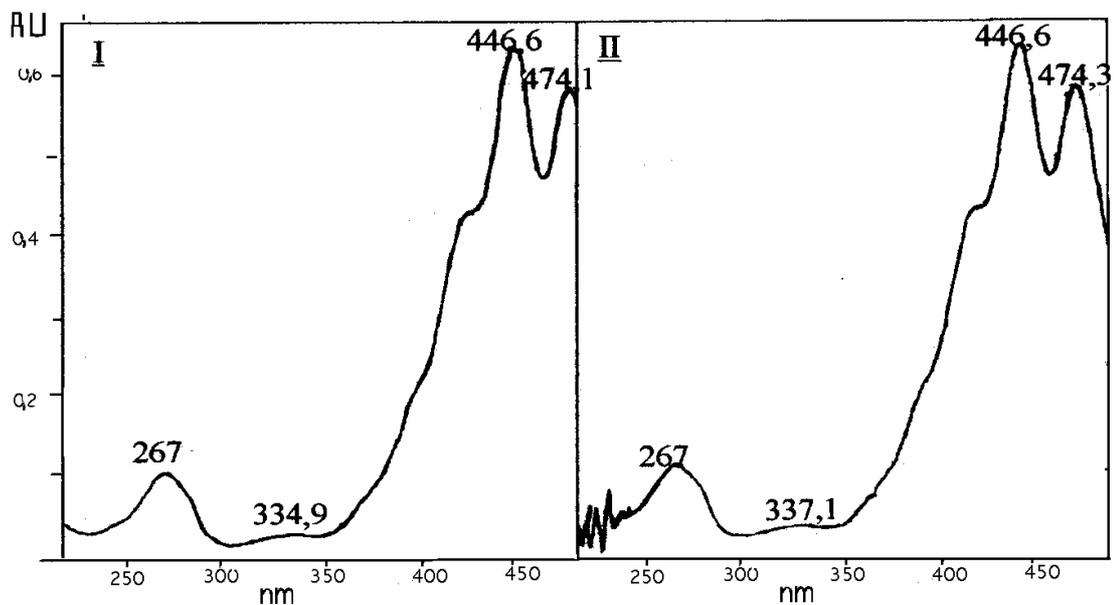


Abbildung 4-21: UV-Spektren von Lutein im Wellenlängenbereich zwischen 210 und 480 nm . 1 = UV-Spektrum einer Lutein-Standardlösung bei einer Retentionszeit von 16,815 min, 2 = UV-Spektrum einer Maisprobe (I 3) bei einer Retentionszeit von 16,48 min.

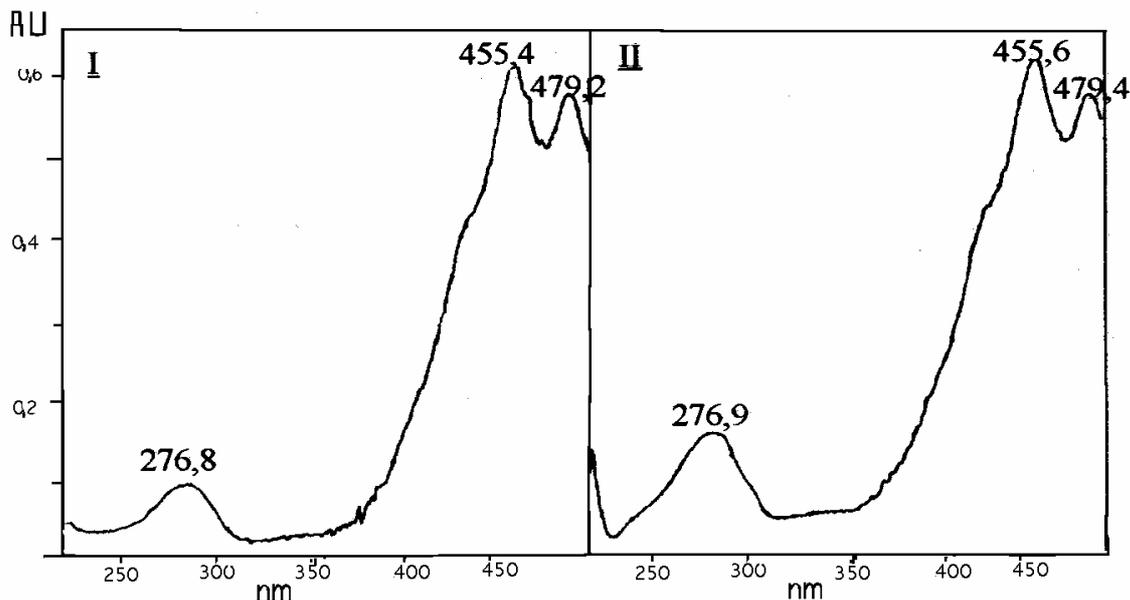


Abbildung 4-22: UV-Spektren von Zeaxanthin im Wellenlängenbereich zwischen 210 und 480 nm . I = UV-Spektrum einer Zeaxanthin-Standardlösung bei einer Retentionszeit von 19,654 min, 2 = UV-Spektrum einer Maisprobe (I 3) bei einer Retentionszeit von 19,133 min.

Die Spektren in den Peakmaxima sowie den Wendepunkten sind nach Form und Lage der Maxima identisch. Somit sind gute Übereinstimmungen der UV-Spektren des Lutetins und des Zeaxanthins, und damit ein Hinweis auf die Spezifität des Analyseverfahrens gegeben.

4.2.2.5 Robustheit

Zur Überprüfung der Robustheit der Methode wurde die Störanfälligkeit gegenüber der Wahl von Chemikalien mit anderen Chargennummern zur Probenextraktion überprüft. Darüber hinaus wurde der Einfluss durch die Wahl der Säulentemperatur während der Messungen überprüft.

Einfluss auf das Messergebnis durch die Probenextraktion mit Chemikalien einer anderen Chargennummer

Zur Überprüfung der Robustheit der Methode wurde die Störanfälligkeit gegenüber den Einflüssen durch die Wahl von Chemikalien der gleichen Spezifikation (p.a.) desselben Herstellers (Merck) mit einer anderen Chargennummer zur Probenextraktion überprüft. Verändert wurden die verwendete Charge des Methanol und des Tetrahydrofuran während der Extraktion der Proben sowie die Charge des Acetonitril als Bestandteile der mobilen Phase während der Messungen.

Eine Maisprobe der Anbauvariante I (konventionell-mineralische Düngung) wurde mit diesen Chemikalien in 6-facher Probenwiederholung extrahiert und mit der HPLC unter Standardbedingungen vermessen. Die Trennung erfolgte unter Standardbedingungen. Als Ergebnis dieser Untersuchungen zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Messergebnissen zwischen den Extraktionen und Messungen mit 2 unterschiedlichen Chargen von Chemikalien. Die HPLC-Methodik ist in diesem Punkt robust gegenüber Änderungen in der Standardprozedur.

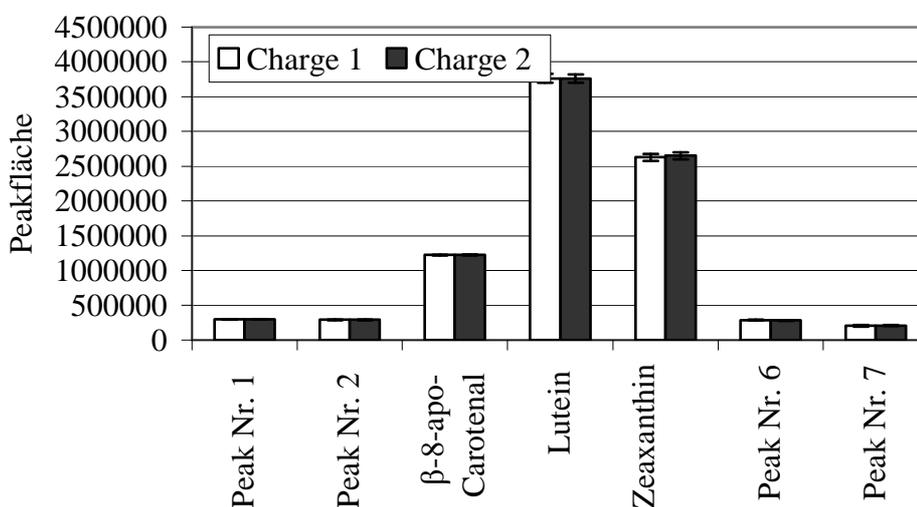


Abbildung 4-23: Einfluss der Verwendung von Chemikalien anderer Chargen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Peakflächen (AU*min) einer 6-fachen Probenwiederholung und die Standardabweichungen.

Einfluss der Säulentemperatur auf das Messergebnis

Eine Maisprobe der Anbauvariante I (konventionell-mineralische Düngung) wurde nach den Standardbedingungen aufbereitet und bei einer Säulentemperatur von 20 °C (Standardbedingungen) und zum Vergleich bei 30 °C und 45 °C gemessen.

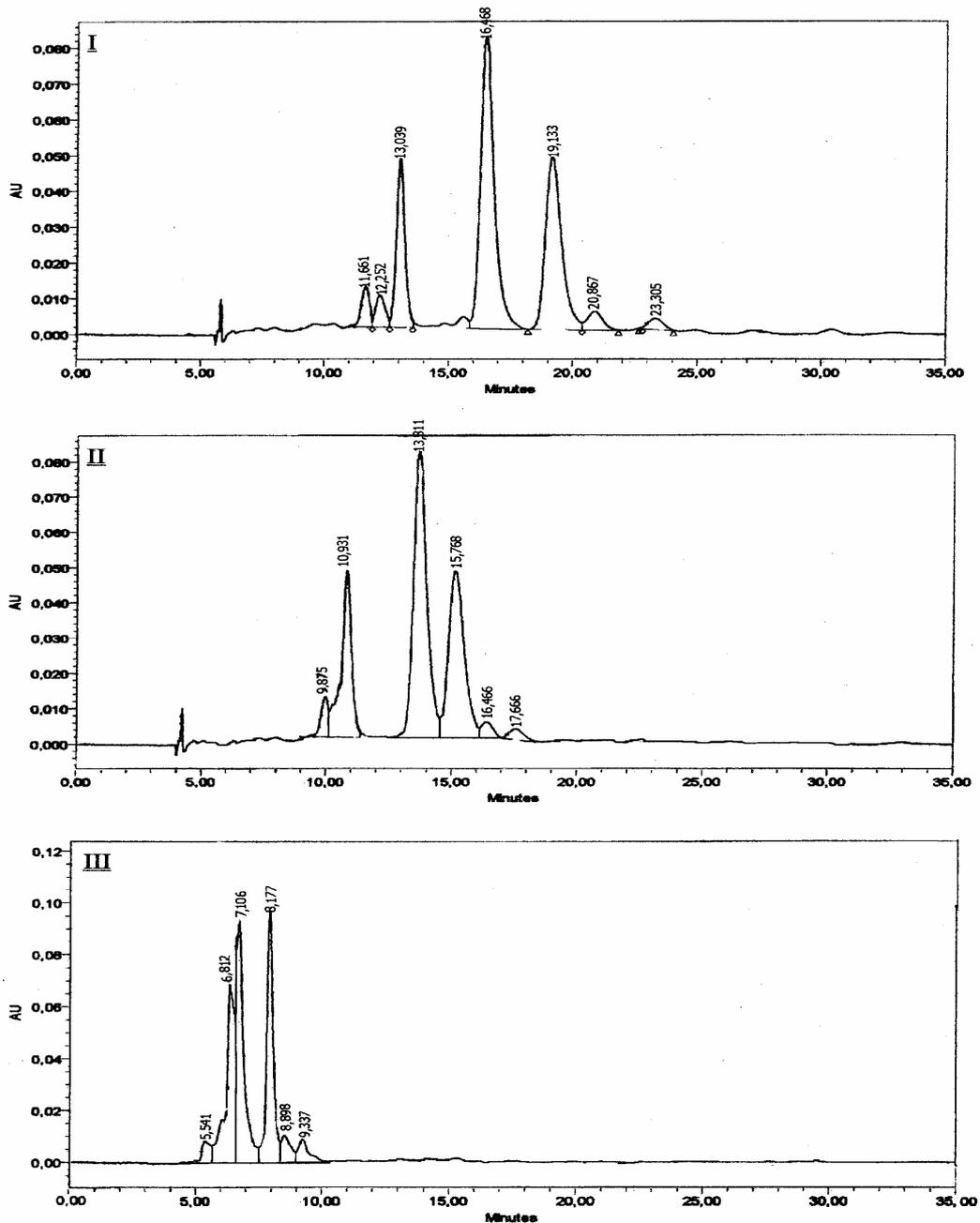


Abbildung 4-24: Einfluss der Säulentemperatur auf die resultierenden Chromatogramme gleicher Maisproben bei 20 °C (I), 30 °C (II) und 45 °C (III).

Als Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt sich eine reproduzierbare Verschiebung der Retentionszeiten sowie eine Verschlechterung der Trennleistung des Systems. Mit der Verschiebung der Retentionszeiten der Peaks geht eine zunehmende Überlappung der Peaks Nr. 1, Nr. 2 und des Peak Nr. 3 (β -apo-8-Carotenal) sowie der Peaks Nr. 4 (Lutein), Nr. 5 (Zeaxanthin), Nr. 6 und Peak Nr. 7 einher. Bereits bei Temperaturen von 30 °C kann der Peak Nr. 2 nicht mehr vom internen Standard getrennt werden. Bei Temperaturen von 45 °C kommt es zusätzlich zu einer Überlagerung mit dem Peak Nr. 4 des Chromatogrammes. Eine Identifizierung und eine Zuordnung der einzelnen Substanzen kann in diesen Chromatogrammen nicht durchgeführt werden.

Während der vergleichenden Messungen der Maisproben wurde die Temperatur der Säule mit einem Säulenofen auf 20 °C eingestellt.

4.2.3 HPLC-Analytik der Carotinoide in Mais - Ergebnisse

Nachdem die HPLC-Methodik zur Messung von Carotinoiden in Mais erfolgreich hinsichtlich der Parameter Linearität, Präzision, Spezifität und Robustheit überprüft wurde, sollte nach der Berechnung der identifizierten Inhaltsstoffe die Eignung der Methodik zur Differenzierung und Klassifizierung von Mais aus Anbau mit unterschiedlicher Düngung überprüft werden. Aus dem Probenmaterial ergaben sich Differenzierungs- und Gruppierungsmöglichkeiten auf der Grundlage der unterschiedlichen Düngung. Die Proben wurden nach der beschriebenen Prozedur aufbereitet und in 6-facher Probenwiederholung gemessen. Die Substanzen Lutein und Zeaxanthin wurden mit Standardkalibriergeraden quantifiziert. Für die Berechnung des Luteingehaltes und des Zeaxanthingehaltes in Maisproben wurde die folgende Formel verwendet:

$$\mu\text{g Lutein/g} = \frac{b \cdot 6}{4}$$

4

b = Durch lineare Regression erhaltener Wert

6 = Volumen des Gesamtextraktes in ml

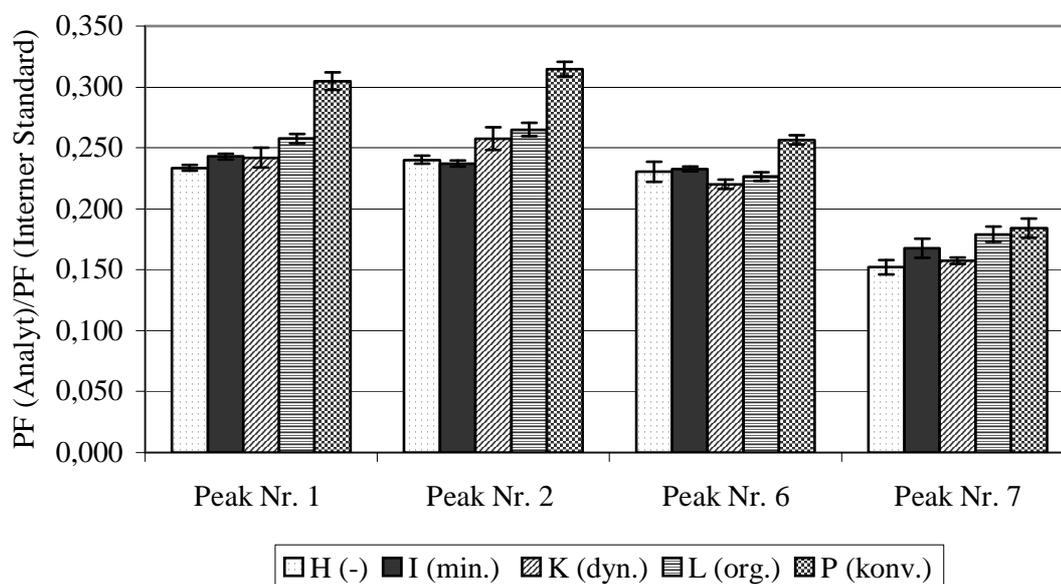
4 = Extrahierte Probe (g)

Tabelle 4-20: Luteingehalt und Zeaxanthingehalt in Mais

Anbauvariante	Lutein		Zeaxanthin	
	s	µg/g TM	s	µg/g TM
H (ohne Düngung)	0,85	19,21	0,78	13,92
I (Konventionell-mineralische Düngung)	0,58	21,38	0,41	14,53
K (Biologisch-dynamische Düngung, 1,4 DGVE/ha)	1,39	19,33	0,66	14,39
L (Organisch-biologische Düngung, 1,4 DGVE/ha)	1,05	21,13	0,64	15,17
P (Konventionelle Düngung)	1,14	24,61	0,83	15,99

Mit den Messungen wurden die Xanthophylle Lutein und Zeaxanthin als die Hauptkomponenten aus der Klasse der Carotinoide in Mais identifiziert. Bezogen auf die gesamte gemessene Peakfläche beträgt der Anteil von Lutein und Zeaxanthin zwischen 72,09 % und 74,92 %, entsprechend einem Gesamtmittelwert von 73,39 %. Der Korrelationskoeffizient zwischen dem Lutein- und dem Zeaxanthingehalt beträgt $r = 0,93$.

Die Verhältnisse der nicht identifizierten Peaks zueinander sind in der Abbildung 4-25 dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwert der Messgröße $PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$ sowie die jeweilige Standardabweichung. Eine Identifizierung über das UV-Absorptionsverhalten und die Retentionszeiten war aufgrund fehlender UV-Spektren als Referenzen nicht möglich.



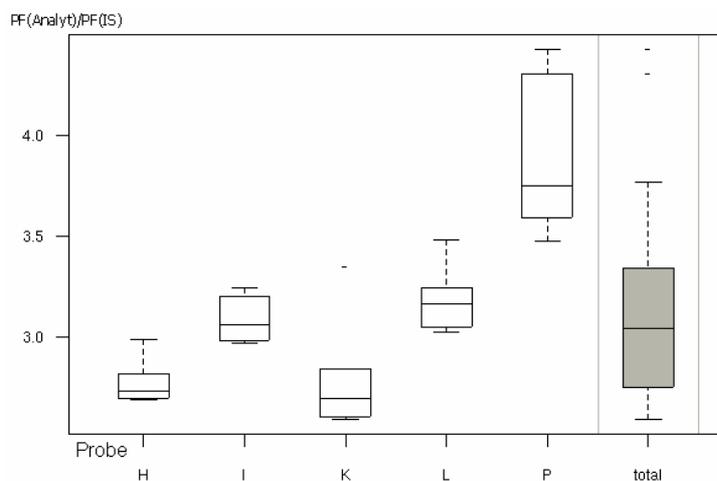
- H (-): Variante ohne Düngung.
 I (min.): Konventionell-mineralische gedüngte Variante.
 K (dyn.): Biologisch-dynamische gedüngte Variante, 1,4 DGVE/ha.
 L (org.): Organisch-biologisch gedüngte Variante, 1,4 DGVE/ha.
 P (konv.): Konventionell gedüngte Variante.

Abbildung 4-25: Nicht identifizierte Peaks in Maisproben.

4.2.4 Differenzierung und Klassifizierung von Maisproben

Da nicht alle mittels HPLC-Analytik gemessenen Inhaltsstoffe identifiziert werden konnten, wurde die weitere Auswertung auf der Grundlage der Messgröße $PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$ durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. Hinsichtlich der Validierungsfragen wurde eine Differenzierung durch LME/pairwise test durchgeführt. Tabellen der jeweiligen t-Werte und der p-Werte finden sich im Anhang.

Die Klassifizierung der unterschiedlichen Anbauvarianten wurde durch eine lineare Diskriminantenanalyse (LDA) vorgenommen. Für die Daten der Messungen des Peak Nr. 1 konnte eine Normalverteilung als Voraussetzung der Präzision nicht bestätigt werden. Auf die Vorstellung dieser Daten wurde daher verzichtet.

Lutein:

- H: Variante ohne Düngung.
 I: Konventionell-mineralische gedüngte Variante.
 K: Biologisch-dynamische gedüngte Variante, 1,4 DGVE/ha.
 L: Organisch-biologisch gedüngte Variante, 1,4 DGVE/ha.
 P: Konventionell gedüngte Variante.

Abbildung 4-26: Boxplot des Luteingehaltes ($PF(\text{Analyt})/PF(\text{interner Standard})$) in Maisproben.

Eine Differenzierung der Proben mit LME/pairwise test auf der Basis des Luteingehaltes ($PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$) ergibt das folgende Ergebnis:

	I	K	L	P
H	**	-	**	**
I		-	-	**
K			*	***
L				**

***= $p < 0,001$, **= $p < 0,01$, *= $p < 0,05$

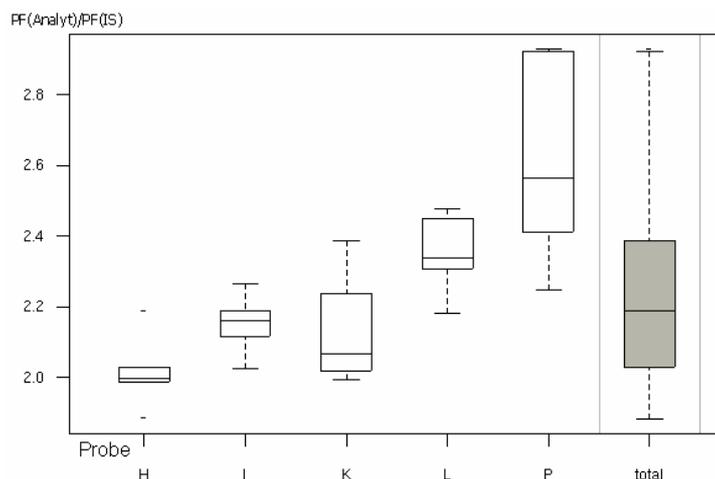
Der Probenunterschied bezogen auf den Gehalt von Lutein liegt in einem Bereich zwischen 0,35 % und 16,64 %, die Methodenpräzision beträgt 4,46 %.

Die Maisproben mit konventioneller N-Düngung (P) können von allen weiteren Anbauvarianten getrennt werden.

Die organisch-biologisch gedüngte Variante (L) kann von der ungedüngten Variante (H) und der biologisch-dynamischen Variante (K) differenziert werden.

Die Maisproben aus Anbau mit mineralischer N-Düngung können von den ungedüngten Proben unterschieden werden.

Zeaxanthin:



- H: Variante ohne Düngung.
 I: Konventionell-mineralische gedüngte Variante.
 K: Biologisch-dynamische gedüngte Variante, 1,4 DGVE/ha.
 L: Organisch-biologisch gedüngte Variante, 1,4 DGVE/ha.
 P: Konventionell gedüngte Variante.

Abbildung 4-27: Boxplot der Messergebnisse des Zeaxanthingehaltes ($PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$) in Mais.

Eine Differenzierung der Proben mit LME/pairwise test auf der Basis des Zeaxanthingehaltes ($PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$) ergibt das folgende Ergebnis:

	I	K	L	P
H	-	-	***	**
I		-	**	**
K			*	**
L				-

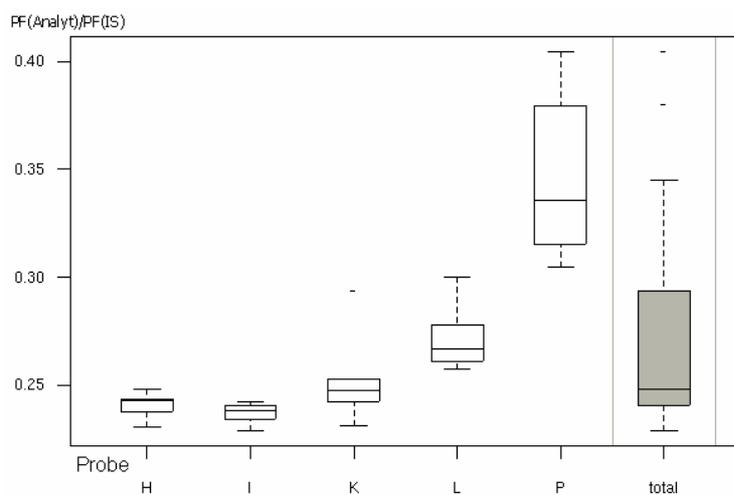
***= $p < 0,001$, **= $p < 0,01$, *= $p < 0,05$

Der prozentuale Unterschied zwischen den einzelnen Proben bezogen auf den Gehalt von Zeaxanthin liegt in einem Bereich zwischen 0,56 % und 12,82 %, die Methodenpräzision beträgt 4,58 %.

Die Maisproben mit konventioneller N-Düngung (P) können von allen weiteren Anbauvarianten außer der organisch gedüngten Variante unterschieden werden.

Die organisch-biologisch gedüngte Variante (L) kann von der ungedüngten Variante (H) und der biologisch-dynamischen Variante (K) getrennt werden.

Peak Nr. 2:



- H: Variante ohne Düngung.
 I: Konventionell-mineralische gedüngte Variante.
 K: Biologisch-dynamische gedüngte Variante, 1,4 DGVE/ha.
 L: Organisch-biologisch gedüngte Variante, 1,4 DGVE/ha.
 P: Konventionell gedüngte Variante.

Abbildung 4-28: Boxplot der Messergebnisse des Peaks Nr. 2 ($PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$) in Maisproben.

Eine Differenzierung der Proben durch den Peak Nr. 2 ($PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$) ergibt das folgende Ergebnis:

	I	K	L	P
H	-	-	**	**
I		-	-	**
K			*	**
L				**

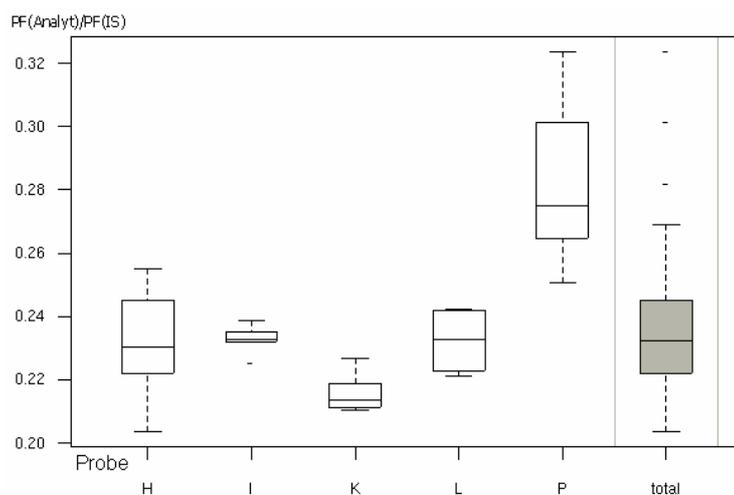
***= $p < 0,001$, **= $p < 0,01$, *= $p < 0,05$

Der prozentuale Unterschied zwischen den einzelnen Proben bezogen auf den Peak Nr. 2 liegt in einem Bereich zwischen 0,76 % und 18,66 %, die Methodenpräzision beträgt 4,07 %.

Die organisch-biologisch gedüngte Variante (L) kann von der ungedüngten Variante (H) und der biologisch-dynamischen Variante (K) differenziert werden.

Die Maisproben mit konventioneller N-Düngung (P) können von allen weiteren Anbauvarianten unterschieden werden.

Peak Nr. 6:



- H: Variante ohne Düngung.
 I: Konventionell-mineralische gedüngte Variante.
 K: Biologisch-dynamische gedüngte Variante, 1,4 DGVE/ha.
 L: Organisch-biologisch gedüngte Variante, 1,4 DGVE/ha.
 P: Konventionell gedüngte Variante.

Abbildung 4-29: Boxplot der Messergebnisse des Peaks Nr. 6 (PF(Alyt)/PF(IS)) in Maisproben.

Eine Differenzierung der Proben durch den Peak Nr. 6 (PF(Alyt)/PF (IS)) ergibt das folgende Ergebnis:

	I	K	L	P
H	-	-	-	**
I		***	-	**
K			**	**
L				**

***= $p < 0,001$, **= $p < 0,01$, *= $p < 0,05$

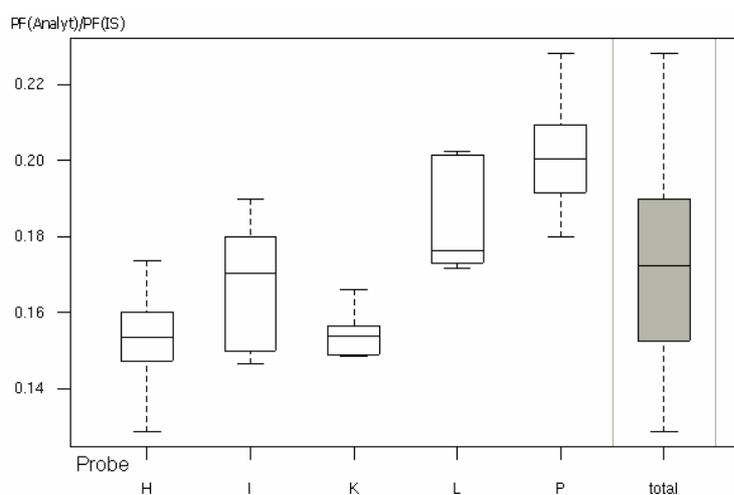
Der prozentuale Unterschied zwischen den einzelnen Proben bezogen auf den Peak Nr. 6 liegt in einem Bereich zwischen 0,11 % und 13,26 %, die Methodenpräzision beträgt

3,45 %. Alle signifikanten Unterschiede können mit der entsprechenden Präzision gemessen werden.

Die Maisproben mit konventioneller N-Düngung (P) können von allen weiteren Anbauvarianten getrennt werden.

Die organisch-biologisch gedüngte Variante (L) kann von der biologisch-dynamischen Variante (K) differenziert werden.

Peak Nr. 7:



- H: Variante ohne Düngung.
 I: Konventionell-mineralische gedüngte Variante.
 K: Biologisch-dynamische gedüngte Variante, 1,4 DGVE/ha.
 L: Organisch-biologisch gedüngte Variante, 1,4 DGVE/ha.
 P: Konventionell gedüngte Variante.

Abbildung 4-30: Boxplot der Messergebnisse des Peaks Nr. 7 ($PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$) in Maisproben.

Eine Differenzierung der Proben durch den Peak Nr. 7 ($PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$) ergibt das folgende Ergebnis:

	I	K	L	P
H	-	-	**	-
I		-	-	**
K			**	***
L				*

***= $p < 0,001$, **= $p < 0,01$, *= $p < 0,05$

Die Maisproben mit konventioneller N-Düngung (P) können von allen weiteren Anbauvarianten außer der ungedüngten Variante (H) unterschieden werden.

Die organisch-biologisch gedüngte Variante (L) kann von der ungedüngten Variante (H) und der biologisch-dynamischen Variante (K) differenziert werden.

In der Übersicht der Messergebnisse zeigen sich zwischen den einzelnen gemessenen Peaks rechnerische Zusammenhänge. Der Korrelationskoeffizient (nach Pearson) zwischen dem Lutein- und dem Zeaxanthingehalt bezogen auf alle Proben beträgt $r = 0,86$. Die rechnerischen Korrelationen zwischen allen ermittelten Peaks sind als Tabelle (4-21) dargestellt. Ob zwischen den rechnerisch korrelierenden Peaks auch ein kausaler Zusammenhang besteht, konnte in diesen Untersuchungen nicht geklärt werden.

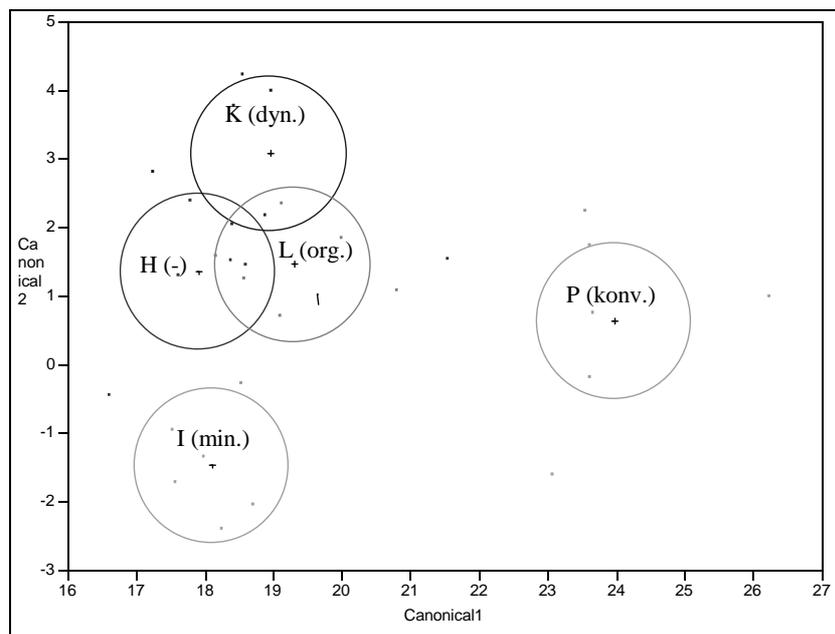
Tabelle 4-21: Korrelationen zwischen den einzelnen Peaks bezogen auf den Mittelwert

	Peak Nr. 2	Zeaxanthin	Lutein	Peak Nr. 6	Peak Nr. 7
Peak Nr. 1	0,99	-0,52	-0,34	0,056	-0,14
Peak Nr. 2	-	-0,46	-0,29	0,09	-0,08
Zeaxanthin	-	-	0,93	0,63	0,86
Lutein	-	-	-	0,89	0,93
Peak Nr. 6	-	-	-		0,85

Klassifizierung von Mais unterschiedlicher Anbauvarianten

Die Klassifizierung der codierten Proben und eine Einteilung in Gruppen erfolgten durch LDA. Mittels des Peaks Nr. 2 sowie Lutein und Zeaxanthin als Diskriminanten kann eine Differenzierung und Einteilung in Gruppen erfolgen. Das Ergebnis der LDA zeigt die Abbildung 4-31.

Die Proben H (ohne Düngung), K (biologisch-dynamische Düngung) und L (biologisch-organische Düngung) bilden eine Gruppe und können von den konventionell gedüngten Proben (P) und den konventionell mineralisch gedüngten Proben (I) getrennt werden. Die beiden konventionell erzeugten Varianten I (konventionell-mineralische Düngung) und P (konventionelle Düngung) bilden keine gemeinsame Gruppe und können voneinander getrennt werden. Die mineralische N-Düngung scheint somit kein Merkmal zu sein, anhand dessen eine Einteilung in Gruppen erfolgen kann.



Number Misclassified	3
Percent Misclassified	10
-2LogLikelihood	10.95

Abbildung 4-31: Lineare Diskriminanten Analyse (LDA) zur Trennung von Maisproben anhand der Messergebnisse der Substanzen Lutein und Zeaxanthin sowie des Peaks Nr. 2.

Eine Klassifizierung der decodierten Proben mittels CART-Verfahren ergibt eine Trennung in zwei Schritten. In einem ersten Split auf der Grundlage des nicht identifizierten Peak Nr. 1 können ungedüngte Proben und ökologisch erzeugte Proben nicht von einander getrennt werden. Konventionell gedüngte Proben bildeten mit einem Anteil der ökologisch erzeugten Proben (5%) eine weitere Untergruppe. Ein zweiter Split auf der Grundlage des nicht identifizierten Peak Nr. 6 erbringt eine Trennung der ungedüngten Proben von den ökologisch erzeugten Proben. Insgesamt wird ein Großteil der Proben (95 %) richtig nach dem Anbausystem klassifiziert.

Im Vergleich mit der Auswertung mittels LDA werden für diese Klassifizierung unterschiedliche Parameter benutzt. Die Hauptkomponenten Lutein und Zeaxanthin spielen für diese Art der Klassifizierung keine Rolle. Vor dem Hintergrund der nicht gegebenen Präzision für den Peak Nr. 1 muss diese Art der Klassifizierung jedoch kritisch betrachtet werden.

4.3 Messungen der Carotinoide in Möhren

Der Carotinoidgehalt in Möhren wurde als Einzelstoffanalytik der Carotinoide mit Messungen mittels HPLC-Analytik und durch photometrische Messungen der Carotinoide als Summenparameter bestimmt.

4.3.1 Identifizierung

Die Identifizierung der Carotinoide in Möhren wurde durch den Vergleich der Retentionszeiten und der UV-Spektren von Standardlösungen und Möhrenproben vorgenommen. Untersucht wurden Carotinoide, die in der Literatur als Inhaltsstoffe von Möhren beschrieben (2.3.1.5) und als Standardsubstanzen erhältlich sind. Die Ergebnisse dieser Messungen sind unter der Beschreibung der Findung der Spezifität (4.3.2.3) dargestellt.

Darüber hinaus wurden Co-Chromatographien mit Möhrenextrakten und den genannten Standardsubstanzen durchgeführt, die gleichzeitig zur Bestätigung der Richtigkeit der Methode dienen.

Das Ergebnis der Messungen mittels HPLC-Analytik besteht in einem Chromatogramm mit 4 voneinander getrennten Peaks. Diese Peaks treten in allen untersuchten Proben auf. In keiner Probe konnten weitere Peaks detektiert werden. Nach der beschriebenen Art der Identifizierung handelt es sich dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit um die Substanzpeaks von Lutein, α -Carotin und β -Carotin sowie um den internen Standard β -apo-8-Carotenal. Ein struktureller Nachweis der Einzelkomponenten konnte im Rahmen der vorliegenden Messungen nicht erfolgen.

