



Universität für Bodenkultur Wien
University of Natural Resources
and Applied Life Sciences, Vienna

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

Entwicklung und Validierung einer HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Vitamin C in Obst und Gemüse

verfasst von

Karin Scheuringer, BSc

angestrebter akademischer Grad

Diplom-Ingenieur

Wien, April 2019

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

H 066 417

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Lebensmittelwissenschaften und -technologie

Betreut von:

Priv.-Doz., Dr. Matthias Schreiner

Mitbetreut von:

Dipl.-Ing. Thomas Fauster

Danksagung

Mein Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Matthias Schreiner und Dipl.-Ing. Thomas Fauster, die dieses Projekt ermöglicht haben, und mir mit fachlichem Input zur Seite standen. Danke für die ausgezeichnete Betreuung und Beratung. Dem tollen Team im Labor Iris Biedermann, Meltem Forthofer und Nicole Schamberger danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Meinem Lebensgefährten Martin möchte ich für die emotionale Unterstützung und zahlreichen Ermutigungen während des gesamten Studiums danken. Ein ganz besonderes Dankeschön geht schließlich an meine Eltern, die mir in allen Schritten meines Lebens unterstützend und bekräftigend zur Seite gestanden sind.

Danke für eure Unterstützung!

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Formulierungen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Diese schriftliche Arbeit wurde noch an keiner Stelle vorgelegt.

Karin Scheuringer

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Eidesstattliche Erklärung	II
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	VIII
Abstract	IX
1 Einleitung	1
1.1 Einleitende Betrachtungsweise der Vitamin-C-Analytik	1
1.2 Chemische Eigenschaften von L-Ascorbinsäure	3
1.3 Oxidation der L-Ascorbinsäure	3
1.3.1 Oxidativer Abbau von Vitamin C	4
1.3.2 Dehydroascorbinsäure	5
1.3.3 Enzymatische Oxidation	5
1.4 Bedeutung des Vitamin C für den Menschen	6
1.4.1 Funktionen des Vitamin C im Körper	7
1.4.2 Zirkulation des Vitamin C im Körper	8
1.4.3 Deckung des Vitamin-C-Bedarfes	8
1.5 Einfluss von Umwelt- und Anbaubedingungen auf den Vitamin-C-Gehalt von Lebensmitteln	10
1.6 Lagerung und Verarbeitung von Lebensmitteln	11
1.6.1 Verarbeitung im Haushalt	11
1.6.2 Lagerung und Zerkleinerung von Lebensmitteln	12
1.6.3 Thermische Verarbeitung von Lebensmitteln	12
1.6.4 PEF-Behandlung	15
1.6.5 Hochdruckbehandlung	17
1.7 Extraktion und Stabilisierung von Vitamin C in Lösungen	17
1.7.1 Extraktion von Vitamin C aus Lebensmitteln	18
1.7.2 Stabilisierung von Vitamin C in Lösungen	19
1.8 Methoden zur quantitativen Bestimmung von Vitamin C	21
1.8.1 Titration	21
1.8.2 Spektrophotometrie	22
1.8.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	22
2 Material und Methoden	25

2.1	Probenbeschreibung.....	25
2.2	Chemikalien und Laborausstattung.....	26
2.3	Methoden	27
2.3.1	Methodentest und -optimierung	27
2.3.2	Unterscheidung in L-Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure und Gesamtascorbinsäure	27
2.3.3	Vitamin-C-Bestimmung mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion	28
2.3.4	Vitamin-C-Bestimmung mittels HPLC und UV-Detektion	31
2.3.5	Standardadditionsversuche	33
2.3.6	Gravimetrische Bestimmung der Trockensubstanz	33
2.3.7	Thermische Probenbehandlung	34
2.3.8	PEF-Behandlung (pulsed electric field)	34
2.4	Auswertung und statistische Analyse	35
3	Ergebnisse und Diskussion	37
3.1	Kalibrierdaten	37
3.2	Bestimmungsgrenze.....	38
3.3	Standardadditionsversuche	40
3.3.1	Wiederfindungsversuche	40
3.3.2	Bestimmung der Probenkonzentration aus der Standardaddition.....	46
3.4	Vergleiche von HPLC- und Probenvorbereitungsmethoden	52
3.4.1	Methodenvergleich: UV/Fluoreszenz am Beispiel Frühstückssaft.....	52
3.4.2	Methodenvergleich: UV/Fluoreszenz am Beispiel Brokkoli.....	53
3.4.3	Vergleich von Probenaufschlussmethoden am Beispiel Brokkoli.....	58
3.5	Quantifizierung des Anteils an Dehydroascorbinsäure (DHAA)	64
3.5.1	Bestimmung des DHAA-Anteils durch UV-Detektion	64
3.5.2	Bestimmung des DHAA-Anteils durch Fluoreszenzdetektion.....	65
3.6	Vergleich von Extraktionsmitteln	67
3.6.1	Extraktionsmittelvergleich - Vorversuch.....	68
3.6.2	Extraktionsmittelvergleich	69
3.6.3	Untersuchung der Extraktstabilität	72
3.7	Vergleich der Vitamin-C-Gehalte aus Datenbanken	74
4	Conclusio	76
5	Literaturverzeichnis.....	80
6	Anhang	87