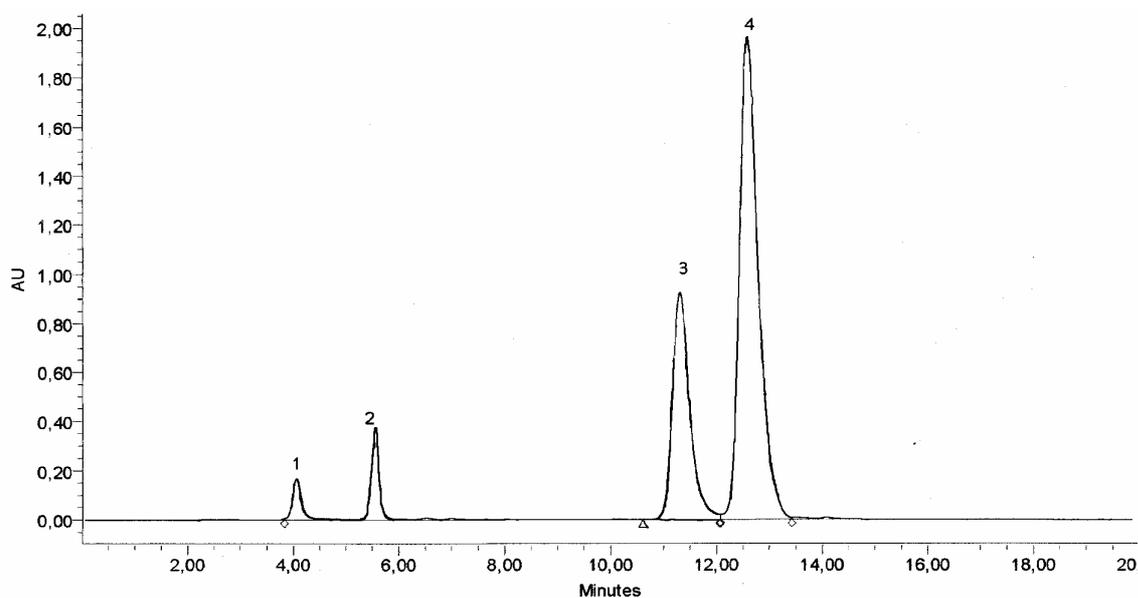


Abbildung 4-32: Exemplarische Darstellung des Chromatogrammes einer Möhrenprobe der Sorte 'Rodelika' unter Standardbedingungen. Peak Nr. 1 = Lutein (Rt: 4,073 min), Peak Nr. 2 = β -apo-8-Carotenal (Rt: 5,526 min), Peak Nr. 3 = α -Carotin (Rt: 11,321 min), Peak Nr. 4 = β -Carotin (Rt: 12,593 min).

4.3.2 Validierungsschritte der HPLC-Methodik zur Messung von Carotinoiden in Möhren

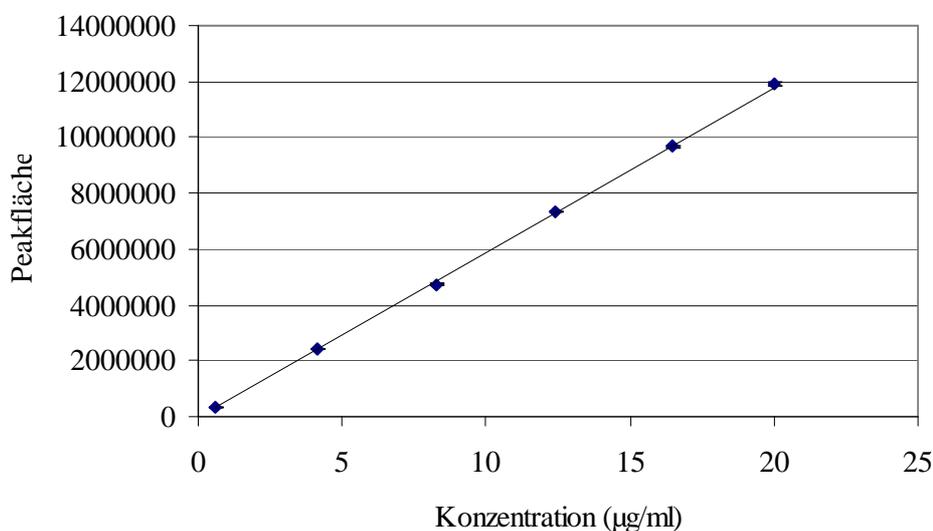
4.3.2.1 Linearität

Linearität des internen Standards β -apo-8-Carotenal

Die Linearität des internen Standards β -apo-8-Carotenal wurde mit einer Standardverdünnungsreihe im Konzentrationsbereich zwischen 0,62 $\mu\text{g/ml}$ und 20 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt. Der Standard hatte eine Reinheit von $> 98\%$ (Roth). Für die Bestimmung wurde eine Verdünnungsreihe in 6-facher Probenwiederholung erstellt. Von jeder Probe wurden 15 μl mit der HPLC untersucht.

Tabelle 4-22: Bestimmung der Linearität des internen Standards β -apo-8-Carotenal

Nr.	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Peakfläche (AU*min)	s	V_K
1	20	11887029	124987,57	1,05
2	16,5	9669941	38924,89	0,40
3	12,4	7328795	31269,78	0,43
4	8,25	4739994	27110,05	0,57
5	4,13	2409985	12734,54	0,53
6	0,62	363372	2379,68	0,65

Abbildung 4-33: Linearität mit β -apo-8-Carotenal-Standardlösungen. Dargestellt sind die Mittelwerte einer 6-fachen Probenwiederholung mit den jeweiligen Standardabweichungen und die errechnete Trendlinie.

Es ergibt sich eine lineare Regression mit hoher Korrelation.

Geradengleichung: $y = 593369x - 55071$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,9998$

Korrelationskoeffizient: $r = > 0,999$

Linearität von Lutein

Die Linearität wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt. Die eingesetzten Standardlösungen wurden aus kristalliner Lutein-

Standardsubstanz mit einer Reinheit von > 98 % (Roth) angefertigt. Die Standardlösungen wurden in 6-facher Probenwiederholung angefertigt und jeweils 15 µl der Lösungen wurden mit der HPLC vermessen.

Tabelle 4-23: Bestimmung der Linearität von Lutein in unterschiedlichen Konzentrationen

Nr.	Konzentration (µg/ml)	Peakfläche (AU*min)	s	V _K
1	1	64.129	2062,62	3,22
2	20	3.628.111	126439,64	3,48
3	40	7.379.671	201729,97	2,73
4	60	11.131.231	297878,38	2,68
5	80	14.882.791	218204,92	1,47
6	100	18.634.351	90420,97	0,49

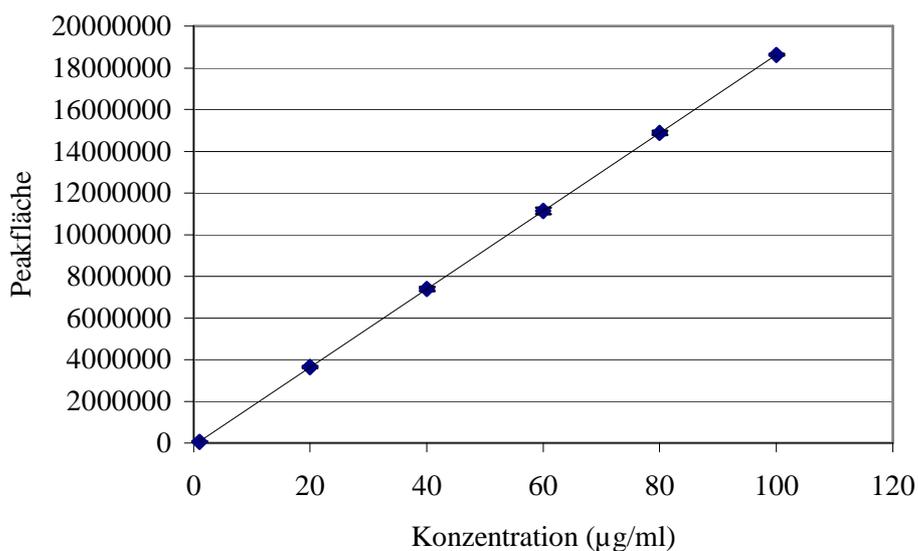


Abbildung 4-34: Linearität von Lutein-Standardlösungen. Dargestellt sind die Mittelwerte einer 6-fachen Probenwiederholung sowie die errechnete Trendlinie.

Es ergibt sich eine lineare Regression mit hoher Korrelation.

Geradengleichung: $y = 187578x - 123449$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,998$

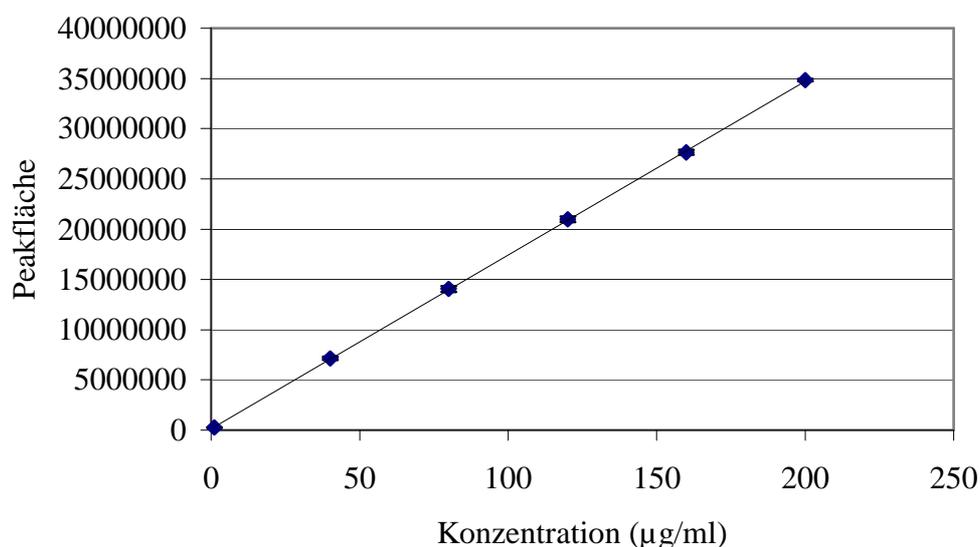
Korrelationskoeffizient: $r = > 0,999$

Linearität von α -Carotin

Die Linearität von α -Carotin wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt. Die eingesetzten Standardlösungen wurden aus kristalliner Standardsubstanz (CaroteNature) mit einer Reinheit von $> 98\%$ angefertigt. Die jeweiligen Konzentrationsintervalle sind als Tabelle dargestellt. Zur Bestimmung der Kalibriergeraden (Abb. 4-35) wurden die Standardlösungen in 6-facher Probenwiederholung angefertigt und jeweils 15 μl der Lösungen mit der HPLC unter Standardbedingungen vermessen.

Tabelle 4-24: Bestimmung der Linearität von α -Carotin in unterschiedlichen Konzentrationen

Nr.	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Peakfläche (AU*min)	s	V_K
1	1	277981	13910,27	5,00
2	40	7129821	274834,75	3,85
3	80	14050561	587972,58	4,18
4	120	20971301	488247,50	2,33
5	160	27642041	477013,17	1,73
6	200	34812781	245117,46	0,70

Abbildung 4-35: Linearität von α -Carotin Standardlösung. Dargestellt sind die Mittelwerte einer 6-fachen Probenwiederholung mit Standardabweichungen und die errechnete Trendlinie.

Es ergibt sich eine lineare Regression mit hoher Korrelation:

Geradengleichung: $y = 172852x + 166755$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,99$

Korrelationskoeffizient: $r = > 0,999$

Linearität von β -Carotin

Die Linearität wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{g/ml}$ und 500 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt. Die eingesetzten Standardlösungen wurden aus kristalliner β -Carotin-Standardsubstanz (Roth) mit einer Reinheit von $> 98 \%$ angefertigt. Die jeweiligen Konzentrationsintervalle sind als Tabelle dargestellt. Die Lösungen wurden in 6-facher Probenwiederholung angefertigt und jeweils 15 μl der Lösungen mit der HPLC vermessen.

Tabelle 4-25: Bestimmung der Linearität von β -Carotin in unterschiedlichen Konzentrationen

Nr.	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Peakfläche (AU*min)	s	V_K
1	1	277642	10907,96	3,93
2	100	17501931	706159,78	4,03
3	200	34793781	1173126,07	3,37
4	300	52085631	1368445,45	2,63
5	400	69377481	1760262,99	2,54
6	500	86669331	1324899,06	1,53

Es ergibt sich eine lineare Regression mit hoher Korrelation.

Geradengleichung: $y = 173069x + 154887$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,998$

Korrelationskoeffizient: $r = > 0,99$

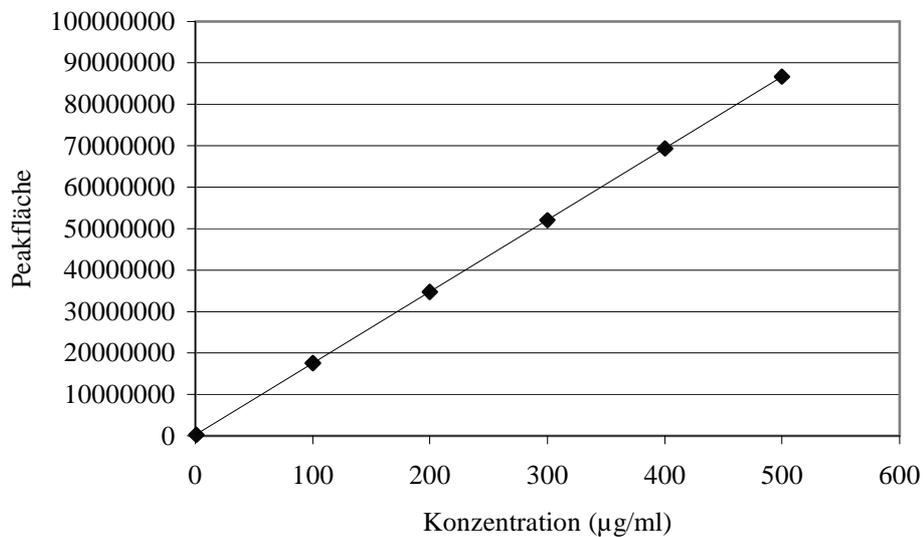


Abbildung 4-36: Linearität von β -Carotin-Standardlösungen. Dargestellt sind die Mittelwerte einer 6-fachen Probenwiederholung und die errechnete Trendlinie.

Mit den Messungen zur Bestimmung der Linearität kann bestätigt werden, dass für alle Peaks ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten und der Signalintensität besteht. Die Kalibriergeraden erfüllen die Anforderungen an die Äquidistanz, die Korrelationskoeffizienten liegen in einem Bereich von $r > 0,99$. Für die Substanzen β -apo-8-Carotenal, Lutein, α -Carotin und β -Carotin kann die Linearität damit bestätigt werden.

4.3.2.2 Präzision

In der Durchführung der Messungen zur Findung der Präzision wurde in die Bestimmung der Gerätepräzision, der Methodenpräzision und der Wiederholpräzision unterschieden. Weiterhin wurde die laborinterne Präzision im Sinne der intermediate precision mit einer zweiten Prüfperson bestimmt.

Für die Ermittlung der Geräte- und der Messpräzision wurden Lösungen der Standardsubstanzen Lutein (20 µg/ml), α -Carotin (40 µg/ml), β -Carotin (150 µg/ml) und β -apo-8-

Carotenal angesetzt und in 6-facher Messwiederholung mit der HPLC vermessen. Um mögliche Einflüsse durch Faktoren aus der Probenmatrix zu ermitteln, wurde die Messpräzision mit Realproben ermittelt. Diese wurden in 6-facher Messwiederholung mit der HPLC unter Standardbedingungen untersucht.

Die Methodenpräzision wurde mit allen Realproben ermittelt. Diese wurden in 5-facher Probenwiederholung mit der HPLC unter Standardbedingungen untersucht und für die jeweiligen Substanzpeaks ausgewertet.

Die Prüfung der laborinternen Präzision wurde exemplarisch mit Möhren der Sorte 'Rodelika' (N-) durchgeführt. Dafür wurden die Möhrenproben von zwei Prüfern unter den Standardbedingungen in jeweils 6-facher Probenwiederholung aufbereitet und extrahiert. Diese Extrakte wurden direkt im Anschluss an die Extraktion am selben Tag am selben Gerät unter den gleichen Bedingungen mit der HPLC vermessen.

Tabelle 4-26: Präzision in Möhrenproben

	Gerätepräzision V_K	Messpräzision V_K	Methodenpräzision V_K	Intermediate precision V_K
Lutein	0,15	0,32	4,35	2,28
β -apo-8-				
Carotenal	0,15	0,39	1,15	1,61
α -Carotin	0,16	0,24	3,67	2,01
β -Carotin	0,3	0,33	5,01	2,15

Eine Voraussetzung für die Präzision einer analytischen Messung ist das Vorliegen einer Normalverteilung der Daten. Für alle Messungen der Präzision erfolgte eine Überprüfung der Daten auf Normalverteilung mittels des Tests nach David ($p = 95\%$). Während der Messungen der Methodenpräzision wurde die Normalverteilung für jeden Analyten jedes einzelnen Probensatzes überprüft. Für die vorliegenden Untersuchungen konnte während der Messungen zur Mess- und Gerätepräzision die Normalverteilung nach David bestätigt werden.

Die Bestimmungen der Gerätepräzision und der Messpräzision beziehen sich nur auf den instrumentellen Messvorgang. In den vorliegenden Messungen sind die Anforderungen an die Geräte- und die Messpräzision (KROMIDAS, 1999) in allen Messungen erfüllt.

Die erreichbare Methodenpräzision ist von der Konzentration des Analyten in der Matrix abhängig. Die Richtwerte für den Pharmabereich liegen für Analytgehalte von 1-10 % bei einem V_K von 5 % und für Analytgehalte von < 1 % bei einem V_K von 10 % (KROMIDAS, 1999). Die Konzentrationen der Carotinoide liegen für Lutein, α -Carotin und β -Carotin in einem Bereich zwischen 22,48 $\mu\text{g/g TM}$ - 40,53 $\mu\text{g/g TM}$, 242,60 $\mu\text{g/g}$ - 451,36 $\mu\text{g/g}$ bzw. 563,59 $\mu\text{g/g TM}$ - 1121,20 $\mu\text{g/g TM}$, also in einem Bereich kleiner als 1 %. Die Anforderungen an die Präzision konnten für diese Substanzen somit erfüllt werden. Erwartungsgemäß nimmt die Präzision von der Gerätepräzision über die Messpräzision bis hin zur Methodenpräzision ab. Die Grenzen für die Methodenpräzision können ebenfalls von den Messungen der intermediate precision eingehalten werden, obwohl in diesen Messungen mit einer weiteren Prüfperson eine zusätzliche Fehlerquelle vorhanden ist. Die Abnahme der V_K der intermediate precision im Vergleich zur Methodenpräzision ist vermutlich dadurch zu erklären, dass für die Ermittlung der intermediate precision lediglich eine Möhrenqualität gemessen wurde. Für die Methodenpräzision dagegen wurden die Messungen aller Möhrenproben berücksichtigt. Dies kann durch Einflüsse der Probenmatrix bedingt sein, die Präzision der Erfassung des internen Standards ist nicht beeinträchtigt. Die Präzision ist nach diesen Kriterien gegeben.

Die Güte der Methodenpräzision für die vorliegenden Fragestellungen zur Differenzierung und Klassifizierung von Möhren durch einzelne Inhaltsstoffe ergab sich jeweils vor dem Hintergrund der Unterschiede der jeweiligen Proben. Für alle gemessenen Proben wurden die Unterschiede berechnet und vor dem Hintergrund der jeweiligen Methodenpräzision ausgewertet.

4.3.2.3 Spezifität

Die Prüfung der Spezifität des HPLC-Verfahrens wurde durch den Vergleich der UV-Spektren der Analyt-Peaks in einer Standardlösung und einer Realprobe vorgenommen. Durch den Einsatz eines Dioden-Array-Detektors konnten die UV-Spektren der Proben in einem festgelegten Wellenlängenbereich aufgezeichnet werden. Beim Vergleich der UV-Spektren wurden die Absorptionsmaxima und die Lage der Wendepunkte in Relati-

on zur Retentionszeit im Chromatogramm beurteilt. In der praktischen Durchführung wurden dafür die UV-Spektren der Standardsubstanzen Lutein, α -Carotin und β -Carotin aus den Versuchen zur Ermittlung der Linearität dieser Substanzen extrahiert.

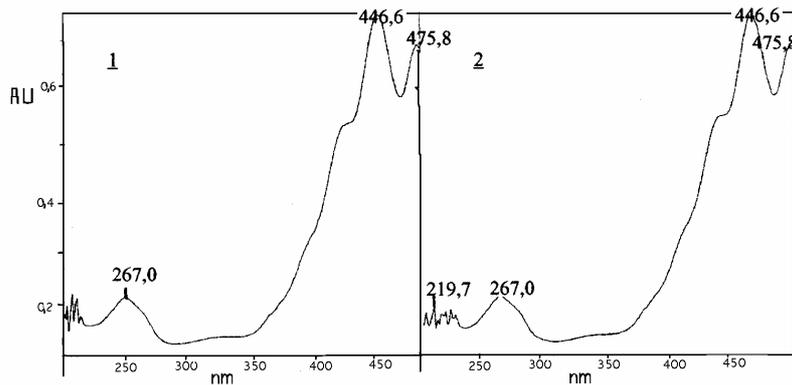


Abbildung 4-37: UV-Spektren von Lutein im Wellenlängenbereich zwischen 210 und 480 nm. 1 = UV-Spektrum einer Lutein-Standardlösung (Rt: 4,132 min), 2 = UV-Spektrum einer Möhrenprobe der Sorte 'Rodelika' (Rt: 4,073 min).

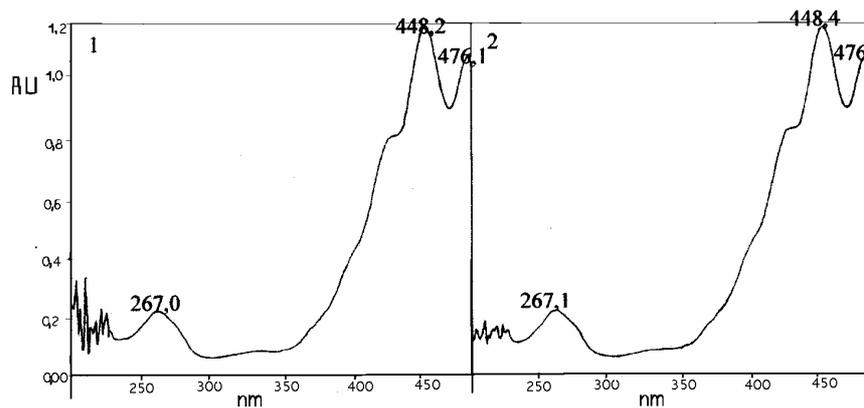


Abbildung 4-38: UV-Spektren von α -Carotin im Wellenlängenbereich zwischen 210 und 480 nm. 1 = UV-Spektrum einer α -Carotin-Standardlösung (Rt: 11,523 min), 2 = UV-Spektrum einer Möhrenprobe der Sorte 'Rodelika' (Rt: 11,321 min).

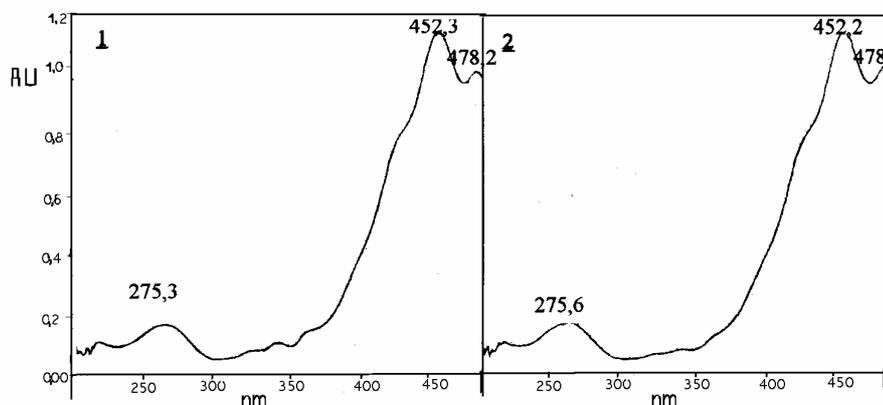


Abbildung 4-39: UV-Spektren von β -Carotin. Absorptionsmaxima in einem Wellenlängenbereich zwischen 210 und 480 nm. 1 = UV-Spektrum einer β -Carotin-Standardlösung (Rt: 12,712 min), 2= UV-Spektrum einer Möhrenprobe der Sorte 'Rodelika' (Rt: 12,593 min).

Als Ergebnis der Vergleiche zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen den UV-Spektren von Standardlösungen und Spektren aus Möhrenproben bezüglich der Retentionszeiten und den Absorptionsmaxima. Somit ist ein Hinweis auf die Spezifität des Analysenverfahrens gegeben.

4.3.2.4 Richtigkeit

Für die vorliegenden Untersuchungen stand kein Standardmaterial für Möhren mit definiertem Inhaltsstoffgehalt zur Verfügung. Um eine Aussage über die Richtigkeit treffen zu können, wurde die Wiederfindung des internen Standards berechnet. In weiteren Messungen wurde die Wiederfindung der einzelnen Carotinoide mit aufgestockten Proben untersucht.

Wiederfindung des internen Standards

Für die Bestimmung der Richtigkeit wurde die Wiederfindung des internen Standards aus den Messwerten zur Messpräzision, zur Wiederholpräzision und zur Bestimmung der intermediate precision errechnet. Zur Bestimmung des wahren Wertes wurden nach

jeweils 5 HPLC-Läufen Lösungen des internen Standards, die der rechnerischen Konzentration der Proben entsprachen, unter den Standardbedingungen mit der HPLC vermessen. Als Berechnungsgrundlage diente die gemessene Peakfläche. Für den internen Standard wurden folgende Wiederfindungsraten ermittelt:

Tabelle 4-27: Wiederfindung des internen Standards in Möhrenproben

Wiederfindungsrate (%) des internen Standards bei Messungen zur:		
Messpräzision	Methodenpräzision	Intermediate precision
99,42 % - 100,54 %	95,93 % - 103,62 %	95,01 % - 103,62 %

Während aller Messungen wurden folgende Kenngrößen ermittelt:

Mittelwert der Peakfläche (AU*min): 2721365

s: 68455,73

V_K : 2,52

Die Präzision der Standardsubstanz über den gesamten Messzeitraum ist somit als gut zu beurteilen. Die Werte sind nach dem David-Test (KROMIDAS, 1999) normalverteilt. ($P = 0,1\%$, $PG = 4,549$, $g_u = 1,99$, $g_o = 5,90$, $n = 100$).

Wiederfindung der Carotinoide Lutein, α -Carotin und β -Carotin

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden 3 bereits vermessene Ansätze der Möhrenproben mit einer bekannten Menge einer der Standardsubstanzen Lutein, α -Carotin oder β -Carotin versetzt und mit der HPLC gemessen und analysiert. Zu jeweils 0,5 ml einer bekannten Probe wurden 0,5 ml der Standardlösungen zugegeben. Die Konzentrationen der zugesetzten Lösungen sind in den folgenden Tabellen (4-28 bis 4-30) dargestellt. Aus der Differenz der Analyten in den aufgestockten Proben und den nicht aufgestockten Proben wurden die Wiederfindungsraten (WF) berechnet.

Tabelle 4-28: Richtigkeit der Messungen von Lutein

Lutein zugesetzt ($\mu\text{g/ml}$)	Lutein berechnet ($\mu\text{g/ml}$)	Lutein gemessen ($\mu\text{g/ml}$)	WF (%)
1	10,90	10,83	99,37
10	11,22	11,10	98,86
20	11,51	11,36	98,66

Tabelle 4-29: Richtigkeit der Messungen von α -Carotin

α -Carotin ($\mu\text{g/ml}$)	zugesezt	α -Carotin ($\mu\text{g/ml}$)	berechnet	α -Carotin ($\mu\text{g/ml}$)	gemessen	WF (%)
20		86,78		86,09		99,21
40		106,78		105,16		98,49
50		116,93		114,66		98,07

Tabelle 4-30: Richtigkeit der Messungen von β -Carotin

β -Carotin ($\mu\text{g/ml}$)	zugesezt	β -Carotin ($\mu\text{g/ml}$)	berechnet	β -Carotin ($\mu\text{g/ml}$)	gemessen	WF (%)
50		236,65		230,59		97,44
75		261,94		255,33		97,47
100		287,23		275,49		95,91

Die Wiederfindung in allen durchgeführten Untersuchungen liegt innerhalb des geforderten Bereiches zwischen 95 % - 105 %. Die Methode erweist sich als richtig.

4.3.2.5 Robustheit

Zur Überprüfung der Robustheit der Methode wurde die Störanfälligkeit gegenüber der Wahl von Chemikalien einer anderen Chargennummer zur Probenextraktion überprüft. Darüber hinaus wurden Einflüsse durch die Wahl der Säulentemperatur und die Wahl der Säule selbst überprüft.

Einfluss auf das Messergebnis durch die Probenextraktion mit Chemikalien einer anderen Chargennummer

Zur Überprüfung der Robustheit der Methode wurde die Störanfälligkeit gegenüber den Einflüssen durch die Wahl von Chemikalien der gleichen Spezifikation (p.a.) desselben Herstellers (Merck) mit einer anderen Chargennummer zur Probenextraktion überprüft. Verändert wurden die verwendete Charge des Methanol während der Extraktion der

Proben und als mobile Phase sowie die Charge des Tetrahydrofuran. Eine Möhrenprobe der Sorte 'Rothild' wurde mit diesen Chemikalien in 5-facher Probenwiederholung extrahiert und mit der HPLC unter Standardbedingungen vermessen. Die Darstellung der Messergebnisse erfolgt als Abbildung (Abb. 4-40).

Als Ergebnis dieser Untersuchungen zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Messergebnissen zwischen den Extraktionen und Messungen mit 2 unterschiedlichen Chargen von Chemikalien. Die HPLC-Methodik ist in diesem Punkt robust gegenüber Änderungen in der Standardprozedur.

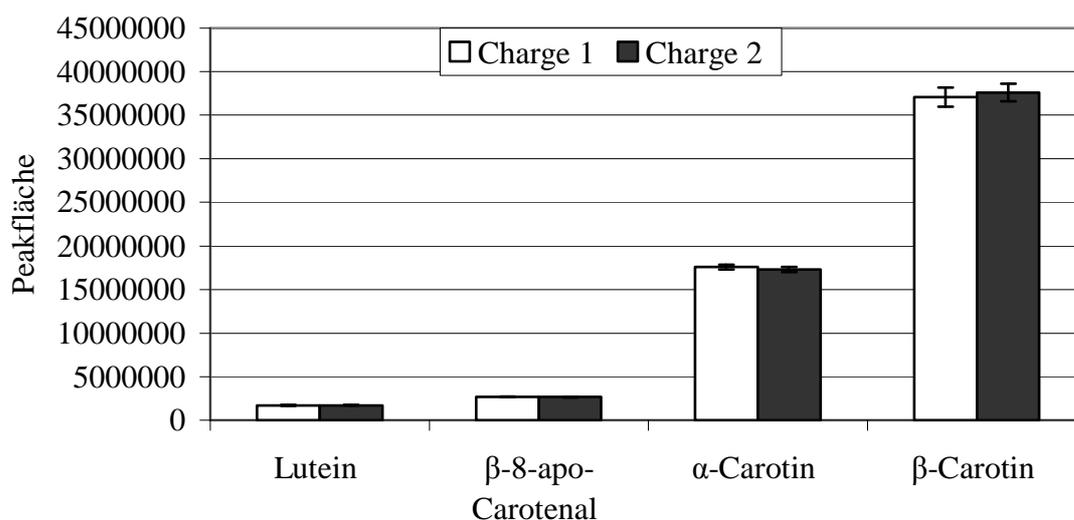


Abbildung 4-40: Einfluss der Verwendung von Chemikalien anderer Chargen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Peakfläche (AU*min) einer 5-fachen Probenwiederholung und die Standardabweichungen.

Einfluss der Säulentemperatur

Möhren der Sorte 'Rothild' wurden nach den Standardbedingungen aufbereitet und in 5-facher Probenwiederholung mit der HPLC vermessen. Alle Proben wurden jeweils bei einer Säulentemperatur von 20 °C (Standardbedingungen) und zum Vergleich bei 30 °C und 40 °C wiederholt.

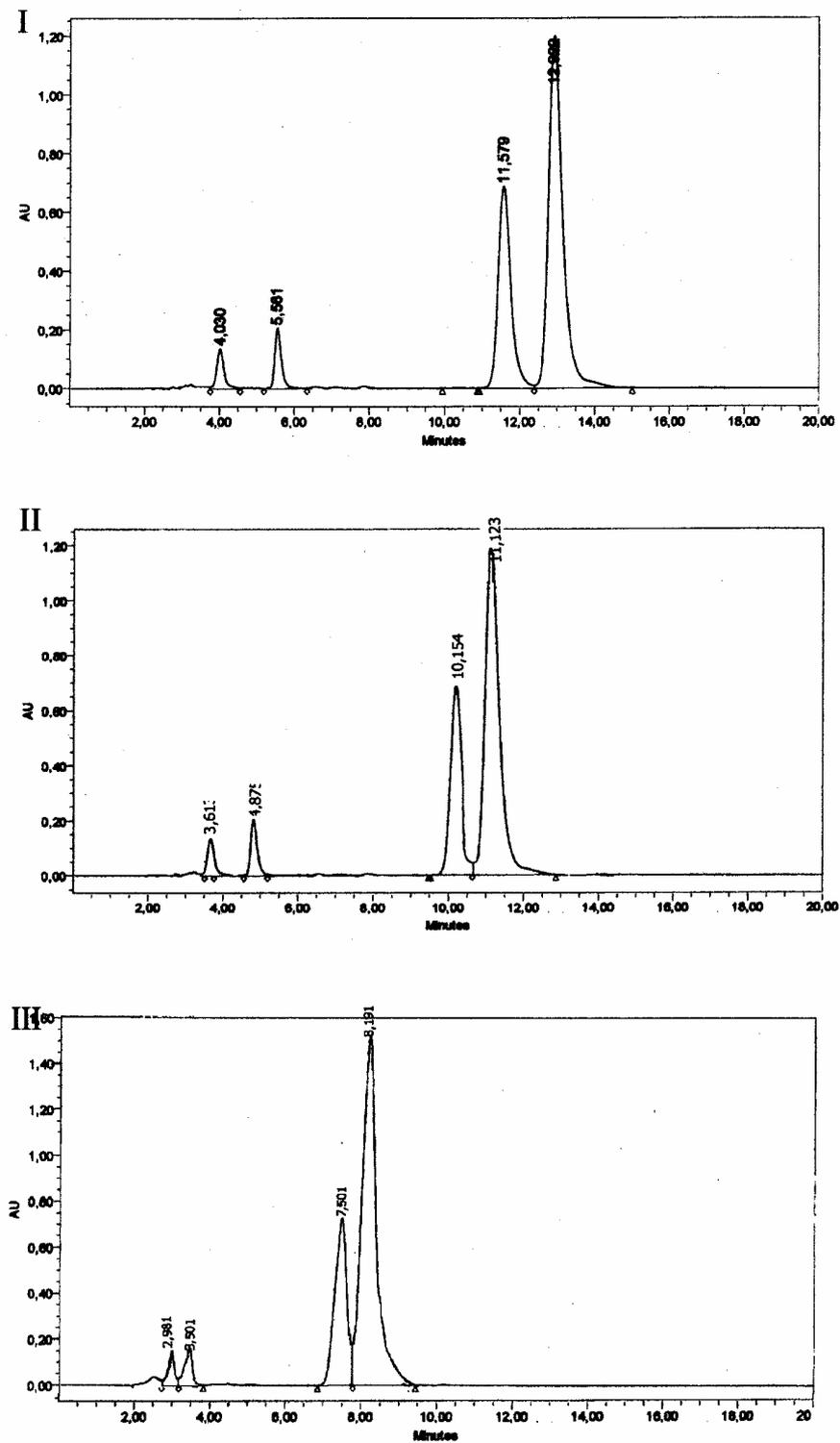


Abbildung 4-41: Einfluss der Säulentemperatur auf die resultierenden Chromatogramme gleicher Möhrenproben bei 20 °C (I), 30 °C (II) und 40 °C (III).

Tabelle 4-31: Einfluss der Säulentemperatur auf die Mittelwerte ($n=5$) der Messergebnisse der Peakflächen (AU*min) und der Retentionszeiten (Rt.) in Möhrenproben

	Säulentemperatur: 20 °C			
	Rt (min)	Peakfläche (AU*min)	s	V _K
Lutein	4,06	1712702,80	88865,88	5,19
β-apo-8-Carotenal	5,54	2687768,20	71308,91	2,65
α-Carotin	11,55	17570871,60	582332,93	3,31
β-Carotin	12,94	37100864,81	2177502,80	5,87
	Säulentemperatur: 30 °C			
	Rt (min)	Peakfläche (AU*min)	s	V _K
Lutein	3,60	1767624,80	93259,29	5,28
β-apo-8-Carotenal	4,79	2644847,40	79688,13	3,01
α-Carotin	10,09	16252028,80	860864,84	5,30
β-Carotin	11,13	34941908,00	2252207,38	6,45
	Säulentemperatur: 40 °C			
	Rt (min)	Peakfläche (AU*min)	s	V _K
Lutein	3,00	1428678,60	105129,45	7,36
β-apo-8-Carotenal	3,42	2523738,80	118559,37	4,70
α-Carotin	7,52	13131843,40	1061968,36	8,09
β-Carotin	8,19	30694934,80	2661457,96	8,67

Als Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt sich eine Verschiebung der Retentionszeiten, die bei allen Proben beobachtet werden kann, gleichzeitig verringert sich die Trennleistung des Systems. Mit der Verschiebung der Retentionszeiten der Peaks geht eine zunehmende Überlappung der Substanzpeaks von α-Carotin und β-Carotin bzw. von Lutein und β-apo-8-Carotenal einher. Bei allen Substanzen nimmt mit steigender Säulentemperatur das Messsignal ab, während die Präzision vermindert wird. Da eine Quantifizierung der einzelnen Substanzen mit Kalibriergeraden unter den jeweiligen Messbedingungen nicht erfolgen konnte, diente als Berechnungsgrundlage die Peakfläche.

Einfluss der HPLC-Säule

In der Durchführung wurden Möhrenextrakte unter den Standardbedingungen mit der HPLC vermessen wobei zur Trennung zwei unterschiedliche HPLC-Säulen (Vydac

201TP54 und Waters, Nova-Pak, C18, 3,9 x 150 mm) zum Einsatz kamen. Die Messungen erfolgten als 5-fache Probenwiederholung.

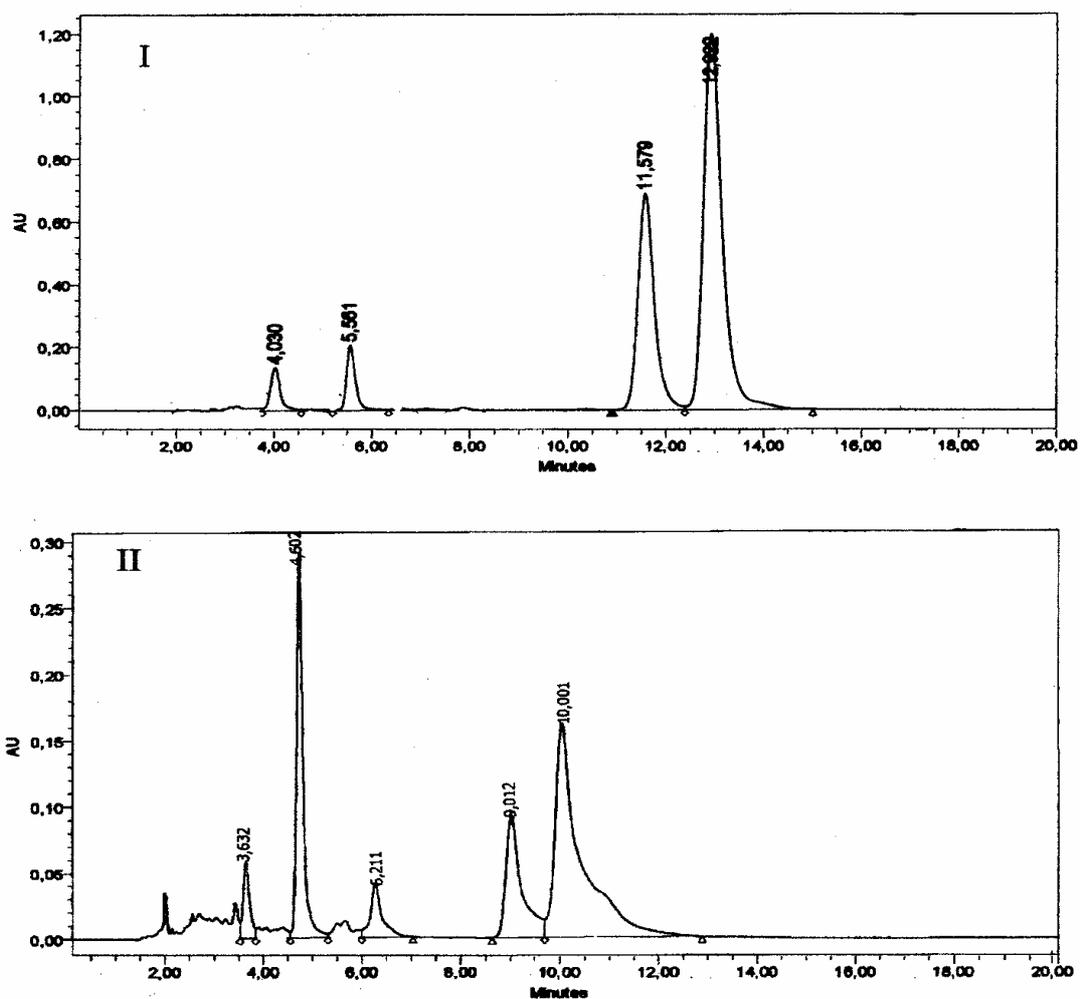


Abbildung 4-42: Einfluss der Säule auf das Chromatogramm von Möhrenproben. Chromatogramme von Möhrenproben der Sorte 'Rothild' unter Standardbedingungen mit unterschiedlichen Säulen (I = Vydac 201TP54, II = Waters, Nova-Pak, C18, 3,9 x 150 mm).

Als Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt sich eine unterschiedliche Trennleistung der unterschiedlichen Säulen. Statt der vier Peaks für die Substanzen Lutein, β -apo-8-Carotenal, α -Carotin und β -Carotin werden mit der zweiten Säule fünf Peaks detektiert. Diese Peaks entsprechen weder hinsichtlich der Retentionszeiten noch der gemessenen

Peakflächen den Peaks aus der Trennung mittels der Vydac Säule. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen dargestellt, als Berechnungsgrundlage diente die gemessene Peakfläche.

Tabelle 4-32: Einfluss der Säule auf das Ergebnis der HPLC-Analytik von Carotinoiden in Möhren. Aufgeführt sind die Messergebnisse einer Möhrenprobe nach Trennung unter Standardbedingungen mit einer Vydac 201TP54 Säule.

	Rt (min)	Peakfläche (AU*min)	s	V _K
Lutein	4,07	2707768,2	50836,53	1,88
β-apo-8-Carptenal	5,53	1882592,2	72852,92	3,86
α-Carotin	11,29	25724323,6	1538371,78	5,98
β-Carotin	12,61	63732142	4233487,47	6,64

Tabelle 4-33: Einfluss der Säule auf das Ergebnis der HPLC-Analytik von Carotinoiden in Möhren. Aufgeführt sind die Messergebnisse einer Möhrenprobe nach Trennung unter Standardbedingungen mit einer Waters, Nova-Pak, C18 Säule

	Rt (min)	Peakfläche (AU*min)	s	V _K
Peak Nr. 1	3,65	255902,60	16655,80	6,51
Peak Nr. 2	4,58	1829264,60	121349,19	6,63
Peak Nr. 3	6,20	437634,00	26105,88	5,97
Peak Nr. 4	9,17	2164549,60	260406,85	12,03
Peak Nr. 5	9,91	6332368,80	854086,34	13,48

Im Punkt der Robustheit wurden die Einflüsse durch die Säulentemperatur und das Säulenmaterial ermittelt. Durch das Arbeiten nach gleich bleibenden Bedingungen können diese Einflüsse vermieden werden. Gegenüber einem Wechsel der Chargen der Chemikalien zur Extraktion und als mobile Phase ist die Methode robust.

4.3.3 Photometrischen Bestimmung der Gesamtcarotinoide in Möhren - Grundkalibrierung

Das Prinzip der Messung der Gesamtcarotinoide lehnt sich an eine von WALBRAUCH (1984) beschriebene Methode an. Aus der photometrisch gemessenen Extinktion eines Möhrenextraktes bei 452 nm wurden die Gesamtcarotinoide als β-Carotin berechnet.

Für diese Arbeit beschränkte sich die Prüfung der Methode auf eine Grundkalibrierung, welche die Punkte Linearität und Präzision umfasste.

4.3.3.1 Linearität

Die Überprüfung der Linearität und die Bestätigung des Messbereiches für die Proben sowie die Quantifizierung erfolgten mittels einer Kalibriergeraden. Dafür wurde eine Kalibriergerade mit β -Carotin Standardlösungen (Roth) in Konzentrationen zwischen $0,35 \mu\text{g/ml}$ und $50 \mu\text{g/ml}$ in jeweils 6-facher Probenwiederholung aufgenommen und ausgewertet. Die Messergebnisse dienten daneben auch der Bestimmung der Gerätepräzision. Die Berechnung des Gesamtcarotinoidgehaltes erfolgte als $\mu\text{g } \beta\text{-Carotin/g}$.

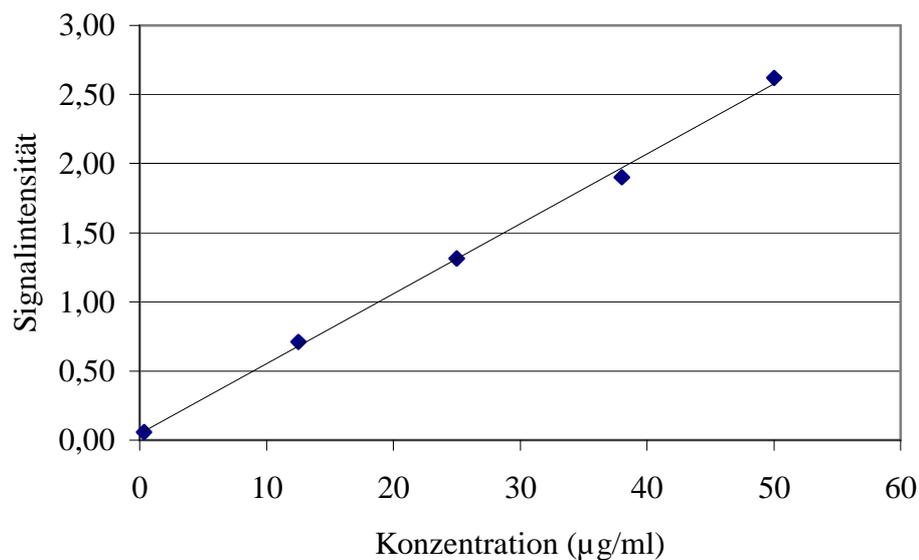


Abbildung 4-43: Kalibriergerade für β -Carotin-Standardlösungen bei einer Wellenlänge von 452 nm.

Es ergab sich eine lineare Regression mit einer hohen Korrelation.

Geradengleichung: $y = 0,0506x + 0,0474$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,998$

Korrelationskoeffizient: $r = 0,999$

Mit den Untersuchungen zur Linearität kann bestätigt werden, dass für den gesamten überprüften Messbereich zwischen 0,35 µg/ml und 50 µg/ml β-Carotin ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten und der Messgröße besteht. Für die photometrischen Messungen des Carotinoidgehaltes in den untersuchten Möhren wurden die Extrakte im Verhältnis 1:9 mit einer Mischung aus MeOH/THF (1:1, v:v) verdünnt, sodass alle Messungen im Bereich der linearen Datenaufnahme lagen.

4.3.3.2 Präzision

Die Ermittlung der Präzision wurde in die Messung der Gerätepräzision, der Messpräzision und der Methodenpräzision unterteilt.

Gerätepräzision und Messpräzision

Die Gerätepräzision wurde durch die 6-fache Messwiederholung von β-Carotin Standardlösungen in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,35 – 50 µg/ml ermittelt. Dabei wurden die Daten für die Messungen zur Linearität zugrunde gelegt. Die Messpräzision wurde durch Messungen von Realproben in 6-facher Messwiederholung gemessen. Die Mittelwerte, die Standardabweichungen und der jeweilige V_K sind als Tabelle dargestellt.

Tabelle 4-34: Gerätepräzision und Messpräzision der photometrischen Messungen des Gesamtcarotinoidgehaltes

β-Carotin (µg/ml)	Gerätepräzision			Messpräzision		
	MW	s	V_K	MW	s	V_K
50	2,62	0,004	0,16	2,62	0,004	0,16
38	1,96	0,004	0,20	1,90	0,006	0,30
25	1,29	0,003	0,26	1,31	0,006	0,44
12,5	0,72	0,002	0,29	0,71	0,006	0,85
0,35	0,06	0,001	1,87	0,06	0,002	2,63

Methodenpräzision

Die aus allen Messungen ermittelte Methodenpräzision beträgt $V_K = 0,875 \%$.

Die Methode zur photometrischen Bestimmung von β -Carotin erweist sich in einem Konzentrationsbereich zwischen 12,5 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ als präzise.

Für die Referenzsubstanz der Messungen, das β -Carotin, besteht in einem Bereich zwischen 0,35 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten und dem Messsignal. In Konzentrationen $> 50 \mu\text{g/ml}$ waren die Messungen nicht mehr durchzuführen, da ab dieser Konzentration die Leistungsgrenze des Photometers erreicht wird. Die Methode ist in einem Konzentrationsbereich zwischen 12,5 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ präzise, die Proben konnten durch Verdünnung an den benötigten Messbereich angepasst werden.

4.3.4 Messungen der Carotinoide in Möhren – Ergebnisse

Nach der erfolgten Überprüfung der Methoden zur Messung von Carotinoiden in Möhren sollten nun codierte Möhrenproben auf Unterschiede im Carotinoidgehalt untersucht und einzelne Komponenten aus der Klasse der Carotinoide quantitativ erfasst werden.

Als darauf folgender Schritt wurde überprüft, ob sich der Gehalt der Carotinoide für eine Klassifizierung und eine Einteilung in Gruppen eignet.

Untersucht wurden Möhrenproben aus einem Anbauversuch der Universität Kassel (UniK-Möhren) mit unterschiedlicher N-Düngung und Möhren-Erzeugerproben. Die Erzeugerproben bestanden aus Betriebspaaren mit Möhren aus konventionellem und biologischem Anbau. Daneben bestanden zwischen den Paaren Unterschiede hinsichtlich der Sorten und der Standorte. Für Möhren aus einem Betriebspaar wurden nach der Art der Zusammenstellung der Paare ähnliche Standortbedingungen angenommen. Die Messungen wurden innerhalb des Projekts BÖL 02OE170/F durchgeführt, eine Decodierung der Proben erfolgte erst nach Vorlage der Ergebnisse.

Die HPLC-Untersuchungen ergeben ein viergipfliges Chromatogramm (vergl. Abbildung 4-32), in welchem der Peak Nr. 2 dem Substanzpeak des internen Standards β -apo-8-Carotenal entspricht. Die Peaks Nr. 1, Nr. 3 und Nr. 4 wurden als die Substanzpeaks von Lutein, α -Carotin und β -Carotin identifiziert. Diese Stoffe können in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden.

Anhand von Kalibriergeraden für die Standardlösungen der jeweiligen Substanzen wurde der Gehalt der Carotinoide in Möhren quantifiziert. Die durch die lineare Regression erhaltenen Werte dienten zur Berechnung des Gehaltes der jeweiligen Analyten in den Proben. Für die Quantifizierung wurde die folgende Formel verwendet:

$$\mu\text{g/g} = \frac{b \cdot 6}{2,5}$$

- b = Durch lineare Regression erhaltener Wert in $\mu\text{g/ml}$ für den jeweiligen Inhaltsstoff
 6 = Volumen des Gesamtextraktes (ml)
 2,5 = Extrahierte Probe (g)

Der mittels photometrischer Messungen gemessene Gesamtcarotinoidgehalt wurde mit einer Kalibriergeraden für β -Carotin als $\mu\text{g } \beta$ -Carotin/g quantifiziert. Für die Berechnung der Carotinoide als β -Carotin wurde die folgende Formel verwendet:

$$\mu\text{g } \beta\text{-Carotin/ml} = \frac{(b \cdot 6) \cdot 10}{2}$$

- b = durch lineare Regression erhaltener Wert in $\mu\text{g/ml}$
 6 = Volumen des Gesamtextraktes (ml)
 2 = extrahierte Proben (ml)
 10 = Anpassung an die Verdünnung der Proben für die Messungen

Auffallend in den Ergebnissen der photometrischen Messung des Gesamtcarotinoidgehaltes ist die geringe Übereinstimmung der Werte mit den Werten für die Messungen mittels HPLC-Analytik. Während bei den UniK-Möhren zwischen den photometrisch ermittelten Werten und den Messungen mittels HPLC-Analytik ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,84$ berechnet werden kann, beträgt der Korrelationskoeffizient bei den Möhren-Erzeugerproben nur $r = 0,44$. In allen Erzeuger-Proben mit Ausnahme den Probe O 1 wurden mittels der photometrischen Messungen Carotinoidgehalte bestimmt, die über den aus den HPLC-Daten berechneten Ergebnissen liegen.

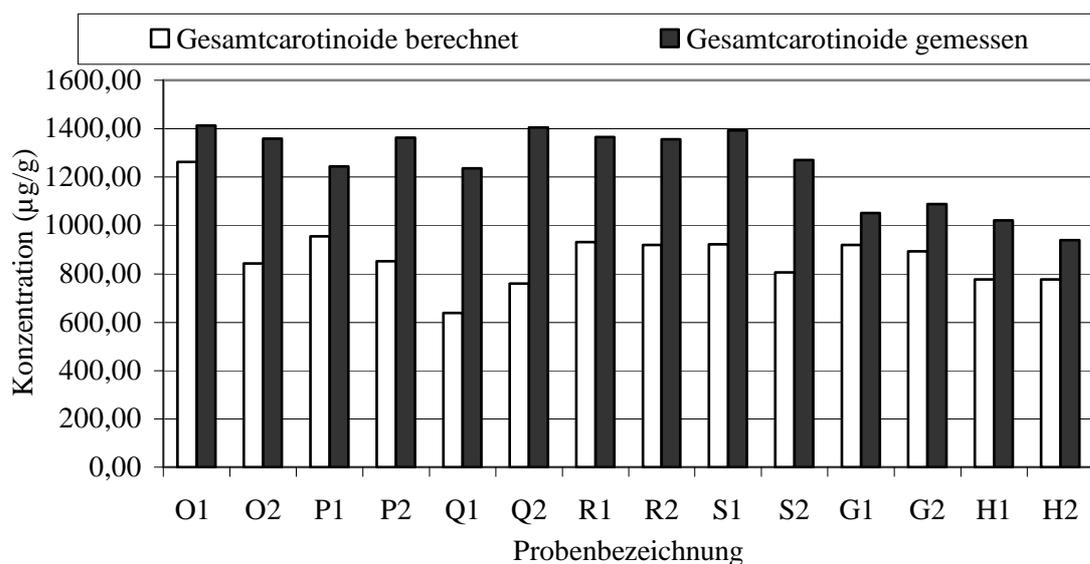
Tabelle 4-35: Carotinoidgehalte in Möhren. Aufgeführt sind die Mittelwerte einer 5-fachen Probenwiederholung

Code	Probenvariante	Lutein µg/g TM	α-Carotin µg/g TM	β-Carotin µg/g TM	Gesamtcarotinoide µg β-Carotin /g TM
G 1	'Rodelika' (N-)	30,19	276,53	612,19	1050,24
G 2	'Rodelika' (N+)	32,87	267,31	592,60	1088,30
H 1	'Rothild' (N-)	23,49	241,65	512,34	1020,47
H 2	'Rothild' (N+)	25,20	244,57	508,21	939,96
O 1	'Narbonne', öko	25,67	354,86	881,64	1413,91
O 2	'Narbonne', konventionell	27,62	254,08	561,18	1358,18
P 1	'Nerac', konventionell	28,80	274,45	651,89	1244,82
P 2	'Nerac', öko	27,10	249,16	574,30	1362,09
Q 1	'Nerac', konventionell	17,79	187,01	434,86	1236,40
Q 2	'Nerac', öko	25,60	234,77	499,36	1405,26
R 1	'Nerac', öko	24,74	279,12	627,21	1366,84
R 2	'Nerac', konventionell	25,60	267,29	626,72	1357,00
S 1	'Narbonne', konventionell	26,74	283,22	611,13	1394,70
S 2	'Narbonne', öko	24,71	243,00	537,64	1271,38

In den UniK-Möhren liegt der berechnete Wert in allen Proben über dem photometrisch gemessenen Wert. Der prozentuale Anteil des berechneten Carotinoidgehaltes am gemessenen Gesamtcarotinoidgehalt in den Möhren beträgt zwischen 63,32 % - 88,23 %. Das Verhältnis des berechneten und des gemessenen Gesamtcarotinoidgehaltes ist in der Abbildung 4-44 dargestellt.

Bei Carotinoid-Lösungen, die verschiedene Carotinoide in unbekannter Konzentration enthalten, kann die photometrische Bestimmung mangels adäquater Absorptionskoeffizienten grundsätzlich nicht genau erfolgen. Eine photometrische Bestimmung und Berechnung unter Verwendung der Absorptionskoeffizienten von β-Carotin stellt nur eine Schätzung der Gesamtkonzentration an Carotinoiden einer Lösung dar. Der Messwert ist dabei auch von der Zusammensetzung der Carotinoidfraktion mit Substanzen unterschiedlicher UV-Maxima abhängig. Unter diesem Gesichtspunkt wurden die Messergebnisse hinsichtlich der Eignung zur Differenzierung und Klassifizierung ausgewertet. Das Auftreten weiterer gelber Substanzen - wie Flavonoiden - in den Lösungen ist unwahrscheinlich, da solche Substanzen Licht einer Wellenlänge von 450 nm absorbieren

müssten. Darüber hinaus sind solche Substanzen mit der durchgeführten Extraktion nicht zu erfassen.



G1 = 'Rodelika' (N-)	G2 = 'Rodelika' (N+)	H1 = 'Rothild' (N-)
H2 = 'Rothild' (N+)	O1 = 'Narbonne', Öko	O2 = 'Narbonne', konventionell
P1 = 'Nerac', konventionell	P2 = 'Nerac', Öko	Q1 = 'Nerac', konventionell
Q2 = 'Nerac', Öko	R1 = 'Nerac', Öko	R2 = 'Nerac', konventionell
S1 = 'Narbonne', konventionell	S2 = 'Narbonne', Öko	

Abbildung 4-44: Ergebnisse der photometrischen Messung des Gesamtcarotinoidgehaltes und der Summe der Carotinoide aus den Messungen mittels HPLC-Analytik im Vergleich. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte einer 5-fachen Probenwiederholung.

4.3.5 Differenzierung und Klassifizierung

Zur Differenzierung der Proben wurde mit den Messergebnissen für die einzelnen Inhaltsstoffe eine Auswertung mittels ANOVA LME/pairwise test durchgeführt. Tabellen der t-Werte und der p-Werte finden sich im Anhang.

Zur Gruppenbildung und Klassifizierung der Proben wurde das CART-Verfahren eingesetzt.

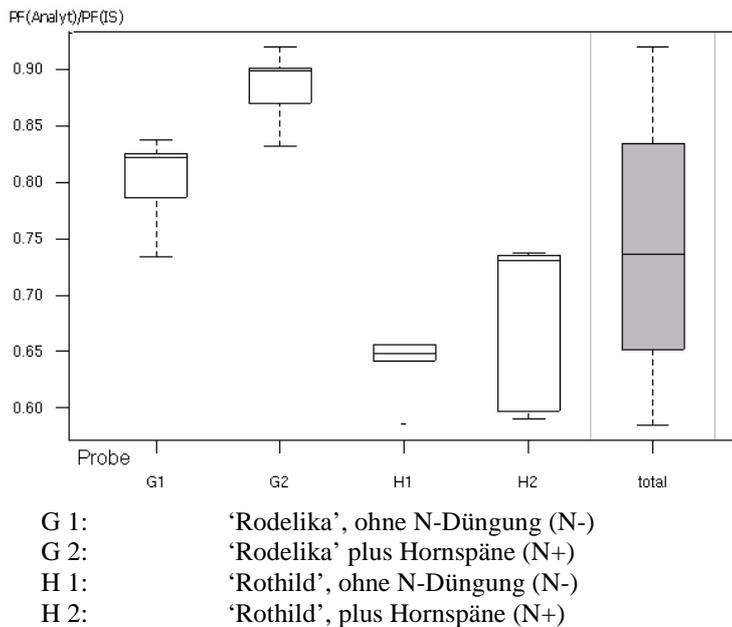
Differenzierung von Möhren mit unterschiedlicher Düngung (UniK-Möhren)Lutein:

Abbildung 4-45: Boxplot der Messergebnisse des Luteingehaltes (PF(Analyt)/PF(IS)) in UniK-Möhren.

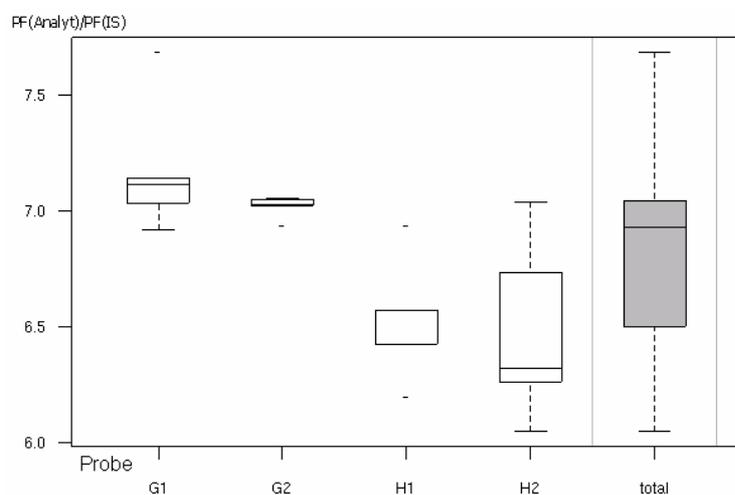
Eine Differenzierung der Proben durch den Luteingehalt zeigt das folgende Ergebnis:

	'Rodelika' (N+)	'Rothild' (N-)	'Rothild' (N+)
'Rodelika' (N-)	-	***	*
'Rodelika' (N+)		***	**
'Rothild' (N-)			-

***= $p < 0,001$, **= $p < 0,01$, *= $p < 0,05$

Eine Differenzierung der Düngungsvarianten in den Sorten 'Rodelika' und 'Rothild' ist nicht möglich.

Eine Differenzierung nach der Sorte ist in allen Proben möglich.

α -Carotin:

- G 1: 'Rodelika', ohne N-Düngung (N-)
 G 2: 'Rodelika' plus Hornspäne (N+)
 H 1: 'Rothild', ohne N-Düngung (N-)
 H 2: 'Rothild', plus Hornspäne (N+)

Abbildung 4-46: Boxplot der Messergebnisse des α -Carotingehaltes ($PF(Analyt)/PF(IS)$) in UniK-Möhren.

Eine Differenzierung der Proben durch den α -Carotingehalt zeigt das folgende Ergebnis:

	'Rodelika' (N+)	'Rothild' (N-)	'Rothild' (N+)
'Rodelika' (N-)	-	***	*
'Rodelika' (N+)		***	**
'Rothild' (N-)			-

***= $p < 0,001$, **= $p < 0,01$, *= $p < 0,05$

Eine Trennung der Düngungsvarianten in den Sorten 'Rodelika' und 'Rothild' ist nicht möglich.

Eine signifikante Trennung nach Sorten ist in allen Proben möglich.

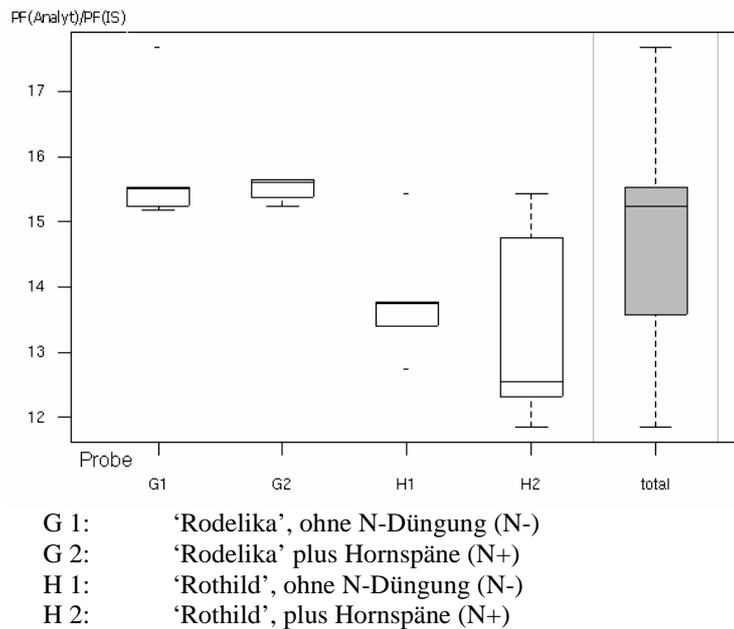
β -Carotin:

Abbildung 4-47: Boxplot der Messergebnisse des β -Carotingehaltes (PF(Analyt)/PF(IS)) in UniK-Möhren.

Eine Differenzierung der Proben durch den β -Carotingehalt zeigt das folgende Bild:

	'Rodelika' (N+)	'Rothild' (N-)	'Rothild' (N+)
'Rodelika' (N-)	-	*	*
'Rodelika' (N+)		*	*
'Rothild' (N-)			-

***= $p < 0,001$, **= $p < 0,01$, *= $p < 0,05$

Eine Trennung der Düngungsvarianten ist in beiden Sorten nicht möglich.

Eine signifikante Trennung nach Sorten ist in allen Proben möglich.

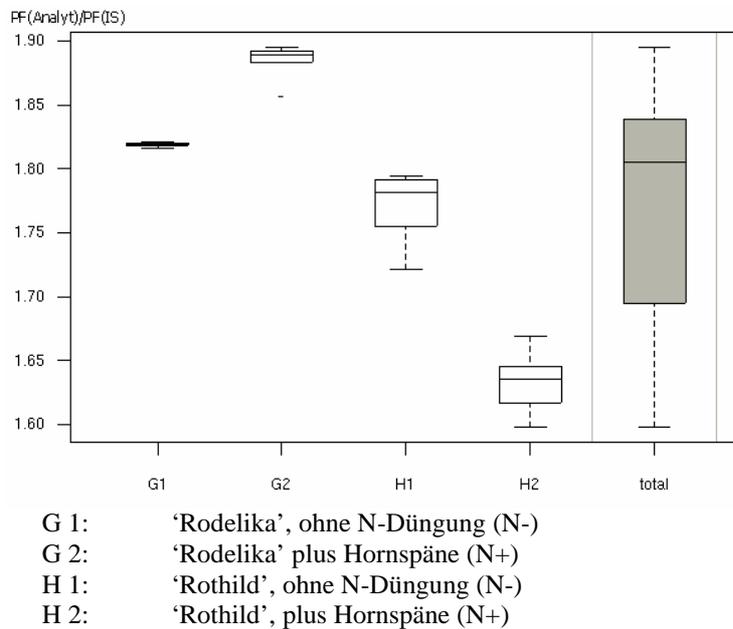
Gesamtcarotinoidgehalt:

Abbildung 4-48: Boxplot der Messergebnisse des Gesamtcarotinoidgehaltes ($PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$) in U-niK-Möhren.

Eine Differenzierung der Proben durch den Gesamtcarotinoidgehalt ergibt das folgende Ergebnis:

	'Rodelika', (N+)	'Rothild' (N-)	'Rothild' (N+)
'Rodelika' (N-)	**	-	***
'Rodelika' (N+)		***	***
'Rothild' (N-)			***

***= $p < 0,001$, **= $p < 0,01$, *= $p < 0,05$

Die Proben 'Rodelika' und 'Rothild' können nach Düngungsvarianten signifikant voneinander getrennt werden.

Die ungedüngten Varianten jeder Sorte können nicht differenziert werden.

Die Varianten mit N-Düngung beider Sorten können differenziert werden.

Insgesamt können in den Möhren mit unterschiedlicher N-Düngung signifikante Unterschiede ermittelt werden. Die Trennung durch die Carotinoide Lutein, α -Carotin und β -Carotin verläuft gleichsinnig. Eine Trennung durch diese Substanzen kann lediglich nach den unterschiedlichen Sorten erfolgen.

Durch den Gehalt der Gesamtcarotinoide lassen sich die Proben nach dem Anbausystem trennen, eine Differenzierung nach Sorten ist nicht durchgängig möglich.

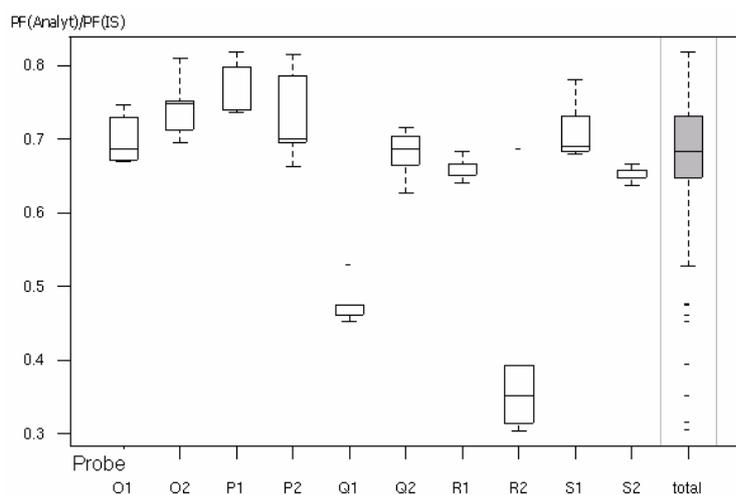
Gruppierung von Möhren mit unterschiedlicher Düngung (UniK-Möhren)

Durch die Gruppierung der decodierten Möhrenproben mit unterschiedlicher N-Düngung mit dem CART-Verfahren, werden in einem ersten Split zwei Untergruppen gebildet. Die Unterscheidung richtet sich dabei nach der Sorte. Die Untergruppe der Sorte 'Rodelika' wird nicht weiter getrennt, die beiden Anbauvarianten bilden eine gemeinsame Gruppe. In einem zweiten Split wird die Untergruppe der Sorte 'Rothild' präzise nach der Anbauvariante in zwei weitere Untergruppen getrennt. Eine Trennung nach dem Anbausystem kann somit zumindest für eine Sorte erfolgreich durchgeführt werden. Der Carotinoidgehalt scheint damit dennoch kein ausreichendes Merkmal für eine Klassifizierung entsprechend der N-Düngung zu sein, zumal auch die Probenzahl recht gering erscheint.

Eine ähnliche Gruppierung wird durch die Auswertung des Gesamtcarotinoidgehaltes ermittelt. Auch in diesem Fall kann die Gesamtheit der Proben in einem ersten Split nach Sorten in zwei Untergruppen unterteilt werden. In einer weiteren Trennung der jeweiligen Untergruppen werden die Anbauvarianten von einander getrennt. Auch anhand dieses Parameters ist eine Klassifizierung in Gruppen mit Bezug auf die N-Düngung nicht möglich.

Differenzierung von Möhren-Erzeugerproben

Lutein:



O1 = 'Narbonne', öko

O2 = 'Narbonne', konventionell

P1 = 'Nerac', konventionell

P2 = 'Nerac', öko

Q1 = 'Nerac', konventionell

Q2 = 'Nerac', öko

R1 = 'Nerac', öko

R2 = 'Nerac', konventionell

S1 = 'Narbonne', konventionell

S2 = 'Narbonne', öko

Abbildung 4-49: Boxplot der Messergebnisse des Luteingehaltes ($PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$) in Möhren-Erzeugerproben.

Eine Differenzierung der Proben durch den Luteingehalt ergibt das folgende Ergebnis:

	O 2	P 1	P 2	Q 1	Q 2	R 1	R 2	S 1	S 2
O 1	-	*	-	***	-	-	-	-	-
O 2		-	-	-	*	-	-	-	-
P 1			-	***	**	**	-	-	**
P 2				***	-	-	-	-	-
Q 1					***	***	-	***	***
Q 2						-	-	-	-
R 1							*	-	-
R 2								-	*
S 1									-

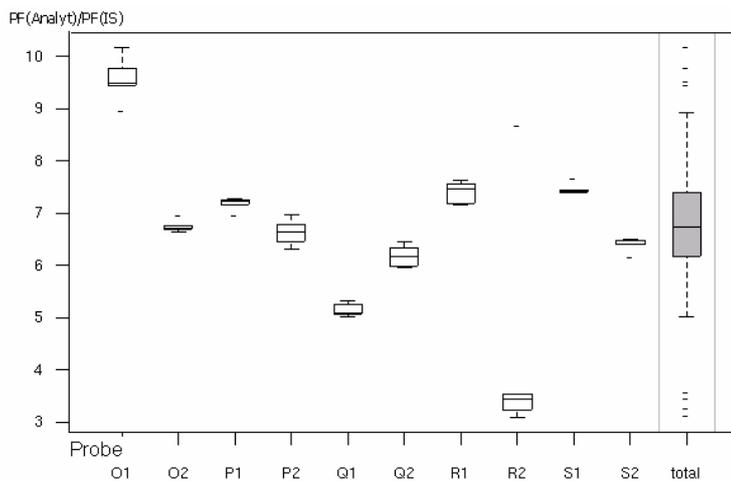
***= $p < 0,001$, **= $p < 0,01$, *= $p < 0,05$

Eine Trennung innerhalb der Betriebspaare nach dem Anbausystem ist für die Proben Q ('Nerac') und R ('Nerac') möglich, alle anderen Betriebspaare können nicht nach den Anbauvarianten getrennt werden.

Eine Trennung der Sorten ‘Nerac’ (P, Q, R) und ‘Narbonne’ (Q, S) kann in einzelnen Proben erfolgen, eine durchgängige Trennung ist nicht möglich.

Eine Differenzierung innerhalb der Sorten kann in einzelnen Proben erfolgen, eine durchgängige Trennung in allen Proben ist nicht möglich

α-Carotin:



O1 = ‘Narbonne’, öko Q1 = ‘Nerac’, konventionell S1 = ‘Narbonne’, konventionell
 O2 = ‘Narbonne’, konventionell Q2 = ‘Nerac’, öko S2 = ‘Narbonne’, öko
 P1 = ‘Nerac’, konventionell R1 = ‘Nerac’, öko
 P2 = ‘Nerac’, öko R2 = ‘Nerac’, konventionell

Abbildung 4-50: Boxplot der Messergebnisse des α-Carotiningehaltes (PF(Analyt)/PF(IS)) in Möhren-Erzeugerproben.

Eine Differenzierung der Proben durch den α-Carotiningehalt zeigt das folgende Bild:

	O 2	P 1	P 2	Q 1	Q 2	R 1	R 2	S 1	S 2
O 1	***	***	***	***	***	***	**	***	***
O 2		-	-	***	**	-	-	-	-
P 1			-	***	***	-	-	-	-
P 2				***	-	**	-	-	-
Q 1					-	***	-	***	***
Q 2						***	-	***	-
R 1							-	-	***
R 2								-	-
S 1									***

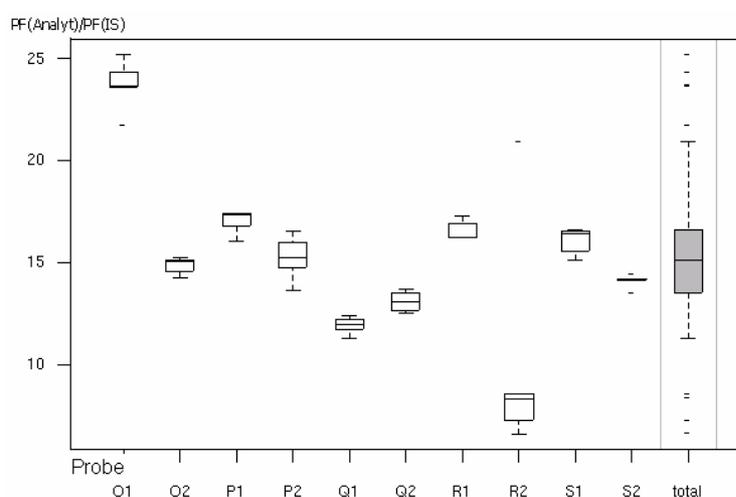
***= p < 0,001, **=p < 0,01, *=p < 0,05

Die Betriebspaare O und S können voneinander getrennt werden.

Eine Trennung der Sorten 'Nerac' (P, Q, R) und 'Narbonne' (O, S) kann in einzelnen Proben erfolgen, eine durchgängige Trennung ist nicht möglich.

Eine Differenzierung innerhalb der Sorten kann in einzelnen Proben erfolgen, eine durchgängige Trennung in allen Proben ist nicht möglich.

β -Carotingehalt:



O1 = 'Narbonne', öko

O2 = 'Narbonne', konventionell

P1 = 'Nerac', konventionell

P2 = 'Nerac', öko

Q1 = 'Nerac', konventionell

Q2 = 'Nerac', öko

R1 = 'Nerac', öko

R2 = 'Nerac', konventionell

S1 = 'Narbonne', konventionell

S2 = 'Narbonne', öko

Abbildung 4-51: Boxplot des β -Carotingehaltes (PF(Analyt)/PF(IS)) in Möhren-Erzeugerproben.

Eine Differenzierung der Proben durch den β -Carotingehalt zeigt das folgende Bild:

	O 2	P 1	P 2	Q 1	Q 2	R 1	R 2	S 1	S 2
O 1	***	***	***	***	***	***	**	***	***
O 2		***	-	***	***	-	-	-	-
P 1			*	***	***	-	-	-	***
P 2				**	*	-	-	-	-
Q 1					**	***	-	***	***
Q 2						***	-	***	-
R 1							-	-	***
R 2								-	-
S 1									**

***= p < 0,001, **=p < 0,01, *=p < 0,05

Die Proben der Betriebspaare O, P, Q, S können auf der Ebene des Anbausystems unterschieden werden.

Eine Trennung der Sorten 'Nerac' (P, Q, R) und 'Narbonne' (O, S) kann in einzelnen Proben erfolgen, eine durchgängige Trennung ist nicht möglich.

Eine Differenzierung innerhalb der Sorten kann in einzelnen Proben erfolgen, eine durchgängige Trennung in allen Proben ist nicht möglich.

Insgesamt können anhand des Gehaltes der Carotinoide in den Möhren signifikante Unterschiede ermittelt werden, die Unterscheidung richtet sich sowohl nach der Sorte als auch nach dem Anbausystem. Im Gegensatz zu den Möhren mit unterschiedlicher Düngung zeigen die einzelnen Substanzen ein unterschiedliches Trennverhalten.

Gesamtcarotinoidgehalt:

Eine Differenzierung der Proben durch den Gesamtcarotinoidgehalt zeigt das folgende Ergebnis:

	O 2	P 1	P 2	Q 1	Q 2	R 1	R 2	S 1	S 2
O 1	-	***	**	***	-	**	**	-	***
O 2		-	-	-	-	-	-	-	-
P 1			***	-	***	***	***	***	-
P 2				***	-	-	-	-	***
Q 1					***	***	***	***	-
Q 2						-	**	-	***
R 1							-	-	***
R 2								-	***
S 1									***

***= p < 0,001, **=p < 0,01, *=p < 0,05

O1 = 'Narbonne', öko

O2 = 'Narbonne', konventionell

P1 = 'Nerac', konventionell

P2 = 'Nerac', öko

Q1 = 'Nerac', konventionell

Q2 = 'Nerac', öko

R1 = 'Nerac', öko

R2 = 'Nerac', konventionell

S1 = 'Narbonne', konventionell

S2 = 'Narbonne', öko

Eine Trennung innerhalb der Betriebspaare nach dem Anbausystem ist in den Betriebspaaren O ('Narbonne') und R ('Nerac') nicht möglich.

Die Betriebspaare P ('Nerac'), S ('Narbonne') und Q ('Nerac') können voneinander getrennt werden.

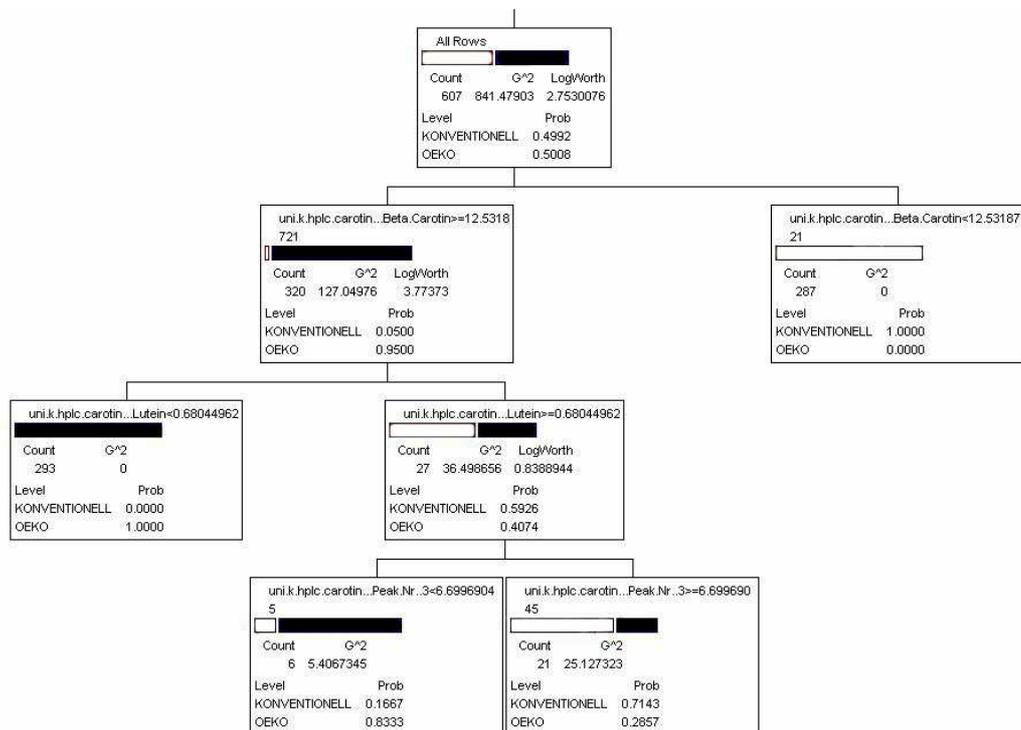
Eine Trennung der Sorten 'Nerac' (P, Q, R) und 'Narbonne' (O, S) kann in einzelnen Proben erfolgen, eine durchgängige Trennung ist nicht möglich.

Eine Differenzierung innerhalb der Sorten kann in einzelnen Proben erfolgen, eine durchgängige Trennung in allen Proben ist nicht möglich

Klassifizierung von Möhren-Erzeugerproben

Die Klassifizierung der decodierten Proben wurde unter der Fragestellung nach der Unterscheidung von konventionell und ökologisch erzeugten Probenvarianten mittels CART-Verfahren durchgeführt.

Die Unterteilung führt in einem ersten Split zu einer richtigen Abtrennung der Mehrheit der konventionell erzeugten Proben in eine eigene Untergruppe. Der Trennungsschritt wird auf der Basis des β -Carotingehaltes vollzogen. Die zweite Gruppe kann in zwei weiteren Splits auf der Grundlage des Lutein- und des α -Carotingehaltes in eine rein ökologische und drei gemischte Gruppen unterteilt werden. Insgesamt kann eine Großteil der Proben (95,5 %) korrekt klassifiziert werden. Ein ähnliches Bild wird mit der Auswertung auf der Basis des Gesamtcarotinoidgehaltes erreicht.



	R Square	N	N-splits	Imputes
Included	0.964	607	3	836
excluded		0		

Abbildung 4-52: Klassifizierung aller Möhren-Erzeugerproben auf der Grundlage des Gehaltes einzelner Carotinoide. Bildung von Gruppen mit CART. (helle Balken = konventionelle Proben, dunkle Balken = ökologische Proben).

Eine Klassifizierung auf der Probenebene ergibt in zwei Splits die Bildung von vier Untergruppen, wobei sich die Zugehörigkeit zu den jeweiligen Gruppen weder nach den Sorten noch nach den Anbauvarianten richtet. Die Trennungen erfolgen im Gegensatz zur Klassifizierung nach Anbausystemen im ersten Schritt auf der Grundlage des α -Carotingehaltes und erst im zweiten Schritt auf der Grundlage des β -Carotingehaltes. Eine Klassifizierung ist auf dieser Grundlage nicht möglich.

Eine Auswertung auf der Probenebene mittels des Gesamtcarotinidgehaltes ergibt ein ähnliches Bild, die Bildung von Untergruppen erfolgt unabhängig von den unterschiedlichen Sorten oder Anbauvarianten.

4.4 Messungen der phenolischen Bestandteile in Möhren

Für die vorliegende Arbeit wurde der Polyphenolgehalt von Möhren in den Jahren 2002, 2003 und 2004 gemessen und die Eignung dieses Parameters für die Differenzierung und Klassifizierung der Proben überprüft. Die Messungen des Polyphenolgehaltes wurden im Jahr 2002 am Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW) und in den Jahren 2003 und 2004 an der Universität Kassel/Witzenhausen durchgeführt. Alle Proben wurden in 5-facher Probenwiederholung aufbereitet und gemessen. Bei den untersuchten Möhrenproben handelt es sich um Möhren aus unterschiedlichen Anbauversuchen (UniK-Möhren, FiBL-Möhren) und um Möhren-Erzeugerproben.

Die Ergebnisse der Messungen unterscheiden sich in allen Messreihen eines Jahres hinsichtlich der detektierten Peaks. Die Nummerierungen der Peaks beziehen sich mit Ausnahme der identifizierten Peaks auf die Retentionszeiten. Für die Messungen 2002 und 2003 wurde die Nummerierung einer Auswahl von Peaks, die gemäß den Retentionszeiten in allen Proben auftraten, bereits im Abschlussbericht des Projektes BÖL 02OE170 (KAHL ET AL., 2003) niedergelegt und daher beibehalten. Für die Messungen in den Jahren 2004 wurde durch das Auftreten weiterer unbekannter Peaks eine veränderte Nummerierung notwendig. Für die Darstellung in dieser Arbeit wurden die gemessenen Peaks der jeweiligen Jahre mit einem Index für das Jahr der Messung versehen (2002, 2003= a, 2004 = b).

4.4.1 Identifizierung der phenolischen Bestandteile in Möhren

Die Identifizierung einzelner Komponenten wurde während der Messungen in den Jahren 2003 und 2004 durchgeführt. Die praktische Durchführung der Identifizierung wurde wie im Abschnitt 3.3.3.3 beschrieben vorgenommen.

Durch den Vergleich der Retentionszeiten und der UV-Spektren mit Standardlösungen wurde der Peak 4a (Rt.: 35,49 min) als p-Hydroxybenzoesäure identifiziert. Die Peaks Nr. 5a und Nr. 6a entsprechen nach dem UV-Spektrum und der Retentionszeit einer

Chlorogensäure-Standardlösung. Diese Peaks werden im weiteren Verlauf als Chlorogensäure zusammengefasst.

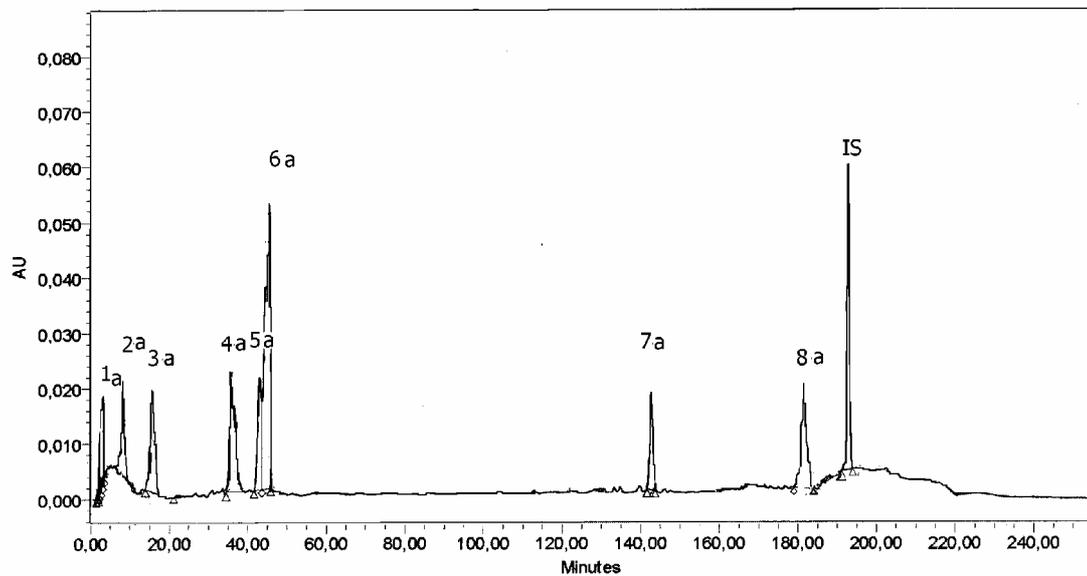


Abbildung 4-53: Chromatogramm einer Möhrenprobe (FiBL-Möhren) der Sorte 'Samson' der Messungen 2003 (IS = Interner Standard). Peak Nr 4a = *p*-Hydroxybenzoesäure, Peak Nr. 5a & Nr. 6a = Chlorogensäure.

Das Ergebnis der Messungen des Polyphenolgehaltes in methanolischen Möhrenextrakten im Jahr 2004 ergibt für die Möhren-Erzeugerproben und UniK-Möhren ein unterschiedliches Bild hinsichtlich der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung. Die Nummerierung der Peaks in den Chromatogrammen der UniK-Möhren (2004) und der Erzeugerproben wurde zugunsten der Vergleichbarkeit einander angepasst.

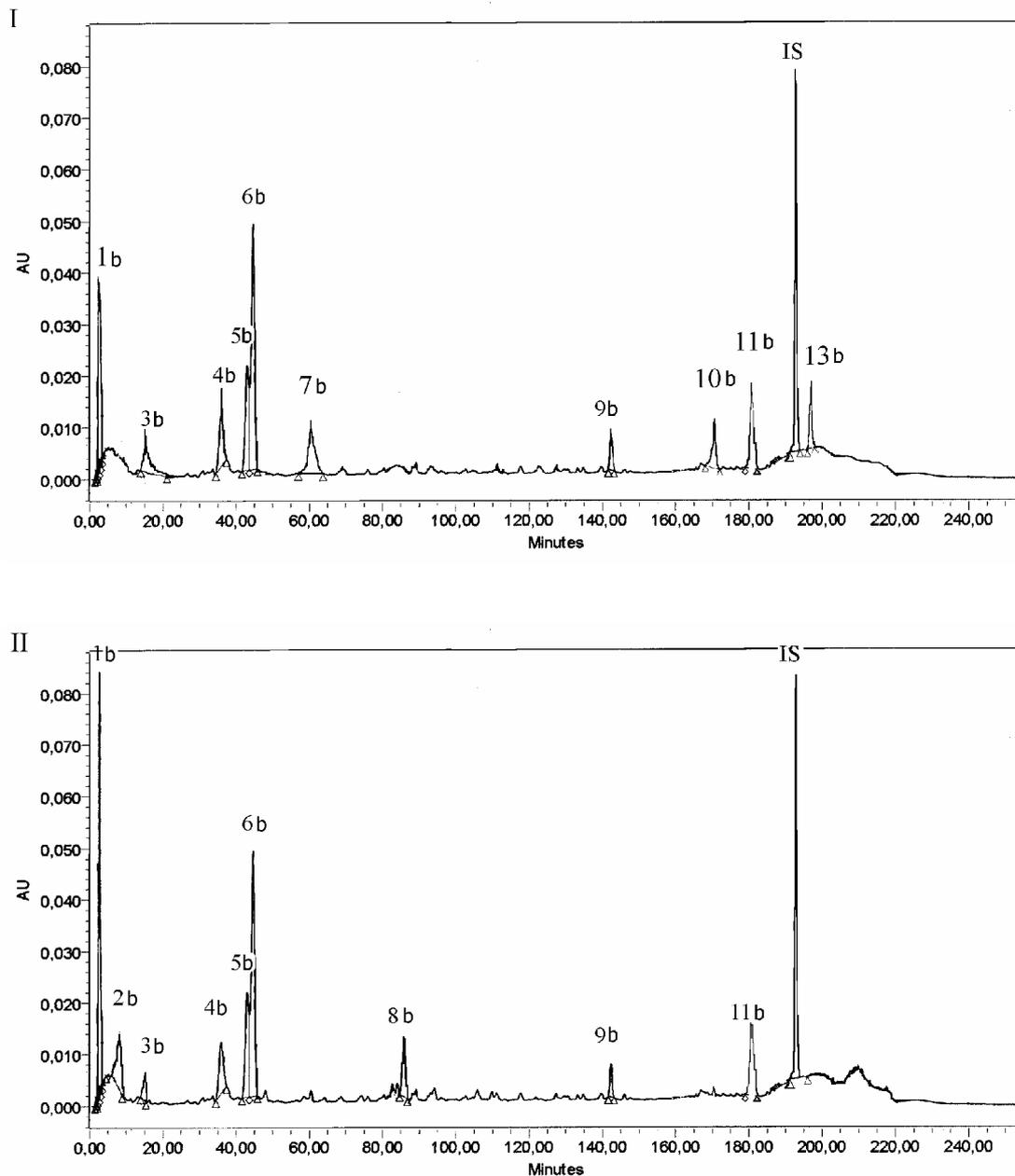


Abbildung 4-54: Darstellung der Chromatogramme methanolischer Möhrenextrakte aus dem Jahr 2004 (I = UniK-Möhren, II = Marktproben). Die Nummerierung der Peaks erfolgt für alle Proben gleichermaßen. Die Peaks Nr. 7b (Rt.: 60,54 min) und 13b (Rt.: 201,42 min) waren nur in den UniK-Möhren, die Peaks Nr. 2b (Rt.: 8,58 min) und Nr. 8b (Rt.: 85,05 min) nur in den Möhren-Marktproben darstellbar. Peak Nr. 4b = *p*-Hydroxybenzoesäure (Rt.: 35,403min), Peak Nr. 5b + 6b = Chlorogensäure (Rt.: 44,53 min, 45,26 min), Peak Nr. 9b (Rt.: 142,24 min) = nicht identifiziertes Chlorogensäurederivat.

Innerhalb der Möhren-Erzeugerproben und der UniK-Möhren konnten jeweils die gleichen Peaks detektiert werden. Unterschiede ergeben sich jedoch zwischen diesen verschiedenen Versuchen. So konnten die Peaks Nr. 7b (Rt.: 60,54 min) und Nr. 13b (Rt.: 201,42 min) nur in den UniK-Möhren, die Peaks Nr. 2b (Rt.: 8,58 min) und Nr. 8b (Rt.: 85,05 min) dagegen nur in den Marktproben nachgewiesen werden. Eine Identifizierung dieser Substanzen konnte aufgrund fehlender Referenzstandards nicht erfolgen. Die Identifizierung der Peaks Nr. 4b, Nr. 5b und Nr. 6b wurde durch den Vergleich der UV-Spektren und den Retentionszeitenvergleich zwischen den Peaks der Realproben und den jeweiligen Standardlösungen vorgenommen und mit Dünnschichtchromatographie bestätigt. Danach kann der Peak Nr. 4b als p-Hydroxybenzoesäure identifiziert werden. Der Peak Nr. 5b und der Peak Nr. 6b entsprechen im UV-Spektrum den Absorptionsmaxima einer methanolischen Chlorogensäure-Standardlösung. Zur Berechnung wurden daher beide Peaks als Chlorogensäure zusammengefasst. Daneben konnte in allen Proben ein nicht weiter identifiziertes Chlorogensäurederivat (Peak Nr. 9b, Rt.: 142,93 min) gemessen werden. Mittels Kalibriergeraden wurde der Gehalt der identifizierten Inhaltsstoffe berechnet.

Die Hauptkomponenten aus der Klasse der Polyphenole sind in allen untersuchten Möhrenproben die phenolischen Säuren Chlorogensäure und p-Hydroxybenzoesäure.

Die Vergleiche der Retentionszeiten sowie der Vergleich der UV-Spektren dienen daneben noch zur Überprüfung der Spezifität der HPLC-Methode, die Ergebnisse der Standardaddition dienen weiterhin noch zur Bestätigung der Richtigkeit. Die Durchführung und die Ergebnisse dieser Versuche werden in den entsprechenden Kapiteln dargestellt.

4.4.2 Validierungsschritte der HPLC-Methodik für die Messungen der phenolischen Bestandteile in Möhren

4.4.2.1 Linearität

Die Linearität wurde für die als Inhaltsstoffe der untersuchten Möhren identifizierten Substanzen Hydroxybenzoesäure und Chlorogensäure mit Standardlösungen überprüft. Darüber hinaus wurde die Linearität des internen Standards 6-Methoxyflavon mit Standardlösungen überprüft. Für die nicht identifizierten Peaks beschränkte sich die Untersuchung der Linearität auf die Untersuchung der Gesamtprobe.

Linearität von 6-Methoxyflavon

Die Linearität von 6-Methoxyflavon wurde mit einer Standardverdünnungsreihe im Konzentrationsbereich zwischen 0,0125 mg/ml und 1,2 mg/ml bestimmt. Der 6-Methoxyflavon-Standard hatte eine Reinheit von > 99 % (Extra-Synthese, Aldrich).

Für die Bestimmung wurde eine Verdünnungsreihe aus 8 Konzentrationsstufen in 6-facher Probenwiederholung erstellt. Von jeder Probe wurden 15 µl mit der HPLC untersucht.

Die jeweiligen Konzentrationsintervalle sind in der Tabelle 4-36 dargestellt.

Tabelle 4-36: Linearität des internen Standards 6-Methoxyflavon, dargestellt sind die Mittelwerte einer 6-fachen Probenwiederholung

Nr.	Konzentration (mg/ml)	Peakfläche (AU*min)	s	V _K
1	0,0125	140,42	2,13	1,51
2	0,05	575,46	10,31	1,79
3	0,2	2188,85	50,79	2,32
4	0,4	4026,27	51,42	1,28
5	0,6	6065,95	68,60	1,13
6	0,8	8036,54	91,60	1,14
7	1	10278,44	193,97	1,89
8	1,2	12459,70	238,51	1,91

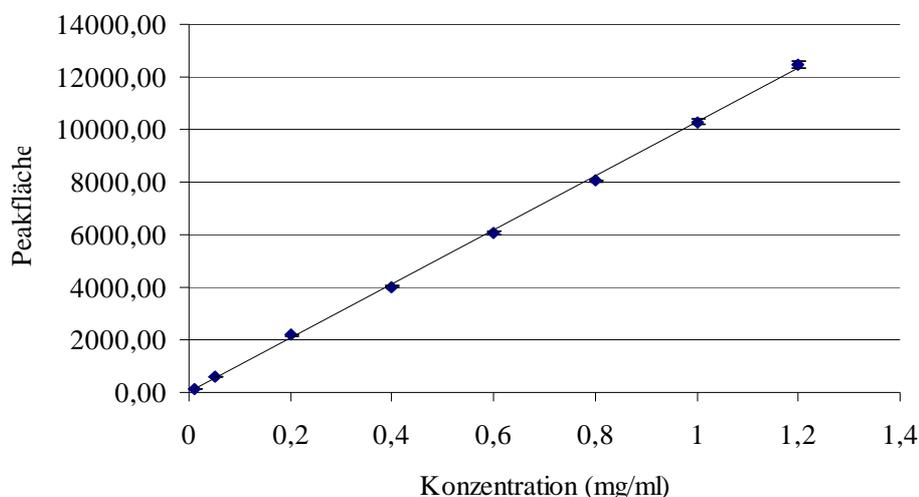


Abbildung 4-55: Linearität von 6-Methoxyflavon-Standardlösung. Dargestellt sind die Mittelwerte einer 6-fachen Probenwiederholung mit den Standardabweichungen und die errechnete Trendlinie.

Es ergibt sich eine lineare Regression mit hoher Korrelation.

Geradengleichung: $y = 10248x + 11,175$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,99$

Linearität von p-Hydroxybenzoesäure

Die Linearität wurde in einem Konzentrationsbereich von 1,57 $\mu\text{g/ml}$ und 300 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt. Die eingesetzten Standardlösungen wurden aus kristalliner Standardsubstanz mit einer Reinheit von $> 98 \%$ (Aldrich) angefertigt und in 6-facher Probenwiederholung vermessen.

Tabelle 4-37: Linearität von p-Hydroxybenzoesäure in verschiedenen Konzentrationen

Nr.	Hydroxybenzoesäure ($\mu\text{g/ml}$)	Peakfläche (AU*min/1000)	s	VK
1	1,57	42,50	0,64	1,50
2	12,5	216,67	8,63	3,99
3	50	842,90	14,24	1,69
4	100	1671,77	41,93	2,51
5	150	2514,30	31,00	1,23
6	200	3252,88	36,65	1,13
7	250	4124,00	60,33	1,46
8	300	4948,80	48,50	0,98

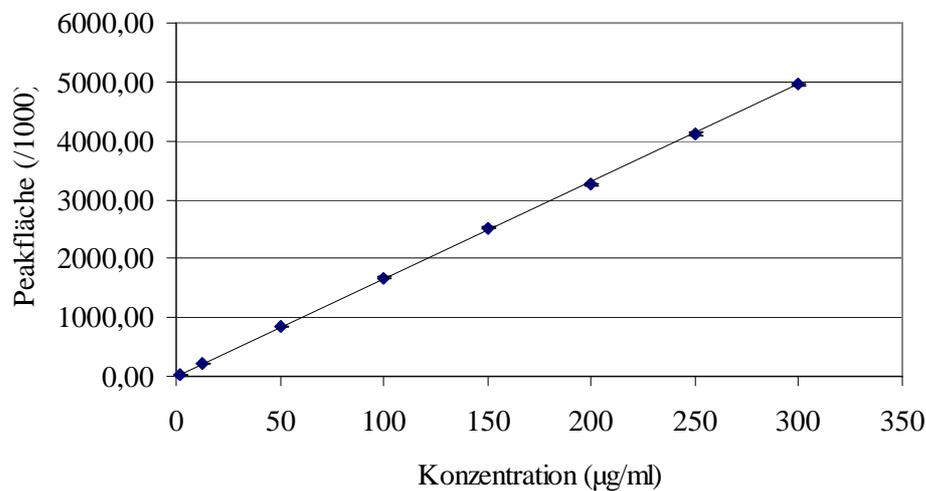


Abbildung 4-56: Linearität von *p*-Hydroxybenzoesäure-Standardlösungen in verschiedenen Konzentrationen. Abgebildet sind die Mittelwerte einer 6-fachen Probenwiederholung und die errechnete Trendlinie.

Es ergibt sich eine lineare Regression mit hoher Korrelation.

Geradengleichung: $y = 16,496x$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,998$

Linearität von Chlorogensäure

Die Linearität von Chlorogensäure wurde in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,05 mg/ml und 1,6 mg/ml bestimmt. Die eingesetzten Standardlösungen wurden aus kristalliner Standardsubstanz (Merck) mit einer Reinheit von > 98% angesetzt. Die jeweiligen Konzentrationsintervalle und die entsprechenden Messergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Zur Bestimmung der Kalibriergeraden wurden die Standardlösungen in 5-facher Probenwiederholung angefertigt und jeweils 15 µl der Lösungen mit der HPLC unter Standardbedingungen vermessen.

Tabelle 4-38: Linearität von Chlorogensäure in unterschiedlichen Konzentrationen

Nr.	Chlorogensäure (mg/ml)	Peakfläche (AU*min)	s	V _K
1	0,05	1007005	13615,20	1,35
2	0,1	1996686	39405,70	1,97
3	0,15	2924688	39857,88	1,36
4	0,2	3874186	86264,96	2,23
5	0,4	7751253	137316,07	1,77
6	0,8	15470053	354978,33	2,29
7	1,2	23188853	1235955,60	5,33
8	1,6	30907653	966171,16	3,13

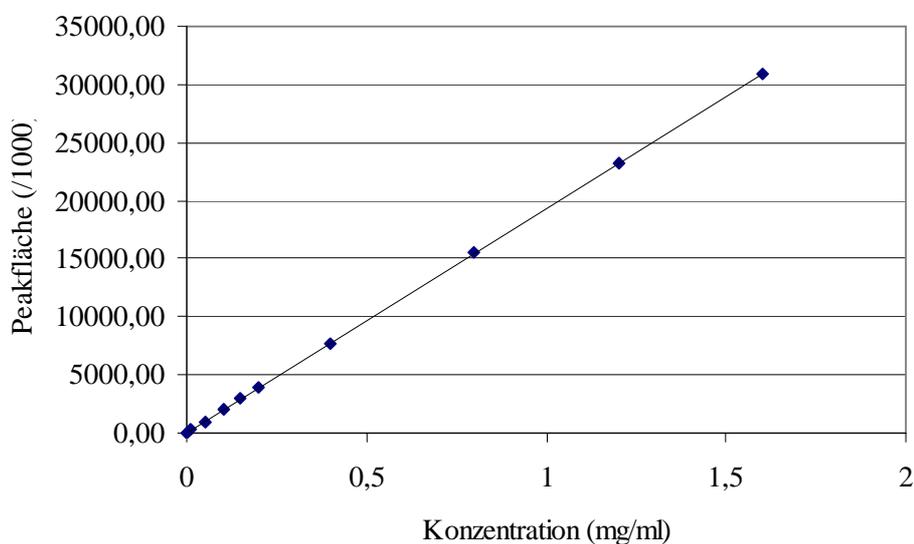


Abbildung 4-57: Linearität von Chlorogensäure-Standardlösungen in unterschiedlichen Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte einer 5-fachen Probenwiederholung und die errechnete Trendlinie.

Es ergab sich eine lineare Regression mit hoher Korrelation.

Geradengleichung: $y = 19297x + 32,487$

Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,998$

Linearität von Möhrenproben

Für die Bestimmung der Linearität der Gesamtprobe wurde in 2 Messreihen jeweils eine Möhrenprobe in mehreren Stufen bis zum 10-fachen bzw. zu einem Zehntel der Konzentration der Arbeitslösungen aufkonzentriert bzw. verdünnt und in 5-facher Probenwiederholung gemessen.

Das Bestimmtheitsmaß der einzelnen Peaks ist in der Tabelle 4-39 dargestellt. Die gemessenen Werte liegen im linearen Bereich der Datenaufnahme.

Tabelle 4-39: Linearität einzelner Peaks einer Möhrenprobe (methanolische Extraktion) in verschiedenen Verdünnungsstufen

Peak Nr.	Bestimmtheitsmaß (R^2)	Peak Nr.	Bestimmtheitsmaß (R^2)
1a	0,99	6a	0,97
2a	0,93	7a	0,94
3a	0,97	8a	0,99
4a	0,92	9a	0,95
5a	0,91		

Mit den Messungen zur Bestimmung der Linearität konnte bestätigt werden, dass für alle Peaks ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten und der Signalintensität besteht. Das Bestimmtheitsmaß der linearen Korrelationen liegt in einem Bereich von $R^2 > 0,99$. Für die Substanzen p-Hydroxybenzoesäure, Chlorogensäure und 6-Methoxyflavon kann die Linearität damit bestätigt werden.

Der überprüfte Bereich der Linearität dieser Substanzen ist wie folgt:

p-Hydroxybenzoesäure: 1,57 µg/ml - 300 µg/ml

Chlorogensäure: 0,05 mg/ml - 1,6 mg/ml

6-Methoxyflavon: 0,0125 mg/ml - 1,2 mg/ml

Durch das Verdünnen bzw. Aufkonzentrieren der Proben zur Bestimmung der Linearität der Gesamtproben wurde ein weiterer Prozessschritt eingeführt. Darüber hinaus wurden diese Messungen in der kompletten Probenmatrix durchgeführt, wodurch eine Abnahme der Präzision der Messungen zu erklären ist. Die ermittelten Korrelationen für die einzelnen Peaks scheinen unter diesen Bedingungen akzeptabel.

4.4.2.2 Präzision

Die Messungen zur Findung der Präzision wurden in die Bestimmung der Messpräzision und der Methodenpräzision unterteilt.

Für die Ermittlung der Messpräzision wurden Realproben in 5-facher Messwiederholung mit der HPLC unter Standardbedingungen untersucht.

Die Methodenpräzision wurde mit allen Realproben in jeweils 5-facher Probenwiederholung ermittelt. Die Prüfung der laborinternen Präzision (intermediate precision) wurde mit Möhren der Sorte 'Rodelika' während der Messungen in den Jahren 2003 und 2004 durchgeführt. Dafür wurden die Möhrenproben von zwei Prüfern unter Standardbedingungen in jeweils 6-facher Probenwiederholung mit allen Prozessschritten aufbereitet und mit der HPLC gemessen.

4.4.2.1 Präzision in Möhrenproben

Tabelle 4-40: Präzision in Möhrenextrakten (2002, 2003)

	Messpräzision (V _K)	Methodenpräzision (V _K)	Intermediate precision (V _K)
Peak Nr. 1a	0,31	6,05	6,23
Peak Nr. 2a	0,29	6,04	4,23
Peak Nr. 3a	0,43	3,30	5,09
Peak Nr. 4a	0,48	4,83	4,89
Peak Nr. 5a	0,34	3,09	4,06
Peak Nr. 6a	0,39	2,18	3,12
Peak Nr. 7a	0,46	5,79	8,89
Peak Nr. 8a	0,50	10,09	11,23
6-Methoxyflavon	0,39	6,04	7,51

Für Messungen mittels HPLC-Analytik liegen die Werte der akzeptierten Messpräzision in der Regel bei Werten des V_K von < 1 % (KROMIDAS, 1999). In den vorliegenden Messungen können diese Anforderungen an die Messpräzision in allen Messungen erfüllt werden.

Die Richtwerte der Methodenpräzision für den Pharmabereich liegen für Analytgehalte von 1-10 % bei einem V_K von 5 % und für Analytgehalte von < 1 % bei einem V_K von 10 % (KROMIDAS, 1999).

Tabelle 4-41: Präzision in methanolischen Möhrenextrakten (2004)

	Messpräzision (V_K)	Methodenpräzision (V_K)	Intermediate precision (V_K)
Peak Nr. 1b	0,67	8,58	7,55
Peak Nr. 2b	0,88	9,85	6,52
Peak Nr. 3b	0,54	10,07	5,49
p-Hydroxybenzoesäure	0,53	9,13	5,36
Chlorogensäure	0,77	6,97	8,95
Peak Nr. 7b	0,56	7,09	-
Peak Nr. 8b	0,70	9,60	6,95
Chlorogensäurederivat	0,41	9,01	5,47
Peak Nr. 10b	0,75	7,51	-
Peak Nr. 11b	0,40	5,01	6,30
6-Methoxyflavon	0,67	2,97	1,71
Peak Nr. 13b	0,88	3,26	7,55

Wie in den Tabellen der Präzisionen (4-40 und 4-41) dargestellt, werden die genannten Richtwerte in den methanolischen Extrakten der Jahre 2003 und 2004 für alle Analyten erreicht. Die Abnahme des V_K der intermediate precision im Vergleich zur Methodenpräzision ist vermutlich dadurch zu erklären, dass für die Ermittlung der intermediate precision lediglich eine Möhrenqualität gemessen wurde. Für die Methodenpräzision dagegen wurden die Messungen aller Möhrenproben berücksichtigt. Die Präzision ist nach diesen Kriterien gegeben.

4.4.2.3 Spezifität

Die Spezifität eines HPLC-Verfahrens mit UV-Detektion wurde durch den Vergleich der UV-Spektren des Analyt Peaks in einer Standardlösung und Realproben vorgenommen. Durch den Einsatz eines Dioden-Array-Detektors konnte die Absorption der Proben in einem festgelegten Wellenlängenbereich aufgezeichnet werden. Beim Vergleich der UV-Spektren wurden die Absorptionsmaxima und die Lage der Wendepunkte in Relation zur Retentionszeit im Chromatogramm beurteilt. In der praktischen

Durchführung wurden dafür die UV-Spektren der Standardsubstanzen Hydroxybenzoesäure und Chlorogensäure aus den Versuchen zur Ermittlung der Linearität dieser Substanzen extrahiert. Für den Vergleich mit den Analyt-Peaks aus den Realproben wurden Standardlösungen gewählt, die der Konzentration der Realproben entsprachen. Die Spektren in den Peakmaxima sowie den Wendepunkten sind bezüglich der Form und den Retentionszeiten identisch. Damit ist ein Hinweis auf die Spezifität des Verfahrens gegeben.

4.4.2.4 Wiederfindung

Um eine Aussage über die Richtigkeit treffen zu können, wurde die Wiederfindung der Inhaltsstoffe bestimmt. Da für die vorliegenden Untersuchungen kein Standardmaterial mit definiertem Inhaltsstoffgehalt zur Verfügung stand, wurde die Wiederfindung des internen Standards berechnet. Dafür wurden die Messwerte des internen Standards aus den Messungen zur Bestimmung der Messpräzision und der Methodenpräzision verwendet. Für die Bestimmung des „wahren“ Wertes für den internen Standard wurde nach jeweils 5 gemessenen Möhrenproben eine reine Standardprobe gemessen. Aus der Differenz der gefundenen Werte und des wahren Wertes wurde die Wiederfindungsrate (WF) berechnet.

Tabelle 4-42: Wiederfindungsrate des internen Standards in Möhrenproben

Wiederfindungsrate (%) des internen Standards		
Messpräzision	Methodenpräzision	Intermediate precision
99,18%	98,51 %	97,98 %

Die Messungen des internen Standards in allen ausgewerteten Untersuchungen ergeben folgende Werte:

Gemessene Peakfläche (AU*min): 2722035,63

Standardabweichung: 76716,65

Bei angenommener t-Verteilung liegt der Vertrauensbereich mit 95 % Wahrscheinlichkeit zwischen 97,79 % - 100,12 %. Die Eignung des internen Standards für die vorliegenden Untersuchungen kann damit bestätigt werden.

In weiteren Messungen wurde der Einfluss der Probenmatrix auf die Wiederfindung der Analyten mit Standardsubstanzen untersucht. Dafür wurden 3 bereits vermessene Ansätze der Möhrenproben mit einer definierten Menge einer der Standardsubstanzen Hydroxybenzoesäure bzw. Chlorogensäure versetzt und mit der HPLC gemessen und ausgewertet. Die Messergebnisse sind als Tabellen (4-43, 4-44) dargestellt.

Tabelle 4-43: Wiederfindung von p-Hydroxybenzoesäure-Standardlösungen in aufgestockten Möhrenproben

Hydroxybenzoesäure, zugesetzt (µg)	Hydroxybenzoesäure, berechnet (µg/ml)	Hydroxybenzoesäure, gemessen (µg/ml)	WF (%)
30	198,75	196,48	98,85
50	210,16	206,92	98,46
70	218,26	211,71	97,00

Tabelle 4-44: Wiederfindung von Chlorogensäure-Standardlösungen in aufgestockten Möhrenproben

Chlorogensäure, zugesetzt (µg)	Chlorogensäure, berechnet (µg/ml)	Chlorogensäure, gemessen (µg/ml)	WF (%)
50	1357,091	1331,63	98,12
100	1366,284	1339,96	98,07
150	1667,484	1627,21	97,58

Die akzeptierte Wiederfindungsrate hängt vom Gehalt des Analyten ab. Für Analytgehalte < 1 % wird ein Bereich von 95 % - 105,0 %, für Wirkstoffgehalte zwischen 1 % - 10% mit 97,0 % -103 % angegeben (KROMIDAS, 1999).

Für die vorliegenden Untersuchungen liegen die Werte für die Wiederfindung der Stoffe Chlorogensäure und Hydroxybenzoesäure vor dem Hintergrund der jeweiligen Methodenpräzision mit Variationskoeffizienten von 6,83 % und 9,13 % im akzeptablen Bereich. Die Anforderungen an die Richtigkeit werden von allen Proben erfüllt.

4.4.2.5 Stabilität der Lösungen

Zur Überprüfung der Stabilität der eingesetzten Lösungen wurde einer der untersuchten Möhrenextrakte in einem Abstand von einem Tag, einer Woche und vier Wochen zum Zeitpunkt der Extraktion untersucht. In der Zwischenzeit wurden die Extrakte gekühlt bei -18 °C aufbewahrt. Jede Probe wurde in 5-facher Wiederholung gemessen.

In allen untersuchten Extrakten kann über den Zeitraum von 4 Wochen eine Abnahme der gemessenen Signalintensität für die jeweiligen Peaks beobachtet werden. Für die Vergleichsmessungen wurden daher alle Extrakte frisch hergestellt und direkt im Anschluss vermessen.

4.4.2.6 Beurteilung von Einflussfaktoren auf das Messergebnis

Einfluss der verwendeten Chemikalien auf das Messergebnis

Zur Überprüfung der Störanfälligkeit der Methode wurde der Einfluss durch Chemikalien der gleichen Spezifikation (p.a.) desselben Herstellers (Merck) mit einer anderen Chargennummer zur Probenextraktion überprüft. Verändert wurde die verwendete Charge des Methanols während der Extraktion der Proben und als mobile Phase sowie die Charge der Ameisensäure als Bestandteil der mobilen Phase.

Eine Möhrenprobe der Sorte 'Rodelika' wurde mit diesen Chemikalien in 5-facher Probenwiederholung extrahiert und mit der HPLC unter Standardbedingungen vermessen. Die Darstellung der Messergebnisse erfolgt in der Abbildung 4-58. Als Berechnungsgrundlage diente der Peakflächenquotient $PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$.

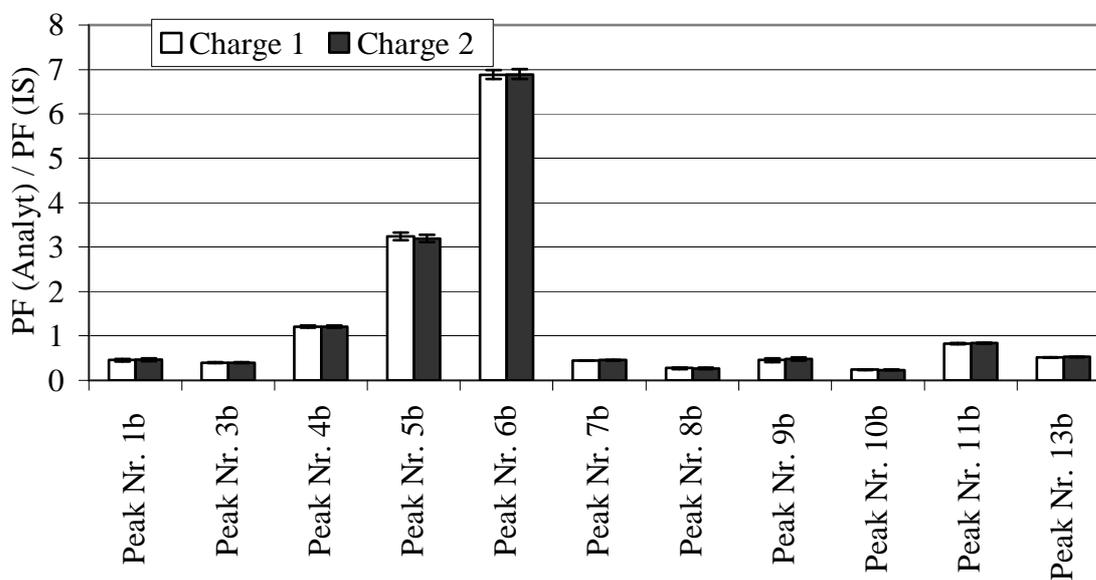


Abbildung 4-58: Messung einer Möhrenprobe (2004) nach Aufbereitung und Messung mit Chemikalien verschiedener Chargennummern. Darstellung der Mittelwerte der Messungen ($PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$) mit den jeweiligen Standardabweichungen.

Die mittleren Peakflächen des internen Standards in diesen Messungen betragen:

Peakfläche (AU*min)

Charge 1 2707768,2

Charge 2 2700374,8

Als Ergebnis dieser Untersuchungen zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Messergebnissen aus den Extraktionen und Messungen mit 2 unterschiedlichen Chargen von Chemikalien. Die HPLC Methodik ist in diesem Punkt robust gegenüber Änderungen in der Standardprozedur.

4.4.3 HPLC-Analytik der phenolischen Bestandteile in Möhren – Ergebnisse

Nachdem die HPLC-Methodik zur Bestimmung phenolischer Bestandteile in der Probenmatrix Möhren erfolgreich hinsichtlich der einzelnen Verfahrensschritte überprüft wurde, sollte nach der Quantifizierung der identifizierten Inhaltsstoffe die Eignung der Methodik zur Differenzierung und Klassifizierung von Möhrenproben überprüft werden.

Mittels der für die Standardsubstanzen Chlorogensäure und p-Hydroxybenzoesäure aufgenommenen Kalibriergeraden wurde der Gehalt dieser Substanzen in den einzelnen Proben quantifiziert. Für die Quantifizierung wurde die folgende Formel verwendet:

$$\mu\text{g/g} = \frac{b \cdot 3}{5}$$

- b = Durch lineare Regression erhaltener Wert in $\mu\text{g/ml}$ für den jeweiligen Inhaltsstoff
 3 = Volumen des Gesamtextraktes (ml)
 5 = Extrahierte Probe (g)

Tabelle 4-45: Gehalt phenolischer Substanzen in Möhren

Code	Probe	Chlorogensäure ($\mu\text{g/g TM}$)	p-Hydroxybenzoesäure ($\mu\text{g/g TM}$)
G 1	'Rodelika' N-	851,04	118,56
G 2	'Rodelika' N+	871,73	76,55
H 1	'Rothild' N -	1167,45	186,23
H 2	'Rothild' N+	1323,32	162,96
O 1	'Narbonne', Öko	925,77	61,11
O 2	'Narbonne', konventionell	1845,29	149,22
P 1	'Nerac', konventionell	526,80	199,55
P 2	'Nerac', Öko	695,91	184,24
Q 1	'Nerac', konventionell	839,75	382,97
Q 2	'Nerac', Öko	809,40	367,65
R 1	'Nerac', Öko	829,67	40,78
R 2	'Nerac', konventionell	722,68	178,94
S 1	'Narbonne', konventionell	901,77	135,55
S 2	'Narbonne', Öko	930,89	149,24

Der mittlere p-Hydroxybenzoesäuregehalt und Chlorogensäuregehalt schwanken in einem Bereich zwischen 40,78 -199,55 $\mu\text{g/g TM}$ bzw. 526,80 - 1845,29 $\mu\text{g/g TM}$, wobei

eine Abhängigkeit vom Anbausystem oder der N-Düngung aus diesen Werten nicht ersichtlich ist.

Differenzierung und Klassifizierung

Entsprechend der Herkunft des Probenmaterials ergeben sich Unterscheidungs- und Klassifizierungsmöglichkeiten nach:

- Unterschiedlicher N-Versorgung (UniK-Möhren 2003, 2004)
- Unterschiedlichen Sorten (UniK-Möhren 2004, FiBL-Möhren 2002, 2003, Möhren-Erzeugerproben 2004)
- Unterschiedlichem Anbausystem und Standort (Möhren-Erzeugerproben 2004)

Bei den UniK-Möhrenproben und den FiBL-Möhren wurden aus den Feldwiederholungen hergestellte repräsentative Bulk-Proben gemessen, daher bezieht sich die statistische Aussage hierbei auf die Probenunterschiede.

4.4.3.1 Polyphenole in Möhren unterschiedlicher Sorten (FiBL-Möhren)

Messungen 2002

Die Messungen mit der HPLC ergaben jeweils ein Chromatogramm in dem 9 Peaks reproduzierbar dargestellt werden konnten. Diese Peaks konnten, gemessen an den Retentionszeiten, in allen Proben der untersuchten Möhren dargestellt werden.

Tabelle 4-46: Retentionszeiten detektierter Peaks in FiBL-Möhren 2002

	Rt. (min)		Rt. (min)
Peak Nr. 1a	3,15	Peak Nr. 6a	44,89
Peak Nr. 2a	8,49	Peak Nr. 7a	142,89
Peak Nr. 3a	12,89	Peak Nr. 8a	179,56
Peak Nr. 4a	34,99	Peak Nr. 9a (6-Methoxyflavon)	191,89
Peak Nr. 5a	44,56		

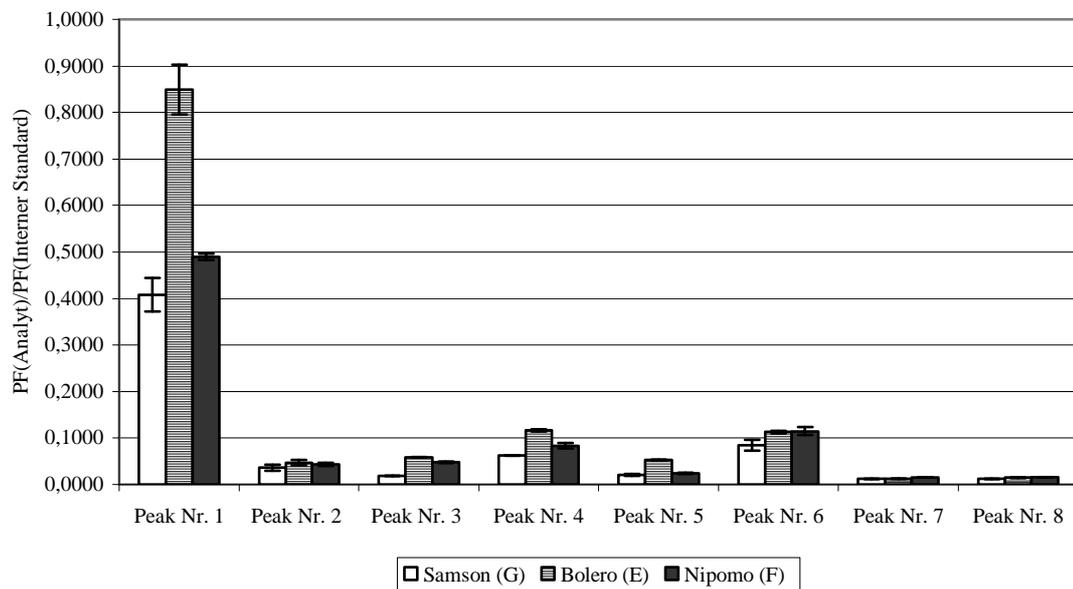


Abbildung 4-59: Messergebnisse ($PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$) von Möhren unterschiedlicher Sorten (FiBL-Möhren 2002).

Differenzierung

Eine Differenzierung der verschiedenen Möhren auf der Grundlage einzelner Peaks erfolgte nach Prüfung auf Homogenität der Varianzen und anschließender ANOVA. Bei Inhomogenität der Varianzen erfolgte eine Auswertung mittels Tukey-Kramer HSD.

Die Unterscheidungen sind in den folgenden Tabellen dargestellt, positive Werte bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Proben.

Peak Nr. 1a:

Abs(Dif)-LSD	'Boléro' (F_1)	'Nipomo' (F_1)
'Nipomo' (F_1)	0.21226	
'Samson' (OP)	0.29185	-0.06753
q^*	Alpha	
2.66776	0.05	

Peak Nr.3a:

Abs(Dif)-LSD	'Boléro' (F ₁)	'Nipomo' (F ₁)
'Nipomo' (F ₁)	0.00776	
'Samson' (OP)	0.03708	0.02599
q*	Alpha	
2.66776	0.05	

Peak Nr. 4a:

Abs(Dif)-LSD	'Boléro' (F ₁)	'Nipomo' (F ₁)
'Nipomo' (F ₁)	0.02056	
'Samson' (OP)	0.04078	0.00701
q*	Alpha	
2.66776	0.05	

Peak Nr. 5a:

Abs(Dif)-LSD	'Boléro' (F ₁)	'Nipomo' (F ₁)
'Nipomo' (F ₁)	0.02185	
'Samson' (OP)	0.02504	-0.00345
q*	Alpha	
2.66776	0.05	

Peak Nr. 7a:

Abs(Dif)-LSD	'Boléro' (F ₁)	'Nipomo' (F ₁)
'Nipomo' (F ₁)	0.00129	
'Samson' (OP)	0.00179	-0.00050
q*	Alpha	
2.66776	0.05	

Peak Nr. 8a:

Abs(Dif)-LSD	'Boléro' (F ₁)	'Nipomo' (F ₁)
'Nipomo' (F ₁)	0.00032	
'Samson' (OP)	0.00262	0.00128
q*	Alpha	
2.66776	0.05	

Anhand der Peaks Nr. 3a und 4a können alle Proben voneinander getrennt werden.

Mit den Peaks Nr. 5a und Nr. 7a können die Hybridsorte 'Boléro' und die samenfeste Sorte 'Samson' getrennt werden.

Mit den Peaks Nr. 5a und Nr. 7a können die Hybridsorten 'Boléro' und 'Nipomo' voneinander getrennt werden.

Zur Gruppierung dieser Möhrenproben wurde eine lineare Diskriminantenanalyse angewendet. Dabei wurden alle detektierten Peaks für eine mögliche Gruppenbildung ausgewertet. Mit der LDA können alle Proben den Sorten entsprechend in einzelne Gruppen eingeteilt werden. Eine Gruppenbildung nach den Hybridsorten und den samenfesten Sorten zeigt sich durch diese Ergebnisse nicht. Als Diskriminanten dienen der Peak Nr. 3a, Peak Nr. 4a, Peak Nr. 5a, Peak Nr. 6a, Peak Nr. 7a und Peak Nr. 8a. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung (4-60) dargestellt.

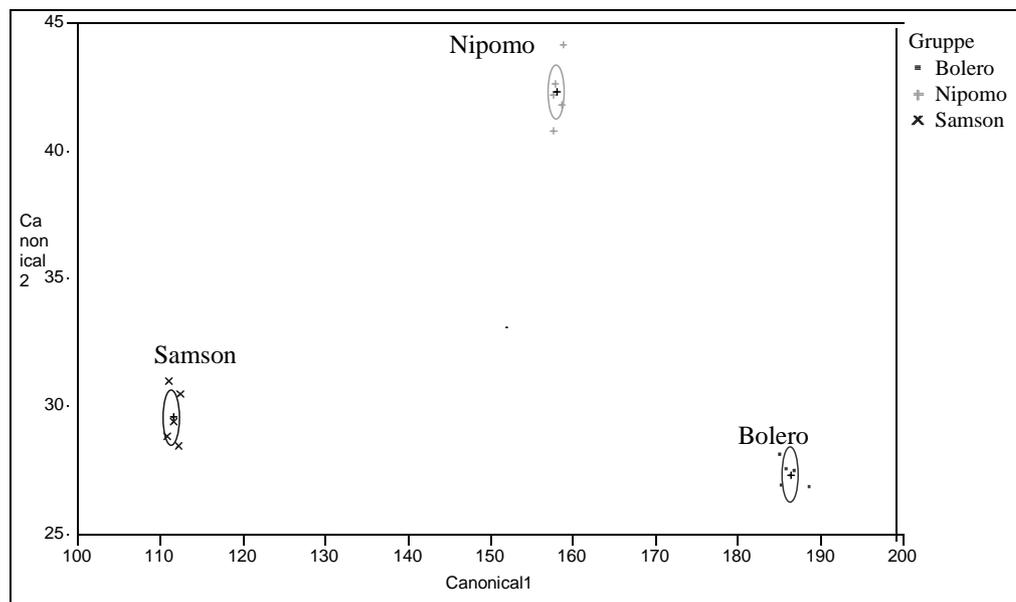


Abbildung 4-60: LDA mit Möhren unterschiedlicher Sorten (FiBL-Möhren, 2002). Messung in jeweils 5-facher Probenwiederholung (Anzahl der falsch klassifizierte Proben = 0, % der falsch klassifizierte Proben = 0, $-2\log$ Wahrscheinlichkeit = 0).

Messungen 2003

Die Messungen mit der HPLC ergaben jeweils ein Chromatogramm in dem 9 Peaks reproduzierbar dargestellt werden konnten. Diese Peaks konnten in allen Proben der untersuchten Möhren dargestellt werden.

Tabelle 4-47: Retentionszeiten (Rt.) detektierter Peaks in FiBL-Möhren (2003)

	Rt. (min)		Rt. (min)
Peak Nr. 1a	3,12	Peak Nr. 6a (Chlorogensäure)	45,26
Peak Nr. 2a	8,56	Peak Nr. 7a	142,24
Peak Nr. 3a	13,45	Peak Nr. 8a	180,00
Peak Nr. 4a (p-Hydroxybenzoesäure)	35,40	Peak Nr. 9a (6-Methoxyflavon)	192,56
Peak Nr. 5a (Chlorogensäure)	44,53		

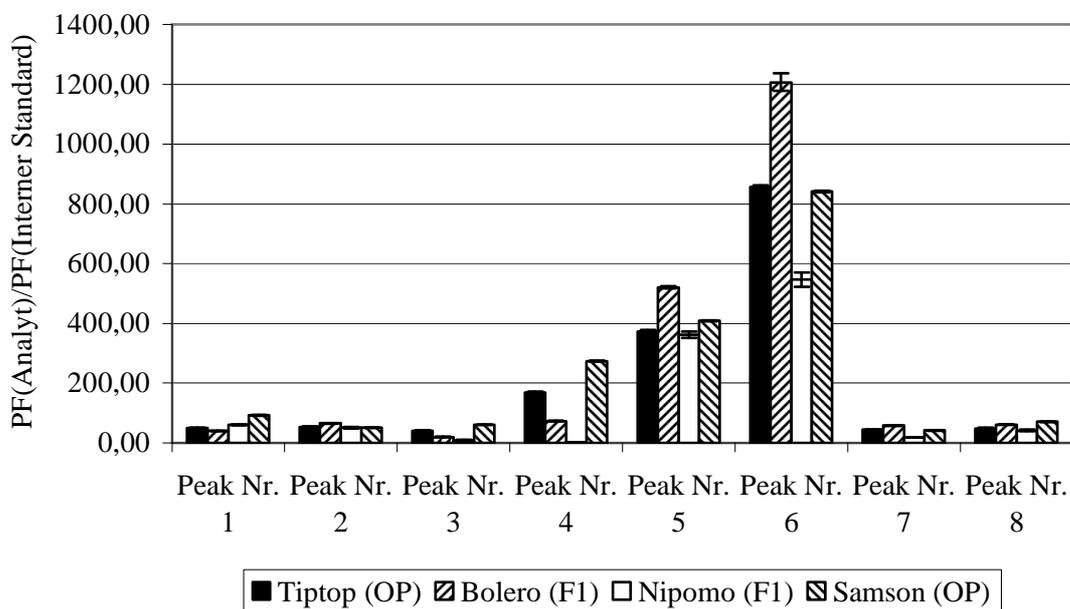


Abbildung 4-61: Messergebnisse (PF(Analyt)/PF(IS)) von Möhren unterschiedlicher Sorten (FiBL-Möhren 2003).

Für die Differenzierung der Proben auf der Grundlage einzelner Peaks erfolgte eine Prüfung auf Homogenität der Varianzen und anschließender ANOVA. Bei Inhomogenität der Varianzen erfolgte eine Auswertung mittels Tukey-Kramer HSD.

Die Unterscheidungen sind im Folgenden dargestellt, positive Werte bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Proben.

Peak Nr. 1a:

Abs(Dif)-LSD	'Samson' (OP)	'Nipomo' (F ₁)	'Tiptop' (OP)
'Nipomo' (F ₁)	26.476		
'Tiptop' (OP)	36.330	4.290	
'Boléro' (F ₁)	46.318	14.278	4.424
q*	Alpha		
2.86102	0.05		

Peak Nr. 2a:

Abs(Dif)-LSD	'Boléro' (F ₁)	'Tiptop' (OP)	'Samson' (OP)
'Tiptop' (OP)	6.0165		
'Samson' (OP)	7.6739	-4.2368	
'Nipomo' (F ₁)	8.3193	-3.5914	-5.2488
q*	Alpha		
2.86102	0.05		

Peak Nr. 3a:

Abs(Dif)-LSD	'Samson' (OP)	'Tiptop'(OP)	'Boléro' (F ₁)
'Tiptop' (OP)	14.594		
'Boléro' (F ₁)	35.770	17.168	
'Nipomo' (F ₁)	47.430	28.827	7.651
q*	Alpha		
2.86102	0.05		

Peak Nr. 4a (p-Hydroxybenzoesäure):

Abs(Dif)-LSD	'Samson' (OP)	'Tiptop' (OP)	'Boléro' (F ₁)
'Tiptop' (OP)	94.17		
'Boléro' (F ₁)	189.17	84.19	
'Nipomo' (F ₁)	261.54	156.56	61.57
q*	Alpha		
2.86102	0.05		

Peak Nr. 5a (Chlorogensäure):

Abs(Dif)-LSD	'Boléro' (F ₁)	'Samson' (OP)	'Tiptop' (OP)
'Samson' (OP)	87.85		
'Tiptop' (OP)	123.63	11.08	
'Nipomo' (F ₁)	133.60	21.06	-14.72
q*	Alpha		
2.86102	0.05		

Peak Nr. 6a (Chlorogensäure):

Abs(Dif)-LSD	'Boléro' (F ₁)	'Tiptop' (OP)	'Samson' (F ₁)
'Tiptop' (OP)	273.22		
'Samson' (OP)	288.82	-61.20	
'Nipomo' (F ₁)	583.30	233.29	217.69
q*	Alpha		
2.86102	0.05		

Peak Nr. 7a:

Abs(Dif)-LSD	'Boléro' (F ₁)	'Tiptop' (OP)	'Samson' (OP)
'Tiptop' (OP)	10.231		
'Samson' (OP)	11.664	-2.969	
'Nipomo' (F ₁)	35.333	20.700	19.267
q*	Alpha		
2,86102	0,05		

Peak Nr. 8a:

Abs(Dif)-LSD	'Samson' (OP)	'Boléro' (F ₁)	'Tiptop' (OP)
'Boléro' (F ₁)	2.591		
'Tiptop' (OP)	15.578	5.904	
'Nipomo' (F ₁)	22.351	12.677	-0.309
q*	Alpha		
2.86102	0.05		

Anhand der vorliegenden Messergebnisse können signifikante Sortenunterschiede zwischen den untersuchten Möhrensorten ermittelt werden. Mit allen Peaks können jeweils einzelne Sorten differenziert werden, wobei auch Proben der Hybridsorten und der samenfesten Sorten voneinander getrennt werden können. Eine Gruppierung der Sorten in samenfeste und Hybridsorten ist anhand der Ergebnisse der Einzelstoffmessungen nicht möglich.

Eine weiter gehende statistische Analyse mittels LDA kann die Möhrenproben in drei unterschiedliche Gruppen unterteilen. Als Diskriminanten dienten dabei die Peaks Nr. 1a, Nr. 4a, Nr. 5a, Nr. 7a und Nr. 8a. Die Unterteilung richtet sich dabei nach der Sorte. Alle Proben werden korrekt nach den jeweiligen Sorten in Gruppen unterteilt.

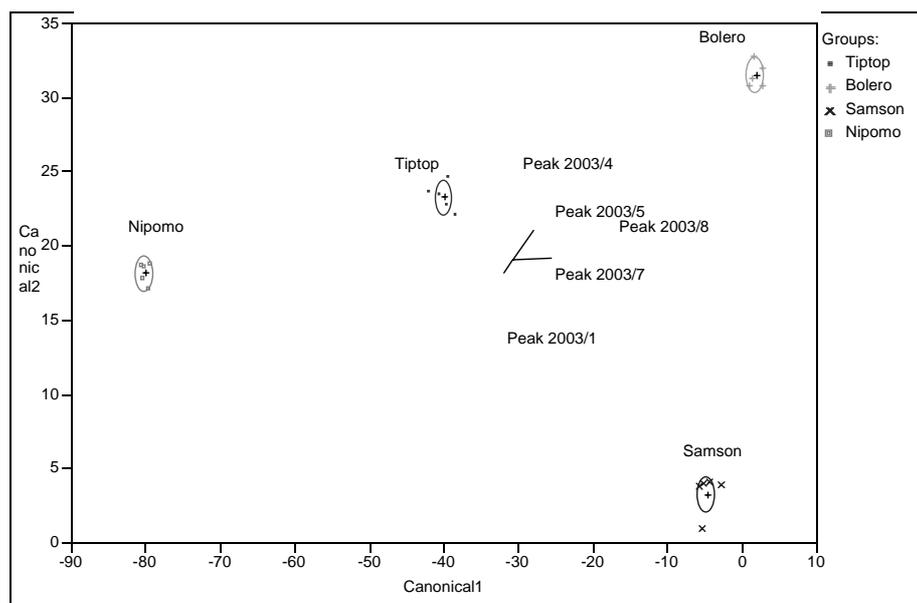


Abbildung 4-62: LDA mit Möhren unterschiedlicher Sorten (FiBL-Möhren, 2003). Messung in jeweils 5-facher Probenwiederholung (Anzahl der falsch klassifizierten Proben = 0, % der falsch klassifizierten Proben = 0, $-2\log$ Wahrscheinlichkeit = 0).

Im Vergleich beider Jahre kann eine Gruppenbildung nach Sorten mittels LDA mit den folgenden Peaks erreicht werden:

Tabelle 4-48: Diskriminanten zur Gruppierung mittels LDA in den Jahren 2002 und 2003

Messung im Jahr 2002:		Messung im Jahr 2003:	
Diskriminanten	Rt. (min)	Diskriminanten	Rt. (min)
Peak Nr.3a	12,89	Peak Nr. 1a	3,12
Peak Nr. 4a	34,99	Peak Nr. 4a (p-Hydroxybenzoesäure)	35,40
Peak Nr. 5a	44,56	Peak Nr. 5a (Chlorogensäure)	44,53
Peak Nr. 6a	44,89	Peak Nr. 7a	142,24
Peak Nr. 7a	142,89	Peak Nr. 8a	180,56
Peak Nr. 8a	179,56		

4.4.3.2 Ergebnisse der Messungen von Möhren mit unterschiedlicher N-Düngung (UniK-Möhren)

Messungen 2003:

Die Messungen mit der HPLC ergaben jeweils ein Chromatogramm in dem 9 Peaks reproduzierbar dargestellt werden konnten.

Tabelle 4-49: Retentionszeiten (Rt.) detektierter Peaks in UniK-Möhren (2003)

	Rt. (min)		Rt. (min)
Peak Nr. 1a	3,15	Peak Nr. 6a (Chlorogensäure)	45,45
Peak Nr. 2a	8,49	Peak Nr. 7a	142,01
Peak Nr. 3a	13,23	Peak Nr. 8a	180,35
Peak Nr. 4a (p-Hydroxybenzoesäure)	35,49	Peak Nr. 9a (6-Methoxyflavon)	192,44
Peak Nr. 5a (Chlorogensäure)	44,89		

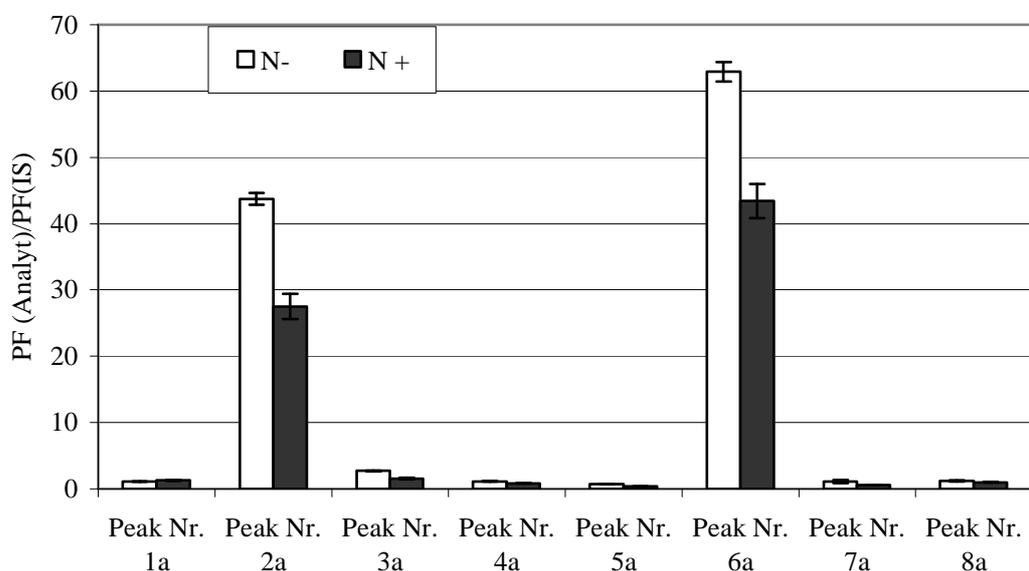


Abbildung 4-63: Messergebnisse (PF(Analyt)/PF(IS)) für Möhren der Sorte 'Rodelika' mit unterschiedlicher N-Düngung (N- = 0 kg N, N+ = 150 kg Hornmehl).

Die Daten wurden auf Normalverteilung und Homogenität der Varianzen geprüft, soweit zulässig erfolgte die Auswertung mittels ANOVA. Bei Inhomogenität der Varianzen erfolgte eine Auswertung nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis Tests (Rank Sums), 1-way Test ChiSquare Approximation.

Anhand der folgenden Peaks können die Möhrenproben mit unterschiedlicher N-Düngung differenziert werden.

Tabelle 4-50: Differenzierung von UniK-Möhren (2003)

Peak Nr. 2a	F = 60,835	Prob > F < 0,001
Peak Nr. 3a	F = 142,1309	Prob > F < 0,0001
Peak Nr. 4a	F = 47,921	Prob > F < 0,0001
Peak Nr. 5a	F = 43,4249	Prob > F 0,0002
Peak Nr. 6a	F = 177,000	Prob > F 0,001
Peak Nr. 7a	F = 689,92	Prob > F < 0,001
Peak Nr. 8a	F = 1941,028	Prob > F < 0,0001

Messungen Möhren 2004

Die Messungen mit der HPLC ergaben jeweils ein Chromatogramm, in dem 11 Peaks reproduzierbar dargestellt werden konnten. Diese Peaks konnten, gemessen an den Retentionszeiten, in allen Proben der untersuchten Möhren dargestellt werden.

Tabelle 4-51: Retentionszeiten (Rt.) detektierter Peaks in UniK-Möhren (2004)

	Rt. (min)		Rt. (min)
Peak Nr. 1b	3,12	Peak Nr. 9b	142,24
Peak Nr. 3b	13,45	Peak Nr. 10b	171,23
Peak Nr. 4b p-Hydroxybenzoesäure	35,40	Peak Nr. 11b	180,00
Peak Nr. 5b Chlorogensäure	44,53	Interner Standard	192,56
Peak Nr. 6b Chlorogensäure	45,26	Peak Nr. 13b	201,42
Peak Nr. 7b	60,54		

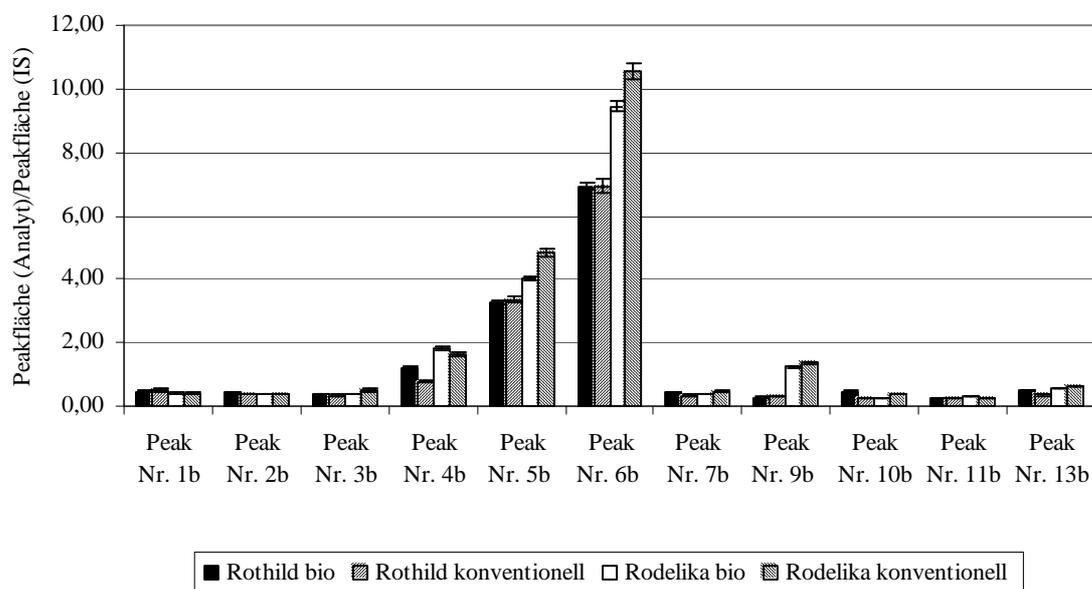


Abbildung 4-64: Messergebnisse (PF(Analyt)/PF(IS)) für Möhren der Sorte 'Rodelika' und 'Rothild' mit unterschiedlicher N-Düngung (N- = 0 kg N, N+ = 150 kg Hornmehl).

Differenzierung

Eine Differenzierung der Proben auf der Basis der Einzelpeaks erfolgte mittels ANOVA und LME/pairwise Test. Für alle Peaks wurden die Probenunterschiede in % errechnet. Es ergeben sich folgende Unterscheidungen:

Peak Nr. 4b (p-Hydroxybenzoesäure):

	'Rodelika' (N+)	'Rothild' (N-)	'Rothild' (N+)
'Rodelika' (N-)	***	***	**
'Rodelika' (N+)		***	***
'Rothild' (N-)			*

***= p < 0,001, **=p < 0,01, *=p < 0,05

Peak Nr. 5b (Chlorogensäure):

	'Rodelika' (N+)	'Rothild' (N-)	'Rothild' (N+)
'Rodelika' (N-)	-	***	***
'Rodelika' (N+)		**	***
'Rothild' (N-)			**

***= p < 0,001, **=p < 0,01, *=p < 0,05

Peak Nr. 6b (Chlorogensäure):

	'Rodelika' (N+)	'Rothild' (N-)	'Rothild' (N+)
'Rodelika' (N-)	-	***	***
'Rodelika' (N+)		***	***
'Rothild' (N-)			-

***= p<0,001, **=p < 0,01, *=p < 0,05

Peak Nr. 7b:

	'Rodelika' (N+)	'Rothild' (N-)	'Rothild' (N+)
'Rodelika' (N-)	**	*	-
'Rodelika' (N+)		*	**
'Rothild' (N-)			**

***=p< 0,001, **=p < 0,01, *=p < 0,05

Peak Nr. 9b:

	'Rodelika' (N+)	'Rothild' (N-)	'Rothild' (N+)
'Rodelika' (N-)	-	***	***
'Rodelika' (N+)		***	***
'Rothild' (N-)			**

***=p< 0,001, **=p < 0,01, *=p < 0,05

Peak Nr. 10b:

	'Rodelika' (N+)	'Rothild' (N-)	'Rothild' (N+)
'Rodelika' (N-)	**	**	***
'Rodelika' (N+)		-	***
'Rothild' (N-)			***

***=p< 0,001, **=p < 0,01, *=p < 0,05

Peak Nr. 11b:

	'Rodelika' (N+)	'Rothild' (N-)	'Rothild' (N+)
'Rodelika' (N-)	-	***	-
'Rodelika' (N+)		***	-
'Rothild' (N-)			***

***= p< 0,001, **=p< 0,01, *=p < 0,05

Peak Nr. 13b:

	'Rodelika' (N+)	'Rothild' (N-)	'Rothild' (N+)
'Rodelika' (N-)	***	***	**
'Rodelika' (N+)		***	***
'Rothild' (N-)			*

***=p< 0,001, **=p < 0,01, *=p < 0,05

Eine signifikante Unterscheidung beider Möhrensorten nach dem Anbausystem kann durch die Peaks Nr. 7b und Nr. 10b erreicht werden. Eine Differenzierung jeweils einer Sorte nach dem Anbausystem erfolgt mittels der Peaks Nr. 1b, Nr. 11b und Nr. 13b. Eine Trennung der untersuchten Proben nach Sorten kann durch die Peaks Nr. 1b, Nr. 5b + 6b (Chlorogensäure) und durch den Peak Nr. 9b erreicht werden.

Gruppierung von Möhren mit unterschiedlicher Düngung (UniK-Möhren)

Die Differenzierung und die Klassifizierung der codierten Proben wurden mittels LDA vorgenommen. Durch die Auswertung des Peaks Nr. 4b (p-Hydroxybenzoesäure), des Peaks Nr. 8b, des Peaks Nr. 10b und des Peaks Nr. 13b können alle Proben statistisch signifikant voneinander getrennt werden. Dabei ergibt sich erst durch die Canonical 2 Funktion eine Trennung gemäß den Düngungsstufen. Wie in der Darstellung dargestellt, erscheinen die Unterschiede zwischen den Sorten größer als Unterschiede aus den unterschiedlichen Düngungsstufen. Nach der Lage der durch die LDA gebildeten Gruppen können keine Charakteristika für die verschiedenen Düngungsstufen abgeleitet werden.

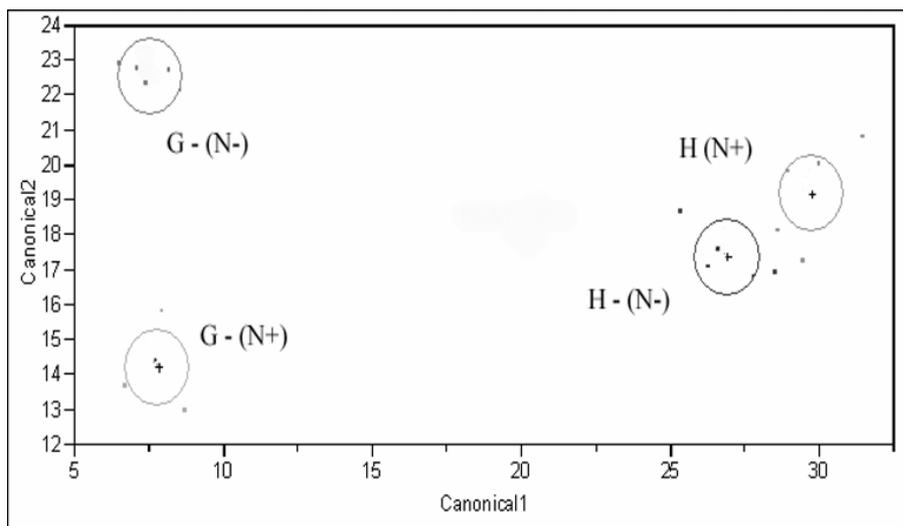


Abbildung 4-65: LDA mit UniK-Möhren. Untersucht wurden Möhren zweier Sorten aus zwei unterschiedlichen Düngungsstufen (N - = ohne Stickstoffdüngung, N + = + 150 kg N/ha) in jeweils 5-facher Probenwiederholung (Anzahl der falsch klassifizierten Proben = 0, % der falsch klassifizierten Proben = 0, -2log Wahrscheinlichkeit = 0,853).

Durch die Gruppierung der Möhren mit unterschiedlicher N-Düngung mit decodierten Proben mittels CART-Verfahren, werden in einen ersten Trennungsschritt durch den Peak Nr. 11 zwei Untergruppen gebildet. Dabei bilden die Proben 'Rodelika' (N+) und 'Rothild' (N-) sowie 'Rodelika' (N-) und 'Rothild' (N+) zusammen jeweils eine Untergruppe. Damit entsprechen die ungedüngte Varianten einer Sorte der gedüngten Varian-

te der jeweils anderen Sorte und umgekehrt. In einer weiteren Unterteilung werden diese Gruppen nach den Sorten in jeweils eigene Untergruppen eingeteilt. Eine Gruppenbildung ist damit weder gemäß den Sorten noch den Anbauvarianten möglich.

4.4.3.3 Differenzierung von Möhren-Erzeugerproben

Die Messungen mit der HPLC ergaben jeweils ein Chromatogramm in dem 10 Peaks reproduzierbar dargestellt werden konnten. Diese Peaks konnten, gemessen an den Retentionszeiten, in allen Proben der untersuchten Möhren dargestellt werden.

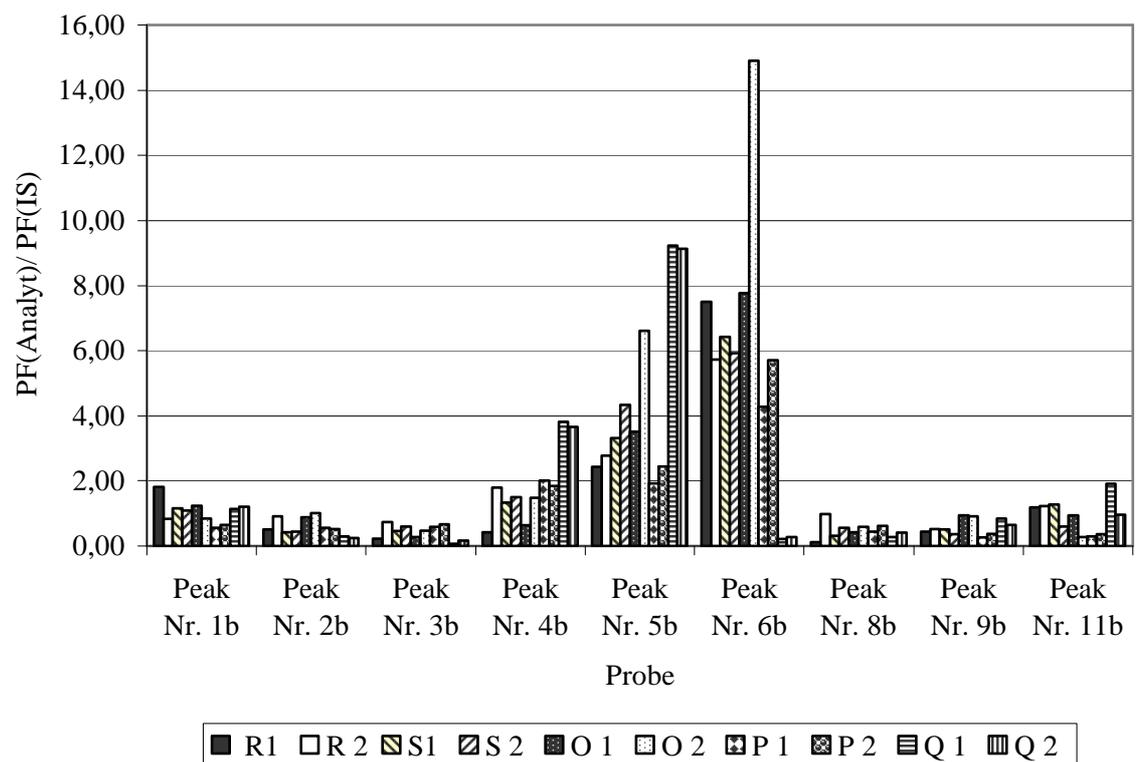


Abbildung 4-66: Messergebnisse ($PF(\text{Analyt})/PF(\text{IS})$) der Möhren-Erzeugerproben.

Tabelle 4-52: Retentionszeiten (Rt.) detektierter Peaks in Möhren-Erzeugerproben (2004)

	Rt. (min)		Rt. (min)
Peak Nr. 1b	3,12	Chlorogensäure	45,31
Peak Nr. 2b	8,61	Peak Nr. 8b	85,13
Peak Nr. 3b	13,31	Peak Nr. 9b	142,31
p-Hydroxybenzoesäure	35,38	Peak Nr. 11b	180,22
Chlorogensäure	44,67	Interner Standard	192,69

Eine Differenzierung der Proben auf der Basis der einzelnen Peaks erfolgte mittels ANOVA und LME/pairwise Test. Tabellen der t- und der p-Werte finden sich im Anhang. Für alle Peaks wurden die Probenunterschiede in % berechnet. Unterschiede, die in der Streubreite der Methodenpräzision liegen gelten nicht als signifikant. Es ergaben sich folgende Unterscheidungen: ***= $p < 0,001$, **= $p < 0,01$, *= $p < 0,05$

Peak Nr. 1b:

	O2	P1	P2	Q1	Q2	R1	R2	S1	S2
O1	-	*	*	-	-	*	-	-	-
O2		-	-	-	-	*	-	-	-
P1			***	***	***	***	**	**	***
P2				***	***	***	**	**	***
Q1					-	***	***	-	-
Q2						***	***	-	-
R1							***	**	***
R2								*	**
S1									-

Die Probenpaare P ('Nerac') und R ('Nerac') zeigen signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Anbausystemen, die Probenpaare O ('Narbonne'), Q ('Nerac') und S ('Narbonne') können nicht nach dem Anbausystem getrennt werden.

Die Proben der Sorte 'Narbonne' (O, S) können nicht voneinander getrennt werden. Die Proben der Sorte 'Nerac' können in einzelnen Proben voneinander getrennt werden.

Varianten aus ökologischem Anbau können in einzelnen Proben voneinander getrennt werden. Varianten aus konventionellem Anbau können in einzelnen Proben voneinander getrennt werden.

Peak Nr. 2b:

	O2	P1	P2	Q1	Q2	R1	R2	S1	S2
O1	-	*	**	**	**	**	-	**	**
O2		-	*	*	**	*	-	*	*
P1			-	**	**	-	***	-	-
P2				**	***	-	***	-	-
Q1					-	***	***	-	*
Q2						***	***	*	*
R1							***	-	-
R2								***	***
S1									-

Die Probenpaare O ('Narbonne'), P ('Nerac'), Q ('Narbonne') und S ('Narbonne') können nicht nach den unterschiedlichen Anbausystemen unterschieden werden.

Die Proben R der Sorte 'Nerac' können differenziert werden.

Einzelne Proben können innerhalb der Sorten getrennt werden.

Einzelne Proben der gleichen Variante können voneinander getrennt werden.

Peak Nr. 3b:

	O2	P1	P2	Q1	Q2	R1	R2	S1	S2
O1	**	***	**	***	**	-	***	**	**
O2		*	*	***	**	**	**	-	-
P1			-	***	***	***	***	*	-
P2				***	***	**	-	**	-
Q1					***	***	***	***	**
Q2						**	***	**	**
R1							***	**	**
R2								***	-
S1									-

Die Probenpaare O ('Narbonne'), Q ('Nerac') und R ('Nerac') können innerhalb der Betriebspaare differenziert werden.

Eine Trennung von Proben aus gleichem Anbau ist in einzelnen Proben möglich.

Eine Trennung von Proben beider Sorten ist innerhalb der Sorten in einzelnen Proben möglich.

Peak Nr. 4b (p-Hydroxybenzoesäure):

	O2	P1	P2	Q1	Q2	R1	R2	S1	S2
O1	***	***	***	***	***	-	***	***	***
O2		***	***	***	***	***	**	-	-
P1			-	***	***	***	*	***	*
P2				***	***	***	-	**	*
Q1					-	***	***	***	***
Q2						***	***	***	***
R1							***	***	***
R2								**	*
S1									-

Die Proben der Sorte 'Narbonne' (O) und die Proben der Sorte 'Nerac' (R) können nach dem Anbausystem getrennt werden.

Eine Trennung von Proben aus gleichem Anbau ist in einzelnen Proben möglich.

Eine Trennung von Proben beider Sorten ist innerhalb der Sorten in einzelnen Proben möglich.

Peak Nr. 5b (Chlorogensäure):

	O2	P1	P2	Q1	Q2	R1	R2	S1	S2
O1	***	***	***	***	***	**	**	-	**
O2		***	***	***	***	***	***	***	***
P1			***	***	***	-	**	*	***
P2				***	***	-	-	-	***
Q1					-	***	***	***	***
Q2						***	***	***	***
R1							-	-	***
R2								-	***
S1									-

Die Betriebspaare O ('Narbonne') und P ('Nerac') können voneinander getrennt werden.

Eine Trennung von Proben aus gleichem Anbau ist in einzelnen Proben möglich.

Eine Trennung von Proben beider Sorten ist innerhalb der Sorten in einzelnen Proben möglich.

Peak Nr. 6b (Chlorogensäure):

	O2	P1	P2	Q1	Q2	R1	R2	S1	S2
O1	***	***	***	***	***	-	**	-	-
O2		***	***	***	***	***	***	***	**
P1			**	**	***	**	**	*	-
P2				***	***	-	-	-	-
Q1					-	***	***	**	**
Q2						***	***	**	**
R1							*	-	-
R2								-	-
S1									-

Die Betriebspaare O ('Narbonne'), P ('Nerac') und R ('Nerac') können voneinander getrennt werden.

Eine Trennung von Proben aus gleichem Anbau ist in einzelnen Proben möglich.

Eine Trennung von Proben beider Sorten ist innerhalb der Sorten in einzelnen Proben möglich.

Peak Nr. 8b:

	O2	P1	P2	Q1	Q2	R1	R2	S1	S2
O1	**	-	**	**	-	***	***	-	-
O2		***	-	***	**	***	***	-	-
P1			***	***	-	***	***	-	-
P2				***	**	***	**	*	-
Q1					*	***	***	-	*
Q2						**	***	-	-
R1							***	*	**
R2								**	**
S1									-

Die Betriebspaare O ('Narbonne'), P ('Nerac'), Q ('Nerac') und R ('Nerac') können gemäß den unterschiedlichen Anbausystemen differenziert werden.

Eine Trennung von Proben aus gleichem Anbau ist in einzelnen Proben möglich.

Eine Trennung von Proben beider Sorten ist innerhalb der Sorten in einzelnen Proben möglich.

Peak Nr. 9b:

	O2	P1	P2	Q1	Q2	R1	R2	S1	S2
O1	-	***	***	-	***	***	***	-	***
O2		***	***	-	***	***	***	-	***
P1			-	***	***	*	**	-	-
P2				***	***	*	-	-	-
Q1					**	***	***	-	***
Q2						***	***	**	**
R1							*	-	-
R2								-	**
S1									-

Die Betriebspaare R ('Nerac') und Q ('Nerac') können in ihren Anbauvarianten differenziert werden.

Eine Trennung von Proben aus gleichem Anbau ist in einzelnen Proben möglich.

Eine Trennung von Proben beider Sorten ist innerhalb der Sorten in einzelnen Proben möglich.

Peak Nr. 11b:

Die Betriebspaare O ('Narbonne'), P ('Nerac') und Q ('Nerac') können in ihren Anbauvarianten differenziert werden.

Bis auf die Varianten des Betriebspaares R ('Nerac') können alle weiteren Proben der Sorte 'Nerac' nicht voneinander getrennt werden.

	O2	P1	P2	Q1	Q2	R1	R2	S1	S2
O1	***	***	***	***	-	**	***	**	-
O2		-	***	***	***	***	***	***	*
P1			***	***	***	***	***	***	*
P2				***	***	***	***	***	-
Q1					***	***	***	***	**
Q2						**	***	**	-
R1							-	-	-
R2								-	-
S1									-

Insgesamt zeigt sich ein vielfältiges Bild in Bezug auf die Trennung von Möhren aus unterschiedlichem Anbau. Eine Differenzierung der Betriebspaare nach ihren Anbauvarianten ist in einzelnen Fällen möglich, wobei jeder Peak eine eigene Charakteristik der Trennung zeigt. Auffallend ist die unterschiedliche Trennung durch die Peaks Nr. 5b und Nr. 6b, die beide durch den Vergleich der UV-Spektren und der Retentionszeiten als Chlorogensäure identifiziert wurden.

Eine Trennung von Proben der gleichen Sorten ist ebenso möglich wie die Trennung von Proben des gleichen Anbausystems. Hinweise auf charakteristische Merkmale nach dem Anbausystem ergeben sich auf der Grundlage einzelner Stoffe nicht.

Gruppierung und Klassifizierung von Möhren-Erzeugerproben

Die Gruppierung der codierten Proben wurde mittels einer LDA vorgenommen.

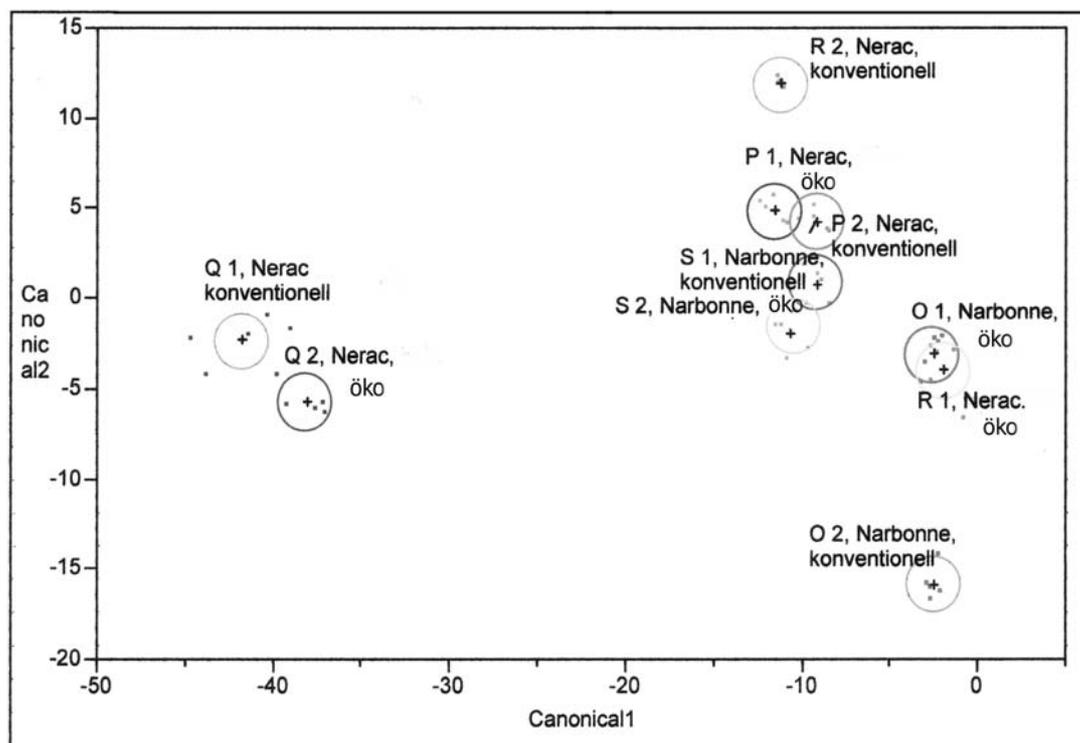


Abbildung 4-67: LDA mit Möhren-Erzeugerproben. Als Diskriminanten dienten *p*-Hydroxybenzoesäure und Chlorogensäure sowie die Peaks Nr. 8, 9 und 11. Untersucht wurden Betriebspaare von Möhren zweier Sorten aus jeweils konventionellem und ökologischem Anbau in jeweils 5-facher Probenwiederholung (Anzahl der falsch klassifizierte Proben = 1, % der falsch klassifizierte Proben = 2, $-2\log$ Wahrscheinlichkeit = 6,118).

Durch die Auswertung der Peaks für *p*-Hydroxybenzoesäure und Chlorogensäure sowie der Peaks Nr. 8b, 9b und 11b können die Proben in Gruppen unterteilt werden. Demnach bilden die Möhren P1 ('Nerac', ökologischer Anbau), P2 ('Nerac', konventioneller Anbau), S1 ('Narbonne', konventioneller Anbau) und S2 ('Narbonne', ökologischer Anbau) eine Gruppe. Innerhalb dieser Proben können die Möhren aus ökologischem und konventionellem Anbau nicht weiter voneinander getrennt werden. Die Betriebspaare der Proben Q, O und R werden differenziert. Eine weitere Gruppe wird durch die

Proben R1 ('Nerac', konventioneller Anbau) und Q1 ('Nerac', konventioneller Anbau) gebildet. Die Proben O2 ('Narbonne', konventioneller Anbau), R2 ('Nerac', ökologischer Anbau), Q1 ('Nerac', konventioneller Anbau) und Q2 ('Nerac', ökologischer Anbau) können statistisch signifikant von allen anderen Proben getrennt werden.

Nach dem Ergebnis dieser Auswertung haben Standortfaktoren und/oder Sorteneinflüsse neben den Einflüssen durch das Anbausystem deutliche Einflüsse auf den Gehalt phenolischer Substanzen.

Durch die Auswertung aller Peaks der decodierten Möhrenproben wurde im nächsten Schritt eine Klassifizierung gemäß des Anbausystems vorgenommen.

	R-square	N	N-splits	Imputes
Included:	0.991	607	3	836
Excluded:		0		

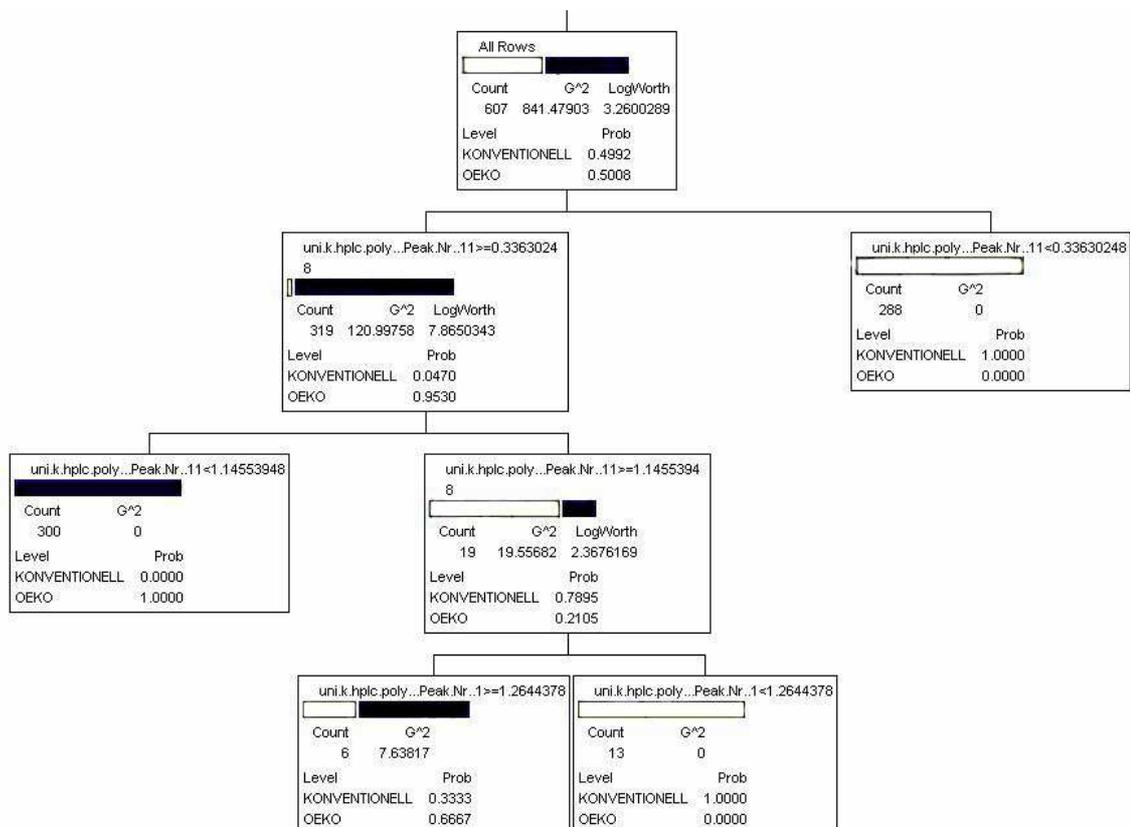


Abbildung 4-68: Klassifizierung von Möhren-Erzeugerproben nach dem Anbausystem (helle Kästen = konventionell erzeugte Proben; dunkle Kästen = ökologisch erzeugte Proben).

In einem ersten Schritt werden aus der Gesamtheit der Proben zwei Untergruppen gebildet und der größere Teil der Proben (97,3 %) richtig klassifiziert. Die weitere Trennung in zwei Stufen auf der Basis des Peak Nr. 11b und des Peak Nr. 1b hat nur noch wenig Auswirkungen. Eine Klassifizierung nach unterschiedlicher Düngung ist auf dieser Basis möglich, nach drei Trennungsschritten werden 97,5 % der Proben richtig klassifiziert.

5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Methoden für die Messung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe in Möhren- und Weizenproben aus definierten Langzeitversuchen und an Erzeugerproben ausgesuchter ökologisch und konventionell arbeitender Anbaubetriebe weiter zu entwickeln und zu validieren. Als Untersuchungsparameter dienten die Stoffklassen der Polyphenole und der Carotinoide. Die Validierungsfragen zielten dabei auf folgende Punkte ab:

- Ist es möglich Unterschiede im Carotinoid- bzw. Polyphenolspektrum definierter Proben aus unterschiedlichen Anbausystemen zu ermitteln, und können die Proben dadurch differenziert werden?
- Können messbare Unterschiede in diesen Proben trotz der beschriebenen Variabilität in der Ausprägung mit einem bestimmten Anbausystem in Verbindung gesetzt und die Proben dadurch klassifiziert werden?

Dafür wurden methodisch mit Messungen mittels HPLC-Analytik der Carotinoidgehalt und der Polyphenolgehalt auf der Basis von Einzelsubstanzen gemessen. Daneben wurde der Gehalt der Gesamtcarotinoide photometrisch als Summenparameter für die Klasse der Carotinoide bestimmt. Im Unterschied zu bisherigen Studien wurden die Messungen der vorliegenden Arbeit an codierten Proben aus verschiedenen, gut dokumentierten Anbauversuchen und an codierten Erzeugerproben aus unterschiedlichem Anbau durchgeführt.

Die Validierung bezieht sich dabei auf das gesamte Verfahren der analytischen Messungen und der statistischen Auswertung. Durch die Messungen der Carotinoide in Möhren, Weizen und Mais in nur einem Jahr und der Polyphenole in verschiedenen Probensätzen über 3 Jahre können die Untersuchungen jedoch nur als ein Schritt in Richtung der Validierungsfragen verstanden werden.

5.1 Kritik der Methode

Die Überprüfung der Validierungsparameter für die analytischen Methoden erfüllt die Ansprüche an eine *in-house-Validierung* im eigenen Labor. Um weiter gehenden Ansprüchen nach der ISO 17025 zu genügen, sollte der Validierungsumfang um den Punkt der Vergleichspräzision mit einem anderen Labor sowie für den Punkt der Richtigkeit um Ringversuche erweitert werden.

Sowohl Carotinoide als auch einige Polyphenole sind Substanzen, die gegenüber verschiedenen Einflussfaktoren wie Licht, Sauerstoff und Wärmeeinwirkung empfindlich sind. Durch Lagerung und Behandlung der jeweiligen Proben durch Gefriertrocknung können deshalb Verluste im Analytgehalt auftreten. Die entsprechenden Proben wurden deshalb bei -18 C° in luftdichten, lichtundurchlässigen Gefäßen gelagert. Da alle Proben identischen Bedingungen ausgesetzt waren, sollte es zu keinen ergebnisrelevanten Veränderungen gekommen sein, zumal gerade mit der Gefriertrocknung empfindliche Inhaltsstoffe besser erhalten werden als mit anderen Trocknungsmethoden (SAMARAS ET AL., 2005).

5.2 Carotinoide in Weizen

In den vorliegenden Untersuchungen wurden Gesamtverfahren zur Bestimmung des Carotinoidgehaltes in Weizen mit Messungen mittels HPLC-Analytik als Einzelstoffanalytik und photometrisch als Summenparameter validiert.

Die für die Messungen des Carotinoidgehaltes eingesetzten Verfahren erweisen sich im natürlichen Konzentrationsbereich als linear, spezifisch, präzise und richtig. Die Ursachen der unvollständigen Trennung des Peaks Nr. 1 und des Peaks Nr. 2, die im Verlauf der Auswertung als Lutein zusammengefasst wurden, sind vermutlich im Sinne eines „Frontings“ oder mit Einflüssen der Probenmatrix zu erklären. Die Methodenpräzision lag mit einem V_K von 2,5 % in einem akzeptablen Bereich. In einer vergleichenden Messung des Luteingehaltes an gleichem Material mit einer im Extraktionsschritt veränderten Methodik konnte Lutein als einzelner Peak dargestellt werden, die Messwerte

liegen im Mittel 5 % über den Messwerten der vorhergehenden Messung. Die chromatographischen Bedingungen müssten daher in weitergehenden Untersuchungen in dieser Hinsicht optimiert werden. Der interne Standard β -apo-8-Carotenal konnte in allen durchgeführten Messungen in einem akzeptablen Rahmen wieder gefunden werden. Die Eignung als interner Standard ist deshalb gegeben.

Im Punkt der Robustheit wurden die Einflüsse durch die Säulentemperatur und das Säulenmaterial ermittelt. Durch das Arbeiten nach Standardbedingungen können diese Einflüsse vermieden werden. Gegenüber einem Wechsel der Chargen der Chemikalien zur Extraktion und als mobile Phase zeigt sich die Methode robust.

In Bezug auf das Verfahren zur photometrischen Bestimmung der Gesamtcarotinoide konnte eine Grundkalibrierung der Parameter Präzision und Linearität des Verfahren erfolgreich durchgeführt werden. Für die Referenzsubstanz der Messungen, das β -Carotin, besteht in einem Bereich zwischen 0,1 $\mu\text{g/ml}$ und 13 $\mu\text{g/ml}$ ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten und dem Messsignal. Mit der Abnahme der β -Carotin-Konzentration in den Standardlösungen kann eine Abnahme der Messpräzision beobachtet werden. Für die vorliegenden Fragestellungen zur Differenzierung von Möhrenproben ist die Methodenpräzision ausreichend für die Ermittlung von Unterschieden zwischen den Proben.

In der Anwendung der HPLC-Methodik wurde als einziger Bestandteil aus der Klasse der Carotinoide das Xanthophyll Lutein identifiziert. Mit Konzentrationen in den Proben zwischen 2,78 $\mu\text{g/g}$ und 3,67 $\mu\text{g/g}$ liegen die Werte im Bereich bekannter Literaturwerte, die von verschiedenen Autoren zwischen 1,5 – 4,5 $\mu\text{g/g}$ angegeben werden (HEINONEN ET AL., 1989; HENTSCHEL, 2002; KONOPKA ET AL., 2003). Weitere Carotinoide, wie β -Carotin und Zeaxanthin, die in der bekannten Literatur (HEINONEN ET AL., 1989; HENTSCHEL ET AL., 2002; KONOPKA ET AL., 2003; PANFILI ET AL., 2004) als Inhaltsstoffe von Weizen beschrieben werden, konnten in den vorliegenden HPLC-Untersuchungen nicht gefunden werden. Dem gegenüber stehen Messergebnisse, die im selben Projekt (Differenzierung und Klassifizierung von Öko-Produkten mittels validierter, analytischer und ganzheitlicher Methoden“ BÖL, Projekt 020E170/F, KAHL ET AL., 2007) im Labor der BFE (Karlsruhe) durchgeführt wurden. Im gleichen Probenmaterial wird für den Luteingehalt an dieser Stelle ein Konzentrationsbereich zwischen

0,252 µg/g und 0,841 µg/g angegeben. Zusätzlich wird die Anwesenheit von Zeaxanthin beschrieben, die mit den eigenen Messergebnissen nicht bestätigt werden kann. Eine Korrelation zwischen den eigenen Werten des Luteingehaltes und denen der zweiten Methode kann weder für die DOK-Weizenproben noch für die Weizen-Erzeugerproben ermittelt werden. Unterschiede dieser Größenordnung (4,3 – 10-fach) im Luteingehalt können vermutlich nicht auf Inhomogenitäten des Probenmaterials zurückgeführt werden. Eine Überlagerung und gegenseitige Verstärkung mehrerer Peaks in den eigenen Untersuchungen kann durch die Auswertung der UV-Spektren in einem Wellenlängenbereich zwischen 210 und 470 nm über die gesamte Länge eines HPLC-Laufes ausgeschlossen werden. Möglicherweise kann eine Erklärung in der Probenaufbereitung bzw. dem Extraktionsmittel und der Extraktausbeute zu suchen sein. Dafür spricht auch der Vergleich mit dem photometrisch gemessenen Carotinoidgehalt. In den eigenen Untersuchungen wurden die Weizenextrakte für die photometrischen Messungen entsprechend den Extrakten für die Messungen mittels HPLC-Analytik – ohne Zusatz des internen Standards – angefertigt. Auch in diesen Messungen ergeben sich Messwerte in einem Bereich zwischen 5,119 µg/g und 6,528 µg/g. Eine Korrelation mit den an der BFE - in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,34 µg/g 1,01 µg/g - gemessenen Werten ist jedoch auch hier nicht zu auszumachen. Auf welche Faktoren der unterschiedliche Lutein- und Gesamtcarotinoidgehalt in den verschiedenen Laboren zurückzuführen ist, kann in den vorliegenden Untersuchungen nicht aufgeklärt werden. Eine Überprüfung der in dieser Arbeit verwendeten Methodiken hinsichtlich der Validität der Carotinoidbestimmung und des „wahren“ Wertes müsste in Ringversuchen in mehreren Laboren an homogenem Probenmaterial überprüft werden.

Eine von SCHUPHAN (1974) beschriebene negative Korrelation des Carotinoidgehaltes mit der N-Versorgung bestätigt sich in Messungen des N-Gehaltes der gleichen Proben innerhalb des Projektes „Differenzierung und Klassifizierung von Öko-Produkten mittels validierter, analytischer und ganzheitlicher Methoden“ BÖL, Projekt 020E170/F (KAHL ET AL., 2007). Der Luteingehalt zeigt signifikant negative Korrelationen mit dem N-Gehalt und dem Gehalt proteinogenen Stickstoffs.

Nach den Ergebnissen der photometrischen Messungen des Gesamtcarotinoidgehaltes in den vorliegenden Untersuchungen, kann die Anwesenheit weiterer gelber Pigmente

angenommen werden. Der Anteil des mittels HPLC-Analytik gemessenen Luteins am Gesamtcarotinoidgehalt beträgt lediglich 47,48 % - 87,69 %, wobei starke Schwankungen zwischen den einzelnen Proben auszumachen sind. Ergebnisse in der gleichen Größenordnung wurden von HENTSCHEL ET AL. (2002) für Hartweizen beschrieben. Das Auftreten von gelben Pigmenten aus der Klasse der Flavonoide erscheint durch die Art der Extraktion und die Lichtabsorption bei 447 nm unwahrscheinlich. Die Messergebnisse der HPLC-Analytik des Luteingehaltes und des photometrisch gemessenen Gesamtcarotinoidgehaltes zeigen mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,600$ in Weizen DOK-Proben und $r = -0,154$ in Weizen-Erzeugerproben keine Übereinstimmung.

Vor dem Hintergrund der Differenzierung und der Klassifizierung der Proben gemäß der unterschiedlichen N-Düngung und der unterschiedlichen Anbauverfahren ergibt sich ein unterschiedliches Bild. Die Proben des DOK-Versuchs können auf der Grundlage des mittels HPLC-Analytik gemessenen Luteingehaltes sowohl richtig differenziert als auch klassifiziert werden. Eine richtige Differenzierung und Klassifizierung gemäß der Düngung im gleichen Probenmaterial kann mittels photometrischer Messungen des Gesamtcarotinoidgehaltes dagegen nicht erreicht werden. Zwar können die Proben der ungedüngten Variante von allen anderen Proben unterschieden werden, eine Unterscheidung der gedüngten Varianten in mineralisch bzw. organisch gedüngte Proben kann jedoch nicht vorgenommen werden.

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich beim Übergang auf Weizen-Erzeugerproben mit Betriebspaaren unterschiedlicher Sorten von unterschiedlichen Standorten aus jeweils ökologischem und konventionellem Anbau. Anhand der Unterschiede im Luteingehalt und im Gehalt der Gesamtcarotinoide können die Proben der einzelnen Paare nicht in allen Betriebspaaren durchgängig unterschieden werden. Durch die Anwendung geeigneter statistischer Auswertungsverfahren zur Klassifizierung werden die Proben (> 90 %) richtig nach dem Anbausystem gruppiert. Beide Methoden erbringen trotz der geringen rechnerischen Korrelation der Messergebnisse die gleiche Trennleistung.

In Bezug auf das vorliegende Probenmaterial ist die Methode teilweise geeignet. In weiteren Untersuchungen müsste überprüft werden, ob sich die Trennleistung des Verfahrens durch die Kombination unterschiedlicher Messparametern steigern ließe. In diesem

Zusammenhang käme auch eine veränderte Art der Extraktion der Carotinoide, wie sie für die Messungen im Jahr 2005 durchgeführt wurde, in Betracht.

5.3 Carotinoide in Mais

Mit den Messungen wurden Carotinoide in Maisproben mit unterschiedlicher N-Versorgung aus dem DOK-Versuch gemessen. Für das verwendete HPLC-Verfahren zur Untersuchung der quantitativ wichtigsten Inhaltsstoffe in Mais zeigen sich die Messungen im natürlichen Konzentrationsbereich der identifizierten Inhaltsstoffe als linear, spezifisch, präzise und richtig. Im Punkt der Robustheit wurden die Einflüsse durch die Säulentemperatur und das Säulenmaterial ermittelt. Durch das Arbeiten nach gleich bleibenden Bedingungen können diese Einflüsse umgangen werden. Gegenüber einem Wechsel der Chargen der Chemikalien zur Extraktion und als mobile Phase ist die Methode robust.

In der Anwendung der HPLC-Methodik wurden die Xanthophylle Lutein und Zeaxanthin als die Hauptkomponenten aus der Klasse der Carotinoide in Mais identifiziert. Daneben wurden in den Proben noch weitere, nicht identifizierte Substanzen gefunden. Bezogen auf die gesamte gemessene Peakfläche beträgt der Anteil von Lutein und Zeaxanthin zwischen 72,09 % und 74,92 %, entsprechend einem Gesamtmittelwert von 73,39 %. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen von MOROS ET AL. (2002) und RODRIGUEZ-AMAYA ET AL. (2004) überein, in denen ebenfalls Lutein und Zeaxanthin den Hauptanteil der Carotinoide ausmachen. Daneben werden an dieser Stelle noch die Substanzen β -Cryptoxanthin und β -Carotin beschrieben, die in den vorliegenden Untersuchungen nicht identifiziert werden konnten. An dieser Stelle muss jedoch beachtet werden, dass eine sichere Identifizierung von Carotinoiden nur über den strukturellen Nachweis – beispielsweise mittels HPLC-MS Kopplung - geführt werden kann. Hinsichtlich der Konzentrationen liegen Lutein, mit Werten zwischen 19,21 $\mu\text{g/g}$ und 24,46 $\mu\text{g/g}$, und Zeaxanthin mit Werten zwischen 13,92 $\mu\text{g/g}$ und 15,99 $\mu\text{g/g}$ im oberen Bereich der beschriebenen Literaturwerte, wobei auf die starke Sortenabhängigkeit im Gehalt der Xanthophylle schon im Kapitel 2.3.1.7 hingewiesen wurde. Zwischen

den unterschiedlichen Anbauvarianten zeigen sich in der vorliegenden Arbeit signifikante Unterschiede im Gehalt einzelner Inhaltsstoffe. In den Messergebnissen für den Lutein- und Zeaxanthingehalt kann zwischen den unterschiedlichen Gesamtproben hohe Übereinstimmung ermittelt werden. Demnach haben die Proben aus Anbau mit konventioneller Düngung den jeweils höchsten Gehalt, die Proben aus ungedüngtem Anbauverfahren den jeweils niedrigsten Gehalt. Die unterschiedliche Düngung wirkt sich jedoch nicht auf alle Inhaltsstoffe in gleicher Weise aus. In den Proben mit konventioneller Düngung (P) können zwar die höchsten Anteile des Peaks Nr. 2 gemessen werden, die Proben aus Anbau mit konventionell-mineralischer Düngung weisen dagegen den geringsten Gehalt auf.

Im Hinblick auf die Gesamtfrage der Trennung von unterschiedlich gedüngten Varianten bei Mais anhand des vorliegenden Probenmaterials und in ihren Verfahrensschritten konnte die Methode erfolgreich validiert werden, wobei die Frage der Probennahme (Bulkproben- vs. Feldwiederholungen) bei weitergehenden Untersuchungen unbedingt beachtet werden muss.

Mit der Methode wurde Mais mit unterschiedlicher Düngung aus dem DOK-Versuch vom FiBL (MÄDER ET AL., 2002) an codiert untersuchten Maisproben richtig differenziert und gruppiert. In Bezug auf die Validierungsfragen der vorliegenden Arbeiten erscheint die Methode deshalb geeignet.

Ob sich die Ergebnisse in weiteren Jahren bestätigen lassen, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden, da es sich bei den Carotinoiden um eine Klasse von Verbindungen handelt, deren Abhängigkeit von exogenen Faktoren (Klima, Sonneneinstrahlung) bekannt ist (MERCADANTE, 1991; KIMURA ET AL., 2003; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004). In weiteren Versuchen sollte ebenfalls geklärt werden, ob eine Differenzierung und Klassifizierung über mehrere Jahre hinweg mit den gleichen Inhaltsstoffen realisiert werden kann. In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine Differenzierung und Klassifizierung mit den quantitativ bedeutendsten Inhaltsstoffen in Mais, dem Lutein und dem Zeaxanthin durchgeführt werden. Ob diese Substanzen in Mais in charakteristischer Weise mit bestimmten Anbaumaßnahmen korreliert sind, kann aus der derzeitigen Literatur nicht beantwortet werden. Diese Frage könnte nur auf der Grundlage über mehrere Jahre durchgeführter Versuche beantwortet werden. Gleiches gilt für den

Übergang auf verschiedene Sorten, gegebenenfalls auch von verschiedenen Standorten. Veränderungen, die durch Sorte und Standort auftreten, müssten erhoben und systematisiert werden.

Neben den beiden genannten Hauptkomponenten Lutein und Zeaxanthin enthalten alle untersuchten Proben noch zusätzliche Inhaltsstoffe, die mit den für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung stehenden Mitteln nicht identifiziert werden konnten. Aufgrund des Extraktionsverhaltens und der UV-Spektren kann jedoch vermutet werden, dass es sich bei diesen Substanzen ebenfalls um Carotinoide bzw. Carotinoidisomere handelt. In Hinblick auf eine mögliche Änderung der Diskriminanten zur Klassifizierung über mehrere Jahre wäre eine vollständige Identifizierung aller Substanzen wünschenswert. Durch die Kombination der Messparameter erscheint die Weiterentwicklung für die Probenmatrix Mais auch im Hinblick auf unterschiedliche Standorte und die Fragestellung verschiedener Anbausysteme möglich.

5.4 Carotinoide in Möhren

In den vorliegenden Untersuchungen wurden Methoden zur Messung frei vorliegender Carotinoide in gefriergetrockneten Möhren mit Messungen mittels HPLC-Analytik und als photometrische Messungen angewendet. Beide Methoden konnten erfolgreich hinsichtlich der Methodenparameter Linearität, Spezifität, Präzision und Robustheit überprüft werden. Die Methodenpräzision beider Methoden ist ausreichend, um Unterschiede im Carotinoidgehalt verschiedener Proben mit der entsprechenden Präzision erfassen zu können.

Durch die Messungen mit der HPLC-Methode konnten die qualitativ und quantitativ bedeutendsten Inhaltsstoffe aus der Klasse der Carotinoide in Möhren nachgewiesen werden. Für alle mittels HPLC-Analytik detektierten Substanzen können durch den Vergleich der UV-Spektren in Verbindung mit den Retentionszeiten starke Hinweise auf deren Identität als Lutein, α -Carotin und β -Carotin gewonnen werden. Über Kalibriergeraden mit Standardlösungen wurde der Gehalt jeder dieser Substanzen in den Proben quantifiziert.

Der Gehalt der einzelnen Komponenten in den vorliegenden Untersuchungen variiert mit Werten zwischen 17,79 und 32,87 $\mu\text{g/g TM}$ für Lutein, zwischen 187,01 und 354,86 $\mu\text{g/g TM}$ für α -Carotin und zwischen 434,86 und 881,64 $\mu\text{g/g TM}$ für β -Carotin in einem weiten Bereich. Lutein, α -Carotin und β -Carotin werden auch von verschiedenen Autoren (FRITZ ET AL., 1977; BAJAJ ET AL., 1980; EVERS, 1989; HEINONEN ET AL., 1989, 1990; MÜLLER, 1997) als die Hauptbestandteile aus der Klasse der Carotinoide in Möhren genannt. Ein Vergleich der für die vorliegende Arbeit gemessenen Werte mit Literaturwerten fällt vor dem Hintergrund der großen Variabilität des Carotinoidgehaltes jedoch schwer.

Im selben Projekt der vorliegenden Messungen (KAHL ET AL., 2007) wurde der Carotinoidgehalt in Möhren gleicher Herkunft im Labor der BFE (Karlsruhe) gemessen. Auch in diesen Messungen werden die Substanzen Lutein, α -Carotin und β -Carotin als Bestandteile der Klasse der Carotinoide in den untersuchten Proben bestimmt. Der Gehalt der einzelnen Substanzen liegt mit Werten zwischen 21,43 $\mu\text{g/g TM}$ und 42,47 $\mu\text{g/g TM}$ für Lutein, zwischen 268,87 $\mu\text{g/g TM}$ und 526,96 $\mu\text{g/g TM}$ und zwischen 651,76 $\mu\text{g/g TM}$ und 1024,92 $\mu\text{g/g TM}$ in einem den eigenen Werten entsprechenden Bereich. Eine starke Korrelation zwischen den Messergebnissen der beiden Methoden ist jedoch sowohl in Möhren-Erzeugerproben als auch für die UniK-Möhren für keine der gemessenen Substanzen zu ermitteln. Ursachen hierfür können in der Probenaufbereitung, der Messung oder im Probenmaterial selber liegen. Als Metabolite des Sekundärstoffwechsels in Pflanzen sind die Carotinoide durch eine Reihe endogener und exogener Faktoren variierbar. So werden von HEINONEN ET AL. (1989) Sortenunterschiede in der Carotinoidzusammensetzung von Möhren festgestellt. Schon innerhalb derselben Sorten kann der Carotinoidgehalt durch das Zusammenspiel der Faktoren Temperatur, Niederschlag, Pflanzenabstand und Vegetationszeit variieren (SCHUPHAN, 1976). Dazu kommt der Einfluss durch die untersuchte Probe selbst. Große und dicke Möhrenwurzeln enthalten derselben Quelle zufolge mehr β -Carotin als kleine und dünne Wurzeln. Für den Carotinoidgehalt in Möhren kann deshalb angenommen werden, dass Schwankungen der einzelnen Möhren untereinander, sowie in der einzelnen Möhre in unterschiedlichen Pflanzenteilen vorliegen. Daher muss für die Messungen eine möglichst homogene Mischprobe erzeugt werden, um Schwankungen in verschiedenen Prüfverfahren von schwankenden

Gehalten in den Proben differenzieren zu können. Werden Messungen an verschiedenen einzelnen Prüflingen (z. B. verschiedenen Einzelmöhren) oder verschiedenen Pflanzenteilen (z.B. oberer Teil oder unterer Teil) vorgenommen, können sich mögliche Inhomogenitäten des Analytgehaltes mit den zu ermittelnden Messwertschwankungen überlagern und deren exakte Bestimmung dadurch verhindern.

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit können Ergebnisse von Studien, in denen teilweise ein erhöhter Carotinoidgehalt in ökologisch erzeugten Möhren gegenüber konventionell erzeugten Möhren ausgewiesen wird (LECLERC ET AL., 1991; MERCADANTE ET AL., 1991) nicht wiederholt werden. Signifikant höhere Carotinoidgehalte in ökologisch erzeugten Möhren gegenüber konventionell erzeugten können nur in einzelnen Proben ermittelt werden. Auch ein Zusammenhang mit dem N-Gehalt der Möhren kann nicht festgestellt werden. Der innerhalb desselben Projektes gemessene N-Gehalt zeigt keine starken Zusammenhänge mit dem Carotinoidgehalt (KAHL ET AL., 2007).

Der mittels photometrischer Messungen ermittelte Gesamtcarotinoidgehalt liegt in den vorliegenden Untersuchungen in einem Bereich zwischen 939,96 μg β -Carotin/g TM und 1413,18 μg β -Carotin/g TM. Der prozentuale Anteil des berechneten Carotinoidgehaltes am gemessenen Gesamtcarotinoidgehalt in den Möhren beträgt damit zwischen 63,32 % - 88,23 %. Die photometrische Bestimmung und Berechnung unter Verwendung der Absorptionskoeffizienten von β -Carotin in unbekanntem Proben ist auch von der Zusammensetzung der Carotinoidefraktion mit Substanzen unterschiedlicher UV-Maxima abhängig. Diese Messwerte stellen damit nur eine Schätzung der Gesamtkonzentration an Carotinoiden einer Lösung unbekannter Zusammensetzung dar. An dieser Stelle sollte daher den mittels HPLC-Analytik gemessenen Werten der Vorzug gegeben werden.

Für die Differenzierung und Klassifizierung wurden mit den UniK-Möhren und den Erzeugerproben zwei unterschiedliche Probenensembles untersucht. Da es sich bei den UniK-Möhren um Möhren zweier Sorten in jeweils zwei Düngungsvarianten vom gleichen Standort handelt, können weitere Einflussgrößen auf den Carotinoidgehalt, wie beispielsweise klimatische Bedingungen oder Herbizidanwendungen, weitgehend ausgeschlossen werden. Differenzierungsmöglichkeiten ergeben sich somit hinsichtlich der Sorten und der Düngungsvarianten. In diesen Möhren können in allen Proben verschie-

dene Sorten signifikant differenziert werden, eine Differenzierung zwischen den Anbauvarianten kann dagegen nicht erreicht werden. Alle Carotinoide zeigen dabei ein gleichartiges Trennungverhalten. Durch den Gehalt der Gesamtcarotinoide können Düngungsvarianten signifikant getrennt werden, eine Trennung zwischen den unterschiedlichen Sorten ist nur in den ungedüngten Varianten möglich.

Für die Klassifizierung der verschiedenen decodierten Proben wurde das CART-Verfahren erfolgreich angewendet. Eine Trennung der Proben in unterschiedliche Gruppen erfolgt auf der Basis der Messwerte für Lutein. Der Sorteneinfluss hat an dieser Stelle den größeren Einfluss auf die Klassifizierung. Eine Trennung der Düngungsvarianten kann erst in einem zweiten Schritt erfolgen. Das Verfahren ist in diesen Proben nur teilweise für die Differenzierung und Klassifizierung geeignet. Dabei muss in weiteren Untersuchungen ebenfalls die Frage der Probenahme entsprechend berücksichtigt werden, um eindeutige Beziehungen zwischen Anbauprozess und Ausprägung bei den Carotinoiden herstellen zu können

Beim Übergang auf die Erzeugerproben ergeben sich nur in einzelnen Proben signifikante Unterschiede. Bei diesen Proben handelt es sich um Möhren weiterer Sorten von verschiedenen Standorten. Unterschiede zwischen den Möhren durch unterschiedliche Standortfaktoren oder Einflüsse aus der landwirtschaftlichen Praxis können deshalb nicht ausgeschlossen werden. Als Differenzierungsparameter kommen damit neben dem Anbau und den Sorten noch Standortfaktoren in Frage.

Mit allen Carotinoiden können in den Proben einzelne Proben nach den Düngungsvarianten oder nach Sorten differenziert werden. Eine Differenzierung von Proben aus dem gleichen Anbausystem und von Proben gleicher Sorten ist ebenso möglich. Im Gegensatz zu den Messungen in UniK-Möhren zeigt sich das Trennungverhalten auf der Basis jeder Einzelsubstanz unterschiedlich. Durch den Gesamtcarotinoidgehalt, der keinen rechnerischen Zusammenhang mit den HPLC-Daten hat, können ebenso einige Proben auf der Basis der Sortenzugehörigkeit oder des unterschiedlichen Anbausystems differenziert werden. Eine konsistente Differenzierung aller Proben ist auch auf dieser Grundlage nicht möglich. Durch die Verwendung des CART-Verfahrens können die decodierten Proben auf der Grundlage der einzelnen Carotinoide richtig gemäß dem Anbausystem klassifiziert werden (97 %). Im Gegensatz zu den UniK-Möhren wird die Klassifizierung nicht auf der Grundlage des Luteins,

Klassifizierung nicht auf der Grundlage des Luteins, sondern mit β -Carotin erreicht. Erst in einem zweiten Trennungsschritt, der im Vergleich zum ersten Split wenige Änderungen ergibt, vollzieht sich die Trennung auf der Grundlage von Lutein. Eine Klassifizierung nach Proben richtet sich weder nach den Sorten oder dem Anbausystem. Eine Klassifizierung durch die Gesamtcarotinoide ergibt trotz des nicht gegebenen rechnerischen Zusammenhangs beider Messparameter das gleiche Bild.

Im Hinblick auf die Validierungsfragen konnten für die Erzeugerproben beide Verfahren erfolgreich validiert werden.

5.5 Polyphenole in Möhren

Für die Bestimmung der phenolischen Inhaltsstoffe in Möhrenproben wurden bekannte Methoden (TREUTTER, 1988) (weiter)entwickelt und angewandt. Zur Validierung des HPLC-Verfahrens wurden nicht nur die Methodenparameter Linearität, Spezifität, Präzision und Robustheit, sondern auch wichtige Einflussgrößen auf die Messungen bestimmt. Mit dem verwendeten Verfahren können im natürlichen Konzentrationsbereich wichtiger phenolischer Säuren präzise Messungen durchgeführt werden. Alle Messungen liegen im linearen Bereich der Datenaufnahme des Messgerätes. Die Methodik erweist sich als spezifisch und richtig. Im Punkt der Robustheit zeigt sich die Methode gegenüber einem Wechsel der Chargen der Chemikalien zur Extraktion und als mobile Phase unempfindlich.

Bei der Anwendung der Methoden an codierten Möhrenproben können einzelne phenolische Säuren und deren Derivate nachgewiesen und mit Hilfe von Standardsubstanzen über den Retentionszeitenvergleich und den Vergleich der UV-Spektren identifiziert werden. Die Hauptkomponenten aus der Klasse der Polyphenole in diesen Messungen sind Chlorogensäure und p-Hydroxybenzoesäure. Daneben kann ein Chlorogensäurederivat mittels Dünnschichtchromatographie identifiziert werden. Während Chlorogensäure und p-Hydroxybenzoesäure in allen untersuchten Proben der Messungen aus den Jahren 2003 und 2004 nachzuweisen sind, können Chlorogensäurederivate nur in einzelnen Proben nachgewiesen werden. Neben den identifizierten Substanzen können in den

Messungen der verschiedenen Jahre noch eine Reihe weiterer nicht identifizierter Substanzen detektiert werden, die nicht in allen Proben gleich zu erfassen waren. Ob diese Beobachtungen als sortenspezifische Charakteristika zu bewerten sind oder von anderen Faktoren wie Standort, Reifezustand oder dem Anbausystem abhängen, konnte mit den vorliegenden Messungen nicht geklärt werden.

Chlorogensäure und p-Hydroxybenzoesäure sind aus der Literatur als Bestandteile von Möhren bekannt (TALCOTT ET AL., 1999; ALASALVAR ET AL., 2001). In den vorliegenden Untersuchungen zeigt sich, dass der Gehalt dieser Substanzen jedoch in weiten Grenzen variieren kann und die Bewertung dieser Werte vor dem Hintergrund von Literaturwerten schwer fällt. Dies umso mehr, als es sich bei den phenolischen Säuren um ubiquitär vorkommende, nicht für Möhren charakteristische Substanzen handelt. Die Konzentrationen in den untersuchten Proben liegen für den p-Hydroxybenzoesäuregehalt in einem Bereich zwischen 40,78 µg/g TM und 199,55 µg/g TM und für den Chlorogensäuregehalt zwischen 526,80 µg/g TM und 1845,29 µg/g TM, wobei eine Abhängigkeit vom Anbausystem oder der N-Düngung aus den erhobenen Werten nicht abgeleitet werden kann. Die Ergebnisse früherer Literaturstellen, in denen ein bis zu 50 % höherer Gehalt an bioaktiven sekundären Pflanzenstoffen in ökologisch erzeugtem Obst und Gemüse gegenüber konventionellen Produkten erwartet wird (BRANDT ET AL., 2001; REN ET AL., 2001) können nicht bestätigt werden. In Möhren der Sorte 'Rodelika' (UniK-Möhren) können bezüglich der Chlorogensäure keine signifikanten Unterschiede zwischen ungedüngten und mit 150 kg/ha Hornmehl gedüngten Anbauvarianten nachgewiesen werden. In der zweiten untersuchten Sorte ('Rothild') liegt der Chlorogensäuregehalt der ungedüngten Möhrenproben signifikant unter dem der gedüngten Gegenprobe. Für den p-Hydroxybenzoesäuregehalt können in diesen Proben signifikante Unterschiede zwischen allen Proben ermittelt werden. Der Gehalt der ungedüngten Varianten liegt in beiden Sorten über dem der gedüngten. In den Möhren aus unterschiedlichem Anbau (Erzeugerproben) können hinsichtlich der Inhaltsstoffe Chlorogensäure und Hydroxybenzoesäure nur in einigen Betriebspaaren signifikante Unterschiede gemessen werden. Der Gehalt der Chlorogensäure liegt in diesen Fällen unter dem der konventionell erzeugten Gegenproben, der p-Hydroxybenzoesäuregehalt zeigt keine Abhängigkeiten vom Anbausystem.

Für die Differenzierung und Klassifizierung standen mit den FiBL-Möhren, den UniK-Möhren und den Möhren-Erzeugerproben drei unterschiedliche Probenensembles zur Verfügung. Entsprechend der Herkunft des Probenmaterials ergeben sich Unterscheidungs- und Klassifizierungsmöglichkeiten nach unterschiedlicher N-Versorgung, unterschiedlichem Anbausystem und unterschiedlichen Sorten. In allen Proben können statistisch signifikante Unterschiede auf der Basis von Einzelkomponenten ermittelt werden, wobei die Trennleistung von den jeweiligen Komponenten abhängt.

In einer Versuchsreihe mit Möhren verschiedener Sorten (FiBL-Möhren 2002 und 2003) können anhand einzelner Peaks signifikante Unterschiede zwischen den Proben festgestellt werden. Eine Auswertung mittels LDA in beiden Jahren ergibt eine Gruppierung der Möhren auf der Sortenebene. Eine durchgängige Differenzierung samenfester Sorten und Hybridsorten können die verwendeten Messparameter dagegen nicht leisten.

In Möhren aus Anbau mit unterschiedlicher N-Düngung (UniK-Möhren) können anhand einzelner Peaks signifikante Unterschiede festgestellt werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Düngungsvarianten konnten für die Chlorogensäure nur in einem Jahr (2003) ermittelt werden. Auf der Grundlage des p-Hydroxybenzoesäuregehaltes können die Düngungsvarianten in beiden Jahren signifikant differenziert werden. Nach der Erweiterung des Versuches um eine Sorte werden anhand einzelner Peaks sowohl Sorten als auch Düngungsvarianten signifikant differenziert.

Eine Gruppierung der Proben ergibt sich weder nach den Düngungsvarianten, noch nach den Sorten. Eine Klassifizierung der Proben nach der N-Düngung ist auf der Grundlage der Messparameter nicht zu erzielen.

In Möhren-Erzeugerproben können hinsichtlich der quantitativ bedeutendsten Inhaltsstoffe in einigen Probenpaaren signifikant differenziert werden, eine durchgängige Differenzierung für alle Sorten und für alle Betriebspaare ist auf der Basis keiner der Einzelsubstanzen zu erzielen. Erst eine Auswertung mittels CART-Verfahren nach der Decodierung klassifiziert die Proben auf der Basis des (nicht identifizierten) Peaks Nr. 11b korrekt (97 %) hinsichtlich des Anbausystems. Eine mit den gleichen Messwerten vor der Decodierung berechnete LDA ergibt eine Gruppierung auf der Ebene der Gesamtproben. Neben dem Einfluss durch das Anbausystem scheint an dieser Stelle demnach

auch der Standort eine Rolle zu spielen. Das Verfahren ist damit zur Differenzierung und Klassifizierung zumindest teilweise geeignet.

In der zusammenfassenden Betrachtung der Ergebnisse über die Jahre kann eine unterschiedliche Zusammensetzung der Möhren festgestellt werden. In den Möhrenproben aus den Messungen der Jahre 2003 und 2004 können die phenolischen Säuren p-Hydroxybenzoesäure und Chlorogensäure als Hauptkomponenten ausgemacht werden. Neben diesen identifizierten Komponenten wird eine Reihe weiterer Substanzen mit der HPLC als Peaks detektiert. Als größtes Problem der Polyphenolanalytik stellte sich dabei das Fehlen geeigneter Referenzstandards für die Identifizierung heraus. Die Zugehörigkeit dieser Substanzen zur Klasse der Polyphenole kann lediglich aus der Art der Extraktion und der Darstellung unter den gegebenen HPLC-Bedingungen angenommen werden. Eine wünschenswerte Erweiterung des Verfahrens bestünde in der vollständigen Identifizierung der detektierten Komponenten.

Während Chlorogensäure und Hydroxybenzoesäure in allen Proben in wechselnden Konzentrationen darzustellen sind, variiert das (Nicht-)Auftreten der nicht identifizierten Inhaltsstoffe stärker und ist somit vermutlich näher an die unmittelbaren Umweltbedingungen einer Pflanze gekoppelt. Darüber hinaus wäre zu überprüfen, ob das Auftreten eines bestimmten Polyphenolmusters das Ergebnis einer bestimmten Wachstumsphase und somit eine zeitabhängige Größe ist.

5.6 Fazit

Die Qualität ökologisch erzeugter Lebensmittel ist eine Größe, die über den Prozess der Erzeugung, nicht aber am Produkt selbst bestimmt wird. In verschiedenen Studien wird festgestellt, dass für einen bedeutenden Teil der Käufer ökologischer Produkte die erwartete höhere ernährungsphysiologische Qualität einen Grund zum Kauf dieser Produkte darstellt (Kap. 2.2.2). Dabei zielen die Erwartungen nicht alleine auf die geringere Belastung mit unerwünschten Stoffen, sondern auch auf einen höheren Gehalt gesundheitsfördernder Inhaltsstoffe ab. Solche Wert gebenden Inhaltsstoffe in pflanzlichen Lebensmitteln sind die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe aufgrund ihrer potentiell gesund-

heitsfördernden Eigenschaften (WATZL ET AL., 1999). In mehreren Studien wird ein Zusammenhang zwischen einer hohen Zufuhr sekundärer Pflanzenstoffe wie Carotinoiden und Polyphenolen mit einem signifikant verringerten Risiko an Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs zu erkranken beschrieben (HERTOG ET AL., 1994; 1995, 1997; HEINONEN ET AL., 1996; KLIPSTEIN-GROBUSCH ET AL., 2000; KNEKT ET AL., 2002).

Nach verschiedenen Autoren (BRANDT ET AL., 2001; REN ET AL., 2001) sollen sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in ökologisch erzeugten Produkten in signifikant höherem Umfang vorkommen als in konventionell erzeugten Produkten. Solche Erwartungen werden mit einer geringeren Stickstoffdüngung/-verfügbarkeit, günstigerer Ausreifung und kürzerer Reifedauer unter den Bedingungen des Öko-Landbaus begründet (TAUSCHER ET AL., 2003).

In der Zusammenschau der eigenen Messungen können solche Ergebnisse weder für die Carotinoide noch für die phenolischen Bestandteile konsistent in allen Proben bestätigt werden. Am Beispiel des Luteins wird deutlich, dass eine Bestimmung einzelner Inhaltsstoffe eng mit dem jeweiligen Produkt verbunden ist. Lutein kann sowohl in Möhren als auch in Weizen und Mais als Inhaltsstoff identifiziert und quantifiziert werden. Der Zusammenhang des Luteingehaltes mit der N-Düngung ist dabei in allen Produkten ein jeweils anderer. In Weizen DOK-Proben haben ungedüngte und organisch gedüngte Varianten einen signifikant höheren Luteingehalt als mineralisch gedüngte Varianten. Eine Korrelation mit dem im selben Projekt gemessenen N-Gehalt zeigt eine stark negative Korrelation (KAHL ET AL., 2007). Dieser Zusammenhang lässt sich in umgekehrter Form auch in den Maisproben aus dem gleichen Anbauversuch finden. Mineralisch gedüngte Anbauvarianten haben einen signifikant höheren Luteingehalt als ungedüngte oder organisch gedüngte Anbauvarianten. Ein kausaler Zusammenhang könnte in der Zugehörigkeit von Mais zu den C4-Pflanzen zu suchen sein. Eine grundsätzlich andere Reaktion der Carotinoidsynthese von C4-Pflanzen auf N-Düngung ist aus der bekannten Literatur nicht eindeutig abzuleiten. In Möhren wiederum können bei Einsatz von N-Düngung keine konsistenten Unterschiede in den Proben festgestellt werden. Auf der Grundlage des Luteins kann in UniK-Möhren kein signifikanter Unterschied zwischen ungedüngten und mit organischem N-Dünger gedüngten Anbauvarianten nachgewiesen werden. Ein gleichsinniger Einfluss der N-Düngung auf unterschiedliche Produkte kann

somit nicht bestätigt werden. In Möhren-Erzeugerproben können Betriebspaare aus ökologischem und konventionellem Anbau auf der Basis des Luteingehaltes nur in einzelnen Fällen differenziert werden. In diesen Proben bestanden neben den Unterschieden in der N-Versorgung jedoch noch weitere Unterschiede hinsichtlich der Sorten und der Standorte. Bei den Polyphenolen, die in Möhren verschiedener Probenensembles über mehrere Jahre untersucht wurden, zeigen sich darüber hinaus Unterschiede in der stofflichen Zusammensetzung und den Parametern für die anschließende Differenzierung. Aufgrund dieser Beobachtungen und aus Auswertungen mittels LDA kann angenommen werden, dass neben dem Sorteneinfluss und dem Einfluss der N-Düngung weitere Faktoren für den Polyphenolgehalt und das Polyphenolmuster verantwortlich sind.

Mit den verwendeten Methoden wurden Carotinoide und Polyphenole aus der Klasse der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe in codierten Proben gemessen. Die Proben können statistisch signifikant auf der Basis von Einzelkomponenten unterschieden werden, wobei die Trennleistung von den jeweiligen Komponenten abhängt. Im direkten Paarvergleich kann beurteilt werden, ob sich diese Proben signifikant differenzieren lassen und welche Probe den höheren Gehalt eines jeweiligen Inhaltsstoffes besitzt. Eine weitergehende Aussage, ob es sich um eine ökologisch oder konventionell erzeugte Probe handelte, kann alleine aufgrund dieser Unterscheidung vor der Decodierung jedoch nicht getroffen werden.

Insgesamt wird deutlich, dass die Differenzierung und Klassifizierung von Produkten aus unterschiedlichem Anbau auf der Basis von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen viel versprechend ist. Durch die vielfältigen Einflussfaktoren ist die Untersuchung weiterer definierter Proben unter Einbeziehung weiterer Einflussgrößen notwendig. Die Klassifizierung durch ein rein datengestütztes Modell erfolgte aufgrund der fehlenden Datenbasis für eine prospektive Klassifizierung erst nach der Decodierung der Proben. Ob sich die vorliegenden Ergebnisse in weiteren Folgejahren wiederholen lassen, müsste in weiterführenden Untersuchungen über mehrere Jahre geprüft werden. Alleine aus den Beobachtungen zum Lutein- und zum Polyphenolgehalt erscheint es nicht möglich, ein allgemeingültiges, prospektives Klassifizierungsmodell zu finden. Vielmehr müssten in weiteren Messungen kausale Schlüsse zum produkt- und sortenspezifischen Verhalten in Bezug auf Standortfaktoren in langfristigen Messungen weiterer Probensätze syste-

matisiert werden. Bei der Faktorenprüfung im Feldversuch sollten dabei durchgängig Feldwiederholungen gemessen und bei Erzeugerproben auch die Probenahme validiert werden. In diesem Zusammenhang sollte geprüft werden welchen Einfluss die unterschiedlichen Richtlinien im Ökolandbau (z. B. EU-Bio, Anbauverbände) auf die Produktqualität haben und ob die beschriebenen Methoden auch für eine Qualitätsbeurteilung im Sinne der Optimierung der Produktqualität unabhängig von der Anbauweise eingesetzt werden können.

Vor dem Hintergrund der beschriebenen unterschiedlichen Messergebnisse der Carotinoidbestimmungen in Möhren und Weizen in unterschiedlichen Laboren ist eine weitere Überprüfung der Methoden erforderlich. In der Durchführung solcher Versuche müssten homogene Proben als Ringversuch in unterschiedlichen Laboren gemessen und ausgewertet werden.

Eine Erweiterung der Methode bestünde in der Erfassung der gebundenen Bestandteile der einzelnen Klassen. Vorversuche dieser Arbeit für die Extraktion gebundener Polyphenole durch die Extraktion mittels saurer Hydrolyse ergaben jedoch keine verwertbaren Ergebnisse. Die Analyten erweisen sich gegenüber der sauren Hydrolyse als nicht stabil. Eine Extraktion mittels alkalischer Hydrolyse wäre an dieser Stelle denkbar. Weiterhin böte sich eine Erweiterung des rein qualitativen Nachweises einzelner Inhaltsstoffe um deren funktionelle Eigenschaften - wie dem antioxidativen Potential - an. Nicht zuletzt wegen dieser Eigenschaften werden Polyphenolen und Carotinoiden positive Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit nachgesagt. Eine Erweiterung um solche Parameter könnte die ernährungsphysiologische Relevanz entsprechender Untersuchungen steigern und wäre auch vor dem Hintergrund so genannter Health-claims für Lebensmittel bedeutsam.

6 Zusammenfassung

In den vorliegenden Untersuchungen wurden der Gehalt von Carotinoiden in Weizen, Mais und Möhren sowie der Polyphenolgehalt in Möhren mit analytischen Methoden zum Nachweis dieser Substanzen gemessen. Die Messung erfolgte für die Carotinoide in Möhren und Weizen auf der Grundlage der Einzelsubstanzen mit Messungen mittels HPLC-Analytik und als photometrische Messungen als Summenparameter. Der Gehalt der Carotinoide in Mais und der Gehalt der phenolischen Bestandteile in Möhren wurde mit Messungen mittels HPLC-Analytik gemessen. Die Methoden wurden aus literaturbekannten Verfahren abgeleitet und an die Anforderungen der untersuchten Probenmatrices angepasst und validiert.

Dem Verfahren lag die Frage zugrunde, ob es möglich ist, Kulturpflanzen aus verschiedenen Anbausystemen auf der Basis des Gehaltes bestimmter sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe zu differenzieren und aufgrund von Unterschieden im Gehalt der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe zu klassifizieren. Die Gesamtverfahren wurden dabei gemäß der ISO 17025 validiert.

Für die Messungen standen Proben aus definierten Langzeitversuchen und Erzeugerproben ausgesuchter ökologisch bzw. konventionell arbeitender Anbaubetriebe aus den Projekten „Validierung ganzheitlicher Verfahren“ (020E170) sowie „Differenzierung und Klassifizierung von Öko-Produkten mittels validierter, analytischer und ganzheitlicher Methoden“ (Bundesprogramm Ökolandbau, Projekt 020E170/F) zur Verfügung.

Als Grundlage für eine valide Methodeneinschätzung wurden die Messungen an codierten Proben vorgenommen. Eine Decodierung der Proben erfolgte erst nach der Vorlage der Messergebnisse in den genannten Projekten.

Die Messung und Auswertung des Carotinoidgehaltes in Weizen, Mais und Möhren vor dem Hintergrund der Differenzierung und Klassifizierung erfolgte in Proben eines Erntejahres. Die Messung des Gehaltes phenolischer Substanzen in Möhren erfolgte in verschiedenen Probenensembles von Möhren aus 3 Erntejahren.

Die verwendeten HPLC-Verfahren konnten in Bezug auf den analytischen Teil der Messungen in den einzelnen Verfahrensschritten Linearität, Spezifität, Präzision und Robustheit erfolgreich überprüft werden. Darüber hinaus wurden wichtige Einflussgrößen auf die Messungen bestimmt. Für die Verfahren zur photometrischen Bestimmung der Gesamtcarotinoide konnte eine Grundkalibrierung der Parameter Präzision und Linearität des Verfahrens erfolgreich durchgeführt werden.

Während der Anwendung der HPLC-Methoden an codierten Proben konnten in allen untersuchten Probenmatrices quantitativ bedeutende Inhaltsstoffe nachgewiesen und identifiziert werden. Eine vollständige Identifizierung aller dargestellten Peaks konnte in den Untersuchungen der Polyphenole in Möhren und der Carotinoide in Mais nicht erfolgen.

Im Hinblick auf die Frage nach der Differenzierung und Klassifizierung ergab sich in den verschiedenen Proben ein unterschiedliches Bild. Sowohl durch den Carotinoid- als auch den Polyphenolgehalt konnten einzelne Proben statistisch signifikant differenziert werden. Die Trennleistung hing dabei sowohl von den jeweiligen Komponenten als auch von der untersuchten Probenmatrix ab. Ein durchgängig höherer Gehalt sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe in Proben aus ökologischem Anbau konnte nicht bestätigt werden. Für die Klassifizierung der Proben verschiedener Anbauvarianten und konnten multivariate statistische Methoden, wie lineare Diskriminantenanalyse (LDA) und Classification and Regression Tree (CART), erfolgreich angewandt werden. Eine Klassifizierung mit unterschiedlichen statistischen Verfahren erbrachte dabei unterschiedliche Ergebnisse.

In der Klassifizierung der decodierten Proben mittels LDA wirkten sich die Faktoren Sorte und Standort stärker auf das Klassifizierungsergebnis aus als der Faktor Anbausystem.

Eine datengestützte Klassifizierung der decodierten Proben nach dem Anbausystem wurde mit dem CART-Verfahren durchgeführt. Auf der Basis der Messwerte für die Polyphenole in Möhren wurden 97 % der Proben richtig klassifiziert. Durch die Messwerte der photometrischen Messungen des Carotinoidgehaltes und durch die Messwerte der HPLC-Analytik des Luteingehaltes in Weizen konnte der größere Teil der Proben (90 %) korrekt klassifiziert werden. Auf der Basis des Carotinoidgehaltes in Mais wurde der

Großteil der Proben (95 %) korrekt nach dem Anbausystem klassifiziert. Auf der Basis des mittels HPLC-Analytik gemessenen Carotinoidgehaltes in Möhren konnten die Proben 97 % korrekt klassifiziert werden (97 %).

Insgesamt erscheint der Grundgedanke der Klassifizierung durch den Gehalt sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe viel versprechend. Durch die vielfältigen Einflussgrößen auf den Sekundärstoffwechsel von Pflanzen müssten Veränderungen, die durch Sorte und Standort auftreten, über mehrere Jahre erhoben und systematisiert werden.

7 Summary

In this study the contents of carotenoids in wheat, corn and carrots as well as the contents of phenolic compounds in carrots was measured with analytical methods. The measurement of carotenoids in carrots and wheat on the basis of the single constituents was carried out by using HPLC analysis and as a spectrophotometric measurement as sum parameter. Analysis of carotenoid contents in corn and of phenolic compounds in carrots was carried out by means of HPLC-measurements. HPLC methods were developed and validated to detect the single constituents. The applied methods were derived from previously published methods and adapted to the requirements of the examined matrices.

The procedure was based on the question, whether it is possible to differentiate samples from various cultivation systems on the basis of the contents of certain secondary plant compounds and to classify the samples on the basis of differences in the contents of the secondary plant compounds. The whole procedure of the methods was validated in accordance with the ISO 17025.

Wheat, corn and carrot samples for the study were from controlled field trials and from the market (farms). The samples were available from the projects "Validierung ganzheitlicher Verfahren" as well as "Differenzierung und Klassifizierung von Öko-Produkten mittels validierter, analytischer und ganzheitlicher Methoden".

As a basis for a valid method assessment the measuring was taken at coded samples. A decoding of the samples was carried out only after the presentation of the measurement results in the mentioned projects.

The measurement and evaluation of the carotenoid contents in wheat, corn and carrots was carried out in samples of one harvest year. The measuring of the contents of phenolic constituents in carrots was carried out in different sample sets of carrots from 3 harvest years.

For validation of the HPLC-methods not only the method parameters linearity, selectivity and repeatability were successfully examined but also the important factors of influ-

ence were investigated. For the procedure of the spectrophotometric measurements of carotenoids in wheat and carrots a basic calibration of the parameters precision and linearity could be carried out successfully.

When the HPLC-methods were applied on coded samples several quantitatively important constituents could be detected and identified. A complete identification of all detected peaks could not be carried out in the examinations of phenolic compounds in carrots and the carotenoids in corn.

The samples could be differentiated as statistical significant, both by the contents of carotenoids and of phenolic compounds. The differentiation ability was dependant on the compound class as well as the single compound.

A generally higher content of secondary plant compounds in organically grown samples could not be confirmed.

For classification of different cultivation variants several multivariate statistical methods (e.g. discriminant analysis, classification and regression tree) were successfully applied. A classification with different statistical methods produced different results.

In the classification of the coded samples by means of LDA the factors variety and location had an effect stronger than the factor cultivation system on the classification result.

A data based classification of the decoded samples in accordance with the cultivation system was carried out with the CART method. 97% of the samples were classified correctly on the basis of phenolic compounds in carrots. With the spectrophotometric analysis of the carotenoid content and the results of the HPLC-measurement of luteine in wheat 90% of the samples could be classified correctly. 95% of the samples could correctly be classified in accordance with the cultivation system on the basis of the carotenoid contents in corn. In carrots 97% of the samples could be classified correctly on the basis of the carotenoids measured by means of HPLC analysis.

Altogether, the basic idea of differentiation and classification of samples by the contents of secondary plant compounds seems promising. Influences on the secondary metabolism of plants which appear by various differences like variety and location should be explored and systematized over several years.

8 Literaturverzeichnis

- ADOM, K. K.; SORRELLS, M. E.; LIU, R. H. (2003), Phytochemical profiles and antioxidative activity of wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 7825-7834.
- ADOM, K. K.; SORRELLS, M. E.; LIU, R. H. (2005), Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 2297-2306.
- AGARWAL, R.; WANG, Z.Y.; MUKTHAR, H. (1991), Inhibition of mouse skin tumor-Initiating activity of DMBA by chronic oral feeding of glycyrrhizin in drinking water. *Nutrition and Cancer*, 15 (3&4), pp. 187–193.
- ALASALVAR, C.; GRIGOR, J.M.; ZHANG, D.; QUANTICK, P.C.; SHAHIDI, F. (2001), Comparison of Volatiles, Phenolics, Sugars, Antioxidant Vitamins, and Sensory Quality of Different Coloured Carrot Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, pp. 1410-1416.
- ALFÖLDI, T.; GRANADO, J.; KIEFFER, E.; KRETSCHMAR, U.; MORGNER, M.; NIGGLI, U.; SCHÄDEL, A.; SPEISER, B.; WEIBEL, F.; WYSS, G.; SCHMIDT, G.; SCHMIDT, W. (2006), Qualität und Sicherheit von Bioprodukten. FiBL-Dossier 4.
- AMTSBLATT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN, ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION VOM 12.08.2002, zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen.
- ARIMA, H. K.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (1988), Carotenoid composition and vitamin A value of commercial Brazilian squashes and pumpkins. *Journal of Micronutrient Analysis*, 4, pp. 177-191.
- ASAMI, D. K.; HONG, Y-J; BARRETT, D. M.; MITCHELL, A. E. (2003), Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (5), pp. 1237-1241.

- AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA D.B. (2004), Carotenoid composition of kale as influenced by maturity, season and minimal processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85 (4), pp. 591-594.
- AZEVEDO-MELEIRO, C. H; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (2005), Carotenoids of endive and New Zealand spinach as affected by maturity, season and minimal processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, pp. 845-855.
- BABIC, I.; AMIOT, M.J.; NGUYEN-THE, C.; AUBERT, S. (1993), Changes in phenolic content in fresh ready-to-use shredded carrots during storage. *Journal of Food Science*, 58 (2), pp. 351-356.
- BAJAJ, K. L.; KAUR, G.; SUKHJA, B.S. (1980), Chemical Composition and some Plant Characteristics in Relation to quantity of some Promising Cultivars of Carrot (*Daucus carota* L.). *QUALITAS PLANTARUM - Plant Foods for Human Nutrition*, 30, pp. 97-107.
- BELITZ, H.D.; GROSCH, W. (1992), *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 4. Aufl., Springer Verlag Berlin, pp. 756-762.
- BERGENDORFF, O.; STERNER, O. (1995), Spasmolytic flavonols from *Artemisia abrotanum*. *Planta Medica*, 61, pp. 370-371.
- BEHARRELL, B. ;MAC FIE, J.H. (1991), Consumer attitudes to organic foods, *British Food Journal*, 93: pp. 25-30.
- BFE, Jahresbericht Institut für Verfahrenstechnik, Karlsruhe, 2003
- BHALLA, M.; HITKARI, A.; GUJRATI, V. R.; BHALLA, T. N.; SHANKAR, K. (1994), Benzopyran-2-one derivatives: antiinflammatory, analgesic and antiproteolytic agents. *European Journal of Medical Chemistry*, 29, pp. 713-717.
- BMELV (2005), Bundesministerium für Verbraucherschutz Ernährung und Landwirtschaft,
http://www.bmvel/m_750578/DE/04Landwirtschaft/OekologischerLandbau/_OekologischerLandbau_node.html.
- BÖHM, H.; HEMPEL, J.; RAAB, B. (1996), Flavonoide als natürliche Inhaltsstoffe mit biologischer Wirkung, Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung (DGQ), Tagungsband der XXXI. Vortragstagung, Kiel, pp. 67-80.

- BOSS, N.; JÄCKLE, R. (1994), Hexal Taschenlexikon Medizin, Urban & Schwarzenberg Verlag, München, p. 671.
- BOURN, D.; PRESCOTT J. A. (2002), Comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42 (1), pp. 1-34.
- BRANDT, K.; MOLGAARD, J.P. (2001), Organic agriculture: does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, pp. 924-931.
- BREITENBACH, J.; BRAUN, G.; STEIGER, S.; SANDMANN, G. (2001), Chromatographic performance on a C30 bonded stationary phase of monohydroxycarotenoids with a variable chain length or degree of desaturation and of lycopene isomers synthesized by various carotene desaturases. *Journal of Chromatography A*, 936, pp. 59-69.
- BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Hrsg.) (1995), Carotenoids, Volume 1A, Birkhäuser, Basel.
- BROWN, L.; RIMM, E.B.; SEDDON, J.M.; GIOVANNUCCI, E.L.; CHASAN-TABER, L.; SPIEGELMAN, D.; WILLETT, W.C.; HANKINSON, S.E. (1990), A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, pp. 517 - 524.
- BROWN, P.K.; WALD, G. (1963), Visual pigments in Human and monkey retinas. *Nature (London)*, 200, pp. 37-43.
- CARBONARO, M. ET AL. (2002), Modulation of antioxidant compounds in organic vs. conventional fruit (peach, *Prunus persica* L., and pear, *Pyrus communis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (19), pp. 5458-5462.
- CARBONARO, M.; MATTERA, M. (2001), Polyphenoloxidase activity and polyphenol levels in organically and conventionally grown peach (*Prunus persica* L., cv. *Regina bianca*) and pear (*Pyrus communis* L., cv. Williams). *Food Chemistry*, 72 (4), pp. 419-424.
- CHAPPELL, J.; HAHLBROCK, K. (1984), Transcription of genes in response to UV-light or fungal elicitor. *Nature*, 311, pp. 76-78.

- CHASSY, A. W.; MITCHELL, A. E. (2004), Organic Agriculture: Does it affect Antioxidants and Nutritional Quality? *The Soy connection*, 12, 4.
- CHEN, J. H.; HO, C. T. (1997), Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp. 2374-2378.
- CHEN, Y., F.; TSAI, H., Y.; WU, T. S. (1994), Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. *Planta Medica*, 61, pp. 2-8.
- CMA (2005), *Öko für alle? Eine strategische Zielgruppenanalyse*. CMA, Bonn.
- COHEN, J.H.; KRISTAL, A.R.; STANFORD, J.L. (2000), Fruit and vegetable intakes and prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92 (1), pp. 61-68.
- COLE, R. A. (1985), Relationship between the concentration of chlorogenic acid in carrots and the incidence of carrot fly larval damage. *Annals of Applied Biology*, 106, pp. 211-217.
- CRAFT, N.E.; WISE, S.A.; SOARES, J.H. (1992), Optimization of an isocratic high-performance liquid Chromatographie separation of carotenoids. *Journal of Chromatography*, 589, pp. 171-76.
- DAO, L.; FRIEDMANN, M. (1994), Chlorophyll, chlorogenic acid, glycoalkaloid, and protease inhibitor content of fresh and green potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (3), pp. 33-39.
- DAOOD, H. G.; NAGY-GASZTONYI, M.; VÖRÖSVÁRY, L.; HOLLY, L.; HORRVÁTH, L.; NYERGES, L. (2003), Ananalysis of carotenoids in some Hungarian maize landraces, *Hybridmais, Züchtung und Verwertung, Bericht über die 54. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, BAL Gumpenstein 25. – 27. November 2003*.
- DAVIES, A.; TITTERINGTON, A.J.; COCHRANE, C. (1995), Who buys organic food? A profile of the purchasers of organic food in Northern Ireland, *British Food Journal*, 97, pp. 17-23.
- DIERCKS, R. (1986), *Alternativen im Landbau*. 2. Aufl., Ulmer, Stuttgart, 219-220, pp. 280-291.

- DONGLIN ZHANG; YASUNORI HAMAUZU (2004), Phenolic compounds and their antioxidant properties in different tissues of carrots (*Daucus carota* L.), Food, Agriculture & Environment, 2 (1), pp. 95-100.
- DRUMM-HERREL, H. (1987), Blue light control of pigment biosynthesis – anthocyanidin, In: Senge H., Blue light responses: Phenomena and occurrence in plants and microorganisms, Vol. I, CRC Press Inc. Boca Raton, pp. 65-75.
- EDENHARDER, R.; TANG, X. (1997), Inhibition of the mutagenicity of 2-Nitrofluorene, 3-Nitrofluoranthene and 1-Nitropyrene by Flavonoids, Coumarins, Quinones and other phenolic compounds. Food and Chemical Toxicology, 35, pp. 357-372.
- ENGELHARDT, U. H.; FINGER, A.; HERZIG, B.; KUHR, S. (1992), Determination of flavonol glycosides in black tea. Deutsche Lebensmittel Rundschau; 3, pp. 69-73.
- EVERS, A.-M. (1989), Effects of different Fertilizing Practices on the Carotene Content of Carrot. Journal of Agricultural Science in Finland, pp. 7-14.
- FALBE, J.; REGITZ, M. (1985), Römpp Chemie Lexikon. 9. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- FEUCHT, W.; TREUTTER, D. (1989), Phenolische Naturstoffe. Obst- und Gartenbauverlag, München.
- FLECK, M.; VON FRAGSTEIN, P.; HEB, J. (2005), Ertrag und Zuckergehalte bei Möhren nach Applikation der biologisch-dynamischen Präparate Hornmist und Hornkiesel in verschiedenen Umwelten. Tagungsband 8. Wissenschaftstagung Ökolandbau, Kassel, pp. 89-93.
- FOOD AND NUTRITION BOARD (2000), Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. National Academy Press, Washington.
- FOTI, M.; PIATTELLI, M.; BARATA, M. T.; RUBERTO, G. (1996), Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-Activity relationship. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, pp. 497-501.
- FRITZ, D.; HABBEN J. (1977), The Quality of Different Carrot Cultivars as Affected by the Harvesting Date. Gartenbauwissenschaft, 42, pp. 185-190.

- GALENSA, R.; ENGELHARDT, U.; BAHADIR, M.; BÖHM, H. (1995), Bestimmung von Catechinen und Alkaloiden in Tee oder ähnlichen Erzeugnissen. In: Lebensmittel und Umweltanalytik mit der HPLC: Tips, Tricks und Beispiele für die Praxis. New York, pp. 125-129.
- GALENSA, R.; ENGELHARDT, U.; BAHADIR, M.; BÖHM, H. (1995), Bestimmung von Flavonolglykosiden in Tee und Teeprodukten oder ähnlichen Erzeugnissen. In: Lebensmittel und Umweltanalytik mit der HPLC: Tips, Tricks und Beispiele für die Praxis. New York, pp. 121–125.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; VASSILIOU, G.; VIZANTINOPOULOS, S. (1989), Effects of weed interference and herbicides on nitrate and carotene accumulation in lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, pp. 312-315.
- GOODWIN, T. W. (1980), Nature and distribution of carotenoids. *Food Chemistry*, 5, pp. 3-13.
- GRINDER-PEDERSEN ET AL. (2003), Effect of diets based on foods from conventional versus organic production on intake and excretion of flavonoids and markers of antioxidant defense in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 5671-5676.
- GROSS, J. (1987), *Pigments in fruits*. Academic Press, London.
- GROSS, J. (1991), *Pigments in vegetables. Chlorophylls and carotenoids*. Avi: Van Nostrand
- GÜNZLER, H. (1997), Analytik und Bedeutung von Polyphenolen in Lebensmitteln. In: *Analytiker- Taschenbuch*. Springer- Verlag, Berlin Heidelberg, 15, pp. 148–175.
- HABEGGER, R.; GRABMANN, J.; SCHNITZLER, W. H. (2005), Ein buntes Möhrensoriment – bewertet anhand der aromarelevanten sowie weiterer sekundärer Inhaltsstoffe. *Mitteilungen der Vereinigung Weihenstephaner Universitätsabsolventen*, 98, p. 11.
- Hajslova, J.; Schulzova, V.; Slanina, P.; Janne, K.; Hellenas, K. E.; Anderson, C. (2005), Quality of organically grown potatoes: four year study of micronutrients, metals, secondary metabolites, enzymatic browning and organoleptic properties. *Food Additives and Contaminants*, 22 (6), pp. 514-534.

- HÄKKINEN, S.H.; TÖRRÖNEN, A. R. (2000), Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, 33 (6), pp. 517-524.
- HAMM U, GRONEFELD F, HALPIN D. (2004), The European market for organic food: Revised and Updated Analysis. *Organic Marketing Initiatives and Rural Development (OMIaRD) series*. Vol. 5, University of Wales, Aberystwyth.
- HART, D.J.; SCOTT, K.J. (1995), Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of selected vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry*, 54, pp. 101-111.
- HEATON, S. (2001), *Organic farming, food quality and human health. A review of evidence*. Soil association, Bristol, Great Britain.
- HEINONEN, M. (1990), Carotenoids and Provitamin A Activity of Carrot (*Daucus carota* L.) Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, pp. 609-612.
- HEINONEN, M. I.; OLLILAINEN, V.; LINKOLA, E.K.; VARO, P.T.; KOIVISTOINEN, P. E. (1989), Carotenoids in Finnish foods: Vegetables, fruits and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, pp. 655-659.
- HEINONEN, O.P.; ALBANES, D. (1994), Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on cancer incidence in the Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *New England Journal of Medicine*, 330 (15), pp. 1029-1035.
- HELDT, H. W. (1996), aus: *Pflanzenbiochemie*. 1. Aufl., Spektrum, Heidelberg.
- HENTSCHEL, V.; KRANL, K.; HOLLMANN, J.; LINDHAUER, M. G.; BÖHM, V.; BITSCH, R. (2002), Spectrophotometric Determination of Yellow Pigment Content and Evaluation of Carotenoids by High-Performance Liquid Chromatography in Durum Wheat Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp. 6663-6668.
- HERRMANN, K. (1990), Vorkommen und Gehalte der Flavonoide in Obst I. Catechine und Proanthocyanidine. *Erwerbsobstbau* 32, pp. 4-7.

- HERRMANN, K. (1999), Gesundheitliche Bedeutung von antioxidativen Flavonoiden und Hydroxyzimtsäure im Obst und in Fruchtsäften. *Flüssiges Obst*, 10, pp. 566–570.
- HUANG, A. S.; TANUDJAJA, L.; LUM, D. (1999), Content of alpha-, beta-carotene, and dietary fiber in 18 sweetpotato varieties grown in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12, pp. 147-151.
- HUCK, C.W.; POPP, M.; SCHERZ, H.; BONN, G. K. (2000), Development and evaluation of a new method for the determination of the carotenoid content in selected vegetables by HPLC and HPLC-MS/MS. *Journal of Chromatographic Science*, 38 (10), pp. 441- 449.
- HUMPHRIES, J. M.; KHACHIK, F. (2003), Distribution of lutein and zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat, and pasta products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 51, 5, pp. 1322-1327.
- ISO/IEC 17025, (2000), General Requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO, Geneva.
- JEANDET, P.; BESSIS, R.; SBAGHI, M.; MEUNIER, P.; TROLLAT, P. (1995), Resveratrol content of Wines of different ages: Relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, pp. 1-4.
- K'OSAMBO, L.M.; CAREY, E.E.; MISRA, A.K.; WILKES ,J.; HAGENIMANA ,V. (1998), Influence of age, farming site and boiling on pro-vitamin A content in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) storage roots. *Journal of Food Composition and Analysis*, 11, pp. 305-321.
- KAHL, J.; BUSSCHER, N, MEIER-PLOEGER, A. (2003), Abschlussbericht zum Projekt Nr. 02OE170, Bundesprogramm ökologischer Landbau, Ganzheitliche Untersuchungsmethoden zur Erfassung und Prüfung der Qualität ökologischer Lebensmittel: Stand der Entwicklung und Validierung, Universität Kassel.
- KAHL, J.; BUSSCHER, N. (2007) Abschlussbericht zum Projekt Nr. 02OE170/F, Bundesprogramm Ökologischer Landbau, Differenzierung und Klassifizierung von Öko-Produkten mittels validierter analytischer und ganzheitlicher Methoden, Universität Kassel.

- KAMMERER, D.; CARLE, R.; SCHIEDBER, A. (2004), Characterization of phenolic acids in black carrots (*Daucus carota* ssp. *Sativus* var. *atrorubens* Alef.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 18 (12), pp. 331-1340.
- KERN, S (1996), Untersuchungen zur Phenolsynthese bei Apfelzellkulturen. Diplomarbeit an der Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau, Institut für Obstbau, Technische Universität München.
- KHACHIK, F. G. R.; BEECHER, G. R.; WHITTAKER, N. F. (1986), Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 34, pp. 603-616.
- KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (2003), Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 2603-2607.
- KLIPSTEIN-GROBUSCH, K.; LAUNER, L.J.; GELEIJNSE, J.M.; BOEING, H.; HOFMAN, A.; WITTEMAN, J.C.M. (2000), Serum Carotoids and Artherosclerosis. The Rotterdam Study., *Artherosclerosis*, 148, pp. 49-56.
- KONOPKA, I.; KOZIOROK, W.; ROTKIEWICZ, D. (2004), Lipids and Carotenoids of wheat grain and attempt of korrelating them with digital image analysis pf kernel surface and cross-sections. *Food Research international*, 37, pp. 429-438.
- KROMIDAS, S. (1996) *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium*. 44, pp. 34-S36.
- KROMIDAS, S. (1999) *Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH, Weinheim.
- KROMIDAS, S.; KLINKNER, R.; MERTENS, R. (1995), *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium*.43, pp. 669-676.
- KURILICH, A. C.; JUVIK, J.A. (1999), Quantification of carotenoid and tocopherolanti-oxidants in Zea Mays., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (5), pp. 1948-1955.

- KURODA, M.; YOPSHIDA, D.; MIZUSAKI, S. (1986), Bio-antimutagenic effect of lactones on chemical mutagenesis in *Escherichia coli*. *Agricultural and Biological Chemistry* 50 (1), pp. 243-245.
- LEA, A. G. H. (1979), HPLC of cider procyanidins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29, pp. 833-838.
- LEA, A. G. H.; ARNOLD, G. M. (1978), The phenolics of ciders: Bitterness and astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, pp. 478-483.
- LECLERC, J.; MILLER, M.L.; JOLIET, E.; ROCQUELIN, G. (1991), Vitamin and mineral contents of carrot and celeriac under mineral or organic fertilization, *Biological agriculture and horticulture*, 7, pp. 349-361.
- LIEBLEIN, G. (1993), zitiert nach BOURN, D.; PRESCOTT J. A. (2002), Comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical Reviews in Food Science*, 42 (1), pp. 1-34.
- LIENAU, A., (2003), Untersuchung zur Anreicherung und Bioverfügbarkeit von bioaktiven Substanzen unter Verwendung der HPLC-NMR und HPLC-MS Kopplung. Univ. Diss., Fakultät der Chemie und Pharmazie der Eberhardt-Karls Universität Tübingen.
- LIN, W. L.; WANG, C. J.; TSAI, Y. Y.; LIU, C. L.; HWANG, J. M.; TSENG, T. H. (2000), Inhibitory effect of esculetin on oxidative damage induced by butylhydroperoxide in rat liver. *Archiv of Toxicology*, 74, pp. 467-472.
- MÄDER, P.; FLIEBBACH, A.; DUBOIS, D.; GUNST, L.; FRIED, P.; NIGGLI, U. (2002), Soil Fertility and Biodiversity in Organic Farming. *Science*, 296, pp. 1694-1697.
- MARBRY, T. J.; MARKHAM, K. T.; THOMAS, M. B. (1970), *The systematic identification of flavonoids*. Springer Verlag, New York.
- MARES-PERLMAN, J. A.; MILLEN, A. E.; FICEK, T. L.; HANKINSON, S. E. (2002), The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic diseases, overview. *Journal of Nutrition*, 132, pp. 518-524.
- MARGNA, U. (1977), Control at the level of substrate supply – an alternative in the regulation of phenylpropanoid accumulation in plant cells. *Phytochemistry*, 16, pp. 419-426.

- MAZZA, G.; MINIATI, E. (1993), Anthocyanins in fruit, vegetables, and grains. CRC Press, Boca Raton.
- MEIER-PLOEGER, A. (2005) Organic Farming Food Quality and Human Health, NJF Seminar June 15th 2005.
- MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA D. B. (1998), Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, pp. 128-130.
- MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (1991), Carotenoid composition of a leafy vegetable in relation to some agricultural variables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, pp. 1094-1097.
- MEYER, A. A.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E. N. (1998), Antioxidant interactions of catechin cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, 61 (1/2), pp. 71–75.
- MEYER, A. S.; DONOVAN, J. L.; PEARSON, D. A.; WATERHOUSE, A. L.; FRANKEL, E. N. (1998), Fruit hydroycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, pp. 1783-1787.
- MOORE, J.; HAO, Z.; LUTHER, M.; COSTA, J.; YU, L. L. (2005), Carotenoid, tocopherol, phenolic acid and antioxidant properties of Maryland-grown soft wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 6649-6657.
- MOROS, E. E.; DARNOKO, D.; CHERYAN, M.; PERKINS, E.G.; JERELL, J. (2002), Analysis of xanthophylls in Corn by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9 (21), pp. 5787-5790.
- MPOFU, A.; SAPIRSTEIN, H. D.; BETA, T. (2006), Genotype and environmental variation in phenolic content, phenolic acid composition, and antioxidant activity of hard spring wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22, 54, 4, pp. 1265-1270.
- MÜLLER, H. (1997), Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection. *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und -Forschung A*, 204, pp. 88-94.

- NELLS, H. J. C. F., LEENHEER, A. P. (1983), Isocratic nonaqueous reversed-phase liquid chromatography of carotenoids. *Analytical Chemistry*, 55, pp. 270-275.
- NEWMARK, H. L. (1992), Plant phenolic compounds as inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. In Huang, H. T.; Ho, C. T.; Lee, C. Y.; Phenolic compounds in Food and their effect on health II. Antioxidant and cancer prevention. American Chemistry Society, Symposium Series 507, pp. 48-53.
- NG, H.; TAN, B. (1988), Analysis of palm oil carotenoids by HPLC with diode-array detection. *Journal of Chromatographic Science*, 26 (10), pp. 463-469.
- NIKFARDJAM, M. S. P. (2001), Polyphenole in Weißweinen und Traubensäften und ihre Veränderung im Laufe der Herstellung. Univ. Diss., Universität Giessen.
- OLSSON, K.; SVENSSON, R. (1996), Sind Phenole und Polyacetylene gegen Lagerfäule wirksam? XXXI. Vortragstagung Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung, Kiel.
- OMENN, G. S.; GOODMAN, G. E.; THORNQUIST, M. D.; BALMES, J.; CULLEN, M. R.; GLASS, A.; KEOGH, J.P.; MEYSKENS, F. L.; VALANIS, B.; WILLIAMS, J. H.; BARNHART, S.; HAMMAR, S. (1996), Effects of combination of beta-carotene and Vitamin A on lung cancer and cardiovascular diseases. *New England Journal of Medicine*, 334, pp. 1150-1155.
- ONYENEHO, S.; HETTIARACHCHY, N.S. (1992), Antioxidant activity of durum wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40, pp. 1496-1500.
- PANFILI, G.; FRATIANNI, A.; IRANO, M. (2004), Improved normal -phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (21), pp. 6373-6377.
- PAYÁ, M.; FERRÁNDIZ, M. L.; MIRALLES, F.; MONTESINOS, C.; UBEDA, A.; ALCARAZ, M. J. (1993), Effects of coumarin derivatives on superoxide anion generation. *Arzneimittel-Forschung*, 43, 1, Nr. 6, pp. 655-658.
- POON, G. K. (1998), Analysis of catechins in tea extracts by LC/MS (electrospray ionization). *Journal of Chromatography*, 794, pp. 63-74.

- RAMOS, D. M. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (1987), Determination of the vitamin A value of common Brazilian leafy vegetables. *Journal of Micronutrient Analysis*, 3, pp. 147-155.
- RANDALL, J. R.; SHU-JUN, C.; KLAUNIG, J.E. (1989), Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10 (6), pp. 1003-1008.
- RAUSCHER, R.; EDENHARDER, R.; PLATT, K. L. (1998), In vitro antimutagenic and in vitro clastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in Carotenoids. *Mutation Research*, Mar. 16, 413 (2), pp. 129-142.
- RECHNER, A. (2001), Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die antioxidative Kapazität von wertgebenden Apfel- und Beerensaftkomponenten. Univ. Diss., Universität Giessen.
- REN, H.; BAO, H.; ENDO, H.; HAYASHI, T. (2001), Antioxidative and antimicrobial activities and flavonoid contents of organically cultivated vegetables. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 48 (4), pp. 246-252.
- RENTEL, C.; STROSCHEIN, S.; ALBERT, K. BAYER, E. (1998), Silver-plated vitamins: A method of detecting tocopherols and carotenoids in LC/ESI-MS coupling. *Analytical Chemistry*, 70, pp. 4394-4400.
- RICE-EVANS, C.A.; SAMPSON, J.; BRAMLEY, P.M.; HOLLOWAY, D.E. (1997), Why do we expect carotenoids to be antioxidant in vivo? *Free Radical Research*, 26, pp. 381-398.
- RICHTER, G. (1996), *Biochemie der Pflanzen*. Thieme, Stuttgart.
- ROBBINS, R. J.; KECK, A. S.; BANUELOS, G.; FINLEY, J. W. (2005), Cultivation conditions and selenium fertilization alter the phenolic profile, glucosinolate, and sulforaphane content of broccoli. *Journal of Medicinal Food*, 8 (2), pp. 204-214.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (1993), Nature and distribution of carotenoids in foods. In: Charalambous, G. (Ed.), *Shelf-life studies of foods and beverages. Chemical, biological, physical and nutritional aspects*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 547-589.

- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (1999), Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 49, pp. 38-47.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (2002), Effects of processing and storage on food carotenoids. *Sight Life Newsletter (Special issue)*, 3, pp. 25-35.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. (2004), *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*, HarvestPlus technical Monography 2.
- RÜFER, C.; STRACKE, B. (2006), Sekundäre Pflanzenstoffe in ökologisch und konventionell erzeugtem Gemüse und Obst, Statusseminar Ressortforschung für den Ökolandbau, 2. März 2006, Braunschweig.
- RÜHMANN, S.; TREUTTER, D. (2003), Effect of N-Nutrition in apple on the response of its secondary metabolism to perhexadione-Ca treatment. *European Journal of Horticultural Science*, 68, pp. 152-159.
- SAMARAS, T. S.; CAMBURN, P. A.; CHANDRA, S. X.; GORDON, M. H.; AMES, J. M. (2005), Antioxidant properties of kilned and roasted malts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5 (53), pp. 8068-8074.
- SARKAR, S. K.; PHAN, C., T. (1979), Naturally-occurring and ethylene-induced phenolic compounds in the carrot root. *Journal of Food Protection*, 42, pp. 526-534.
- SCHLESIER, K.; BÖHM, V.; BITSCH, R. (2001), Unterschiede im protektiven Potential von Grün- und Schwarztee. *Ernährung im Fokus*, 2, pp. 2-4.
- SCHMIDT, R. F.; THEWS, G. (1987), *Physiologie des Menschen*, 23. Aufl., Springer-Verlag, Berlin.
- SCHMITT, A. (2002), Veränderungen von Carotinoiden bei der thermischen Behandlung von Karotten (*Daucus carota L.*). Zulassungsarbeit Universität Karlsruhe.
- SCHUPHAN, W. (1974), Nutritional value of crops as influenced by organic and inorganic fertilizer treatments. *Qualitas Plantarum – Plant Foods for Human Nutrition*, 23, pp. 333-358.
- SCHUPHAN, W. (1976), Mensch und Nahrungspflanze. Der biologische Wert der Nahrungspflanze in Abhängigkeit von Pestizideinsatz, Bodenqualität und Düngung. Dr. W. Junk B.V.-Verlag, Den Haag.

- SCHWEIZ. LEBENSMITTELBUCH, MSDA (2004), Leitfaden zur Validierung chemisch physikalischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit, Kapitel 60C.
- SCOTT, K.J.; HART, D.J. (1993), Further observations on problems associated with the analysis of carotenoids by HPLC-2: Column temperature. *Food Chemistry*, 47, pp. 403-405.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A., (1965), Colorimetry of the total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 3, pp. 144-158.
- SLATTERY, M.L.; BENSON, J.; CURTIN, K.; MA, K.-N.; SCHAEFFER, D.; POTTER, J. D. (2000), Carotenoids and colon cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, pp. 572-582.
- STEINEGGER, E.; HÄNSEL, R. (1992), *Pharmakognosie*. 4. Aufl., Springer, Verlag, Berlin Heidelberg, 244.
- TAGASHIRA, M.; OHTAKE, Y. (1998), A new antioxidative 1, 3-benzodioxole from *Melissa officinalis*. *Planta Medica*, 64, pp. 555-558.
- TAKAHASHI, H.; IUCHI, M.; FUJITA, Y.; MINAMI, H.; FUKUYAMA, Y. (1999), Cumaroyl triterpenes from *Casuarina equisetifolia*. *Phytochemistry*, 51, pp. 543-550.
- TALCOTT, S. T.; HOWARD, L. R. (1999), Chemical and Sensory Quality of Processed Carrot Puree As Influenced by Stress-Induced Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, pp. 1362-1366.
- TALCOTT, S. T.; HOWARD, L. R.; Brenes, C. H. (2000), Antioxidant changes and sensory properties of carrot puree processed with and without periderm tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (4), pp. 1315-1321.
- TANG, G.; GU, X.-F.; HU, S.-M.; XU, Q.-M.; QIN, J.; DOLNIKOSKI, G.G.; FJELD, C.R.; GAO, X.; RUSSELL, R. M.; YIN, S.-A. (1999), Green and yellow vegetables can maintain body stores of vitamin A in chinese children. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, pp. 1069-1076.
- TAUSCHER, B.; BRACK, G.; FLACHOWSKY, G.; HENNING, M.; KÖPKE, U.; MEIER-PLOEGER, A.; MÜNZZING, K.; NIGGLI, U.; PABST, K.; RAHMANN, G.; WILLHÖFT, C.; MAYER MIEBACH, E. (2003), *Bewertung von Lebensmitteln ver-*

- schiedener Produktionsverfahren– Statusbericht 2003. Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig. www.bmvel-forschung.de/homeanst/Senat_satisbericht2003.htm
- TEUBERT, H.; WUNSCHER, G.; HERRMANN, K. (1977), Flavonols and Flavones of vegetables, VIII. Flavones of carrot leaves. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, 9, 165 (3), pp. 147- 150.
- TOREL, J.; CILLARD, J.; CILLARD, P. (1986), Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, 25, pp. 383-385.
- TREUTTER, D. (1988), Separation of naturally occurring mixtures of phenolic compounds from various Prunus tissues by reversed–phase high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, 436, pp. 490-496
- TREUTTER, D; SANTOS-BUELGA, M; GUTMANN, K, KOLODZIEJ, H. (1994), Identification of flavan-3-ols and procyanidins by HPLC and chemical reaction detection. *Journal of Chromatography A*, 667, pp. 290-297
- TSCHONÉ, M. (2003), Über Polyphenole in Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) und andere gesundheitsrelevante Inhaltsstoffe. Dissertation der Technischen Universität Berlin, Fakultät III – Prozesswissenschaften, Berlin.
- TSUKAMOTO, H.; HISADA, S.; NISHIBE, S. (1985), Coumarins from bark of *Fraxinus japonica* and *F. mandshurica*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 33 (9), pp. 4069-4073.
- VAN BREEMEN, R.B. (1995), Electrospray liquid chromatography-mass spectrometry of carotenoids. *Analytical Chemistry*. 67, pp. 2004-2009.
- VAN BREEMEN, R.B. (1996), Innovations in carotenoid analysis using LC/MS. *Analytical Chemistry. News & Features* 1, 299A-304A .
- VAN BREEMEN, R.B.; HUANG, C.-R.; TAN, Y.; SANDER, L.C.; SCHILLING, A.B. (1996), Liquid chromatography/mass spectrometry of carotenoids using atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of Mass Spectrometry*. 31, pp. 975-981.
- VELIMIROV, A.; PLOCHBERGER, K.; HUSPEKA, U.; SCHOTT, W. (1992), The influence of biologically and conventionally cultivated food on the fertility of rats. *Biological Agriculture and Horticulture*, 8, pp. 325 – 337.

- WALBRAUCH S. (1984), Verfahren zur Isolierung der Carotinoide aus Säften und Getränken. Flüssiges Obst, Heft 2, pp. 64-66.
- WALTERS, M. T.; HUGHES, P. S.; BAMFORTH, C. W. (1996), The evaluation of natural antioxidants in beer and its raw materials. The Institute of Brewing Asia Pacific Section: Proceedings of the twenty-fourth convention, Singapore, pp. 103-109.
- WANG, Z. Y.; AGARWAL, R.; KHAN, W.A.; MUKTHAR, H. (1992), Protection against benzo [a] pyrene- and N-nitrosodiethylamine- induced lung and forestomach tumorigenesis in A/J mice by water extracts of green tea and licorice. *Carcinogenesis*, 13, pp. 1491-1493.
- WANG, Z.Y.; KHAN, W.A.; BICKERS, D.R.; MUKTHA, H. (1989), Protection against polycyclic aromatic hydrocarbon-induced skin tumor initiation in mice by green tea polyphenols. *Carcinogenesis* 10 (2), pp. 411-415.
- WATZL, B.; LEITZMANN, C. (2005), *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Hippokrates Verlag, Stuttgart.
- WATZL, B.; BUB A., (2001), Carotinoide, Basiswissen aktualisiert, *Ernährungsumschau*, 48, Heft 2, pp. 71-74.
- WEIBEL, F.P.; BICKEL, R.; LEUTHOLD, S.; ALFOLDI, T.; NIGGLI, U. (1998), Are organically grown apples tastier and healthier? A comparative field study using conventional and alternative methods to measure fruit quality. In: Proceedings of the 12th International IFOAM Scientific Conference, November 1998, Argentina, Germany, IFOAM, 1999, pp. 147-153.
- WOLFSON, J. L.; SHEARER, G. (2005), Amino acid composition of grain protein of maize grown with and without pesticides and standard commercial fertilizers. *Agronomy Journal*, 73, pp. 611-613
- WORTHINGTON, V. (1998), Effect of agricultural methods on nutritional quality. A comparison of organic with conventional crops. *Alternative Therapies*. 4, (1), pp. 58-69.
- WORTHINGTON, V. (2001), Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables, and grains. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 7 (2), pp. 161-173.

- WU, H.; HAIG, T.; PRATLEY, J.; LEMERLE, D.; AN, M. (2000), Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): Variation of phenolic acids in root tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (11), 5321-5325.
- YOUNG, J. E.; ZHAO, X.; CAREY, E. E.; WELTI, R.; YANG, S. S. WANG, W. (2005), Phytochemical phenolics in organically grown vegetables. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49 (12), pp. 1136-1142.
- YU, L.; PERRET, J.; HARRIS, M.; WILSON, J.; HALEY, S. (2003), Antioxidant properties of bran extracts from "Akron" wheat grown at different locations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12, 51, 6, pp. 1566-1570.
- ZECHMEISTER, L. (1962), *Cis-trans Isomeric Carotenoids, Vitamin A and Aryl-polyenes*. Springer Verlag, Wien.
- ZHANG, S.; HUNTER, D. J.; FORMAN, M. R.; ROSNER, B.A.; SPEIZER, F. E.; COLDITZ, G. A.; MANSON, J. E.; HANKINSON, S.E.; WILLETT, W. C. (1999), Dietary carotenoids and vitamins A, C and E and risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 91 (6), pp. 547-556.
- ZHOU, K.; LAUX, J. J.; YU, L. (2004 a), Comparison of Swiss Red Wheat Grain and Fraction for their antioxidant Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 1118-1123.
- ZHOU, K.; SU, L.; YU, L. (2004 b), Phytochemicals and Antioxidant Properties in Wheat Bran, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 6108-6114.
- ZHOU, K.; YIN, J. J.; YU, L. L. (2005), Phenolic acid, tocopherol and carotenoid compositions, and antioxidant functions of hard red winter wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 10, pp. 3916-3922.
- ZIELINSKI, H.; KOZŁOWSKA, H. (2000), Antioxidant activity and total phenolics in selected cereals and grains and their different morphological fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, pp. 2008-2016.

Danksagung

Für die vielseitige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich mich bedanken.

Insbesondere gilt mein Dank:

Frau Prof. Dr. A. Ploeger für die Überlassung der interessanten Themenstellung.

Herrn Prof. Dr. G. Rahmann für die Übernahme des Koreferates und die Organisation der Probenbereitstellung der Erzeugerproben.

Herrn Prof. Dr. D. Treutter und seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die kollegiale Zusammenarbeit während der Zeit der Messungen im Freisinger Labor und die tatkräftige methodische Unterstützung.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Forschungsinstitutes für biologischen Landbau für die Probenbereitstellung.

Herrn B. Schäfer (Fa. Statcon) für die Durchführung der statistischen Auswertung der Messergebnisse.

Meinen Eltern für die finanzielle und sonstige Unterstützung während meines Studiums.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur danke ich für die sehr angenehme Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Freundin Sarah für ihre grenzenlose Geduld und für die Unterstützung bei der Formatierung sowie beim Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Herrn H. Fehr danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Andreas Werries
Geburtsdatum	25.03.1970
Geburtsort	Georgsmarienhütte

Schulbildung:

1976-80	Altstädter Grundschule, Osnabrück
1980-82	Orientierungsstufe Dom, Osnabrück
1982-89	Gymnasium Carolinum, Osnabrück. Abschluss mit dem Abitur

Zivildienst:

1989-90	Bischof-Lilje Altenwohn- und Pflegeheim, Osnabrück Senioren Wohn- und Pflegeheim Matthias-Claudius, Rotenburg/Wümme
---------	--

Hochschulbildung:

1990 - 1995	Medizinstudium an der Philipps-Universität Marburg, 2. Staatsexamen
1996	Beginn des Praktischen Jahres (PJ) in der Klinik für Innere Medizin des Klinikum Landshut (Ausbildungskrankenhaus der LMU München)
1997 - 2001	Studium Umweltsicherung/Ecotechnie an der FSU Jena

Praktische Tätigkeiten:

03.2002 – 08.2003	Wissenschaftlicher Angestellter der Universität Bremen im Bereich Aquatische Ökotoxikologie.
09.2002 – 07.2005	Wissenschaftlicher Angestellter der Universität Kassel/Witzenhausen im Bereich Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur.
Seit 01.09.06	Freiberufliche Tätigkeit für die Firma vonKampen Consult

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntliche gemacht. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Witzenhausen im Dezember, 2006

(A. Werries)