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mesomere Grenzstrukturen des L-Ascorbat-Anions.....	3
Abbildung 2: Oxidativer Abbau von Vitamin C	4
Abbildung 3: Strukturen der Dehydroascorbinsäure.....	5
Abbildung 4: Stereoisomere L-Ascorbinsäure und D-Isoascorbinsäure	6
Abbildung 5: Ascorbat-Glutathion-Zyklus	7
Abbildung 6: Keto-Enol-Tautomerie von Vitamin C.....	16
Abbildung 7: Reduktion von 2,6-Dichlorphenol-indophenol	21
Abbildung 8: Komplexbildung zwischen Cu^+ und Cuproin.....	22
Abbildung 9: Reaktion der DHAA mit OPDA zum fluoreszierenden Quinoxalin-Derivat.....	24
Abbildung 10: Flussdiagramm zur Vitamin-C-Bestimmung, HPLC mit Fluoreszenzdetektion.....	28
Abbildung 11: Flussdiagramm zur Vitamin-C-Bestimmung, HPLC mit UV-Detektion	31
Abbildung 12: Kalibriergerade mit Vitamin C Standardlösungen für HPLC-Fluoreszenz-Analysen ..	37
Abbildung 13: Kalibriergerade mit Vitamin C Standardlösungen für HPLC-UV-Analysen.....	37
Abbildung 14: Wiederfindungsfunktion, roher, grüner Paprika.	41
Abbildung 15: Wiederfindungsfunktion, rohe Gurke.	42
Abbildung 16: Wiederfindungsfunktion, rohe Heidelbeeren.	43
Abbildung 17: Wiederfindungsfunktion, rohe Avocado.	44
Abbildung 18: Bestimmung der Probenkonzentration aus der Standardaddition (Grüner Paprika).	47
Abbildung 19: Bestimmung der Probenkonzentration aus der Standardaddition (Gurke).....	48
Abbildung 20: Bestimmung der Probenkonzentration aus der Standardaddition (Heidelbeeren).	49
Abbildung 21: Bestimmung der Probenkonzentration aus der Standardaddition (Avocado).	50
Abbildung 22: Methodenvergleich: Vorversuch an Hohes C Frühstückssaft.	52
Abbildung 23: Methodenvergleich: UV-/Fluoreszenzdetektion von Vitamin C aus Brokkoli.	53
Abbildung 24: Vergleich von Probenvorbereitungen zur Bestimmung von Vitamin C in Brokkoli.	58
Abbildung 25: Quantifizierung des DHAA-Anteils aus Brokkoli mit verschiedenen Extraktionslösungen.	65
Abbildung 26: Vergleich von Extraktionsmitteln zur Extraktion von Vitamin C aus Brokkoli.	68
Abbildung 27: Vergleich von Extraktionsmitteln zur Extraktion von Vitamin C aus Brokkoli.	69
Abbildung 28: Stabilität von Vitamin C aus Brokkoli-Extrakten nach 20 h Kühlagerung.....	72
Abbildung 29: Temperaturverlauf im Brokkoli während des Garens im Kombidämpfer.	87
Abbildung 30: Temperaturverlauf während der thermischen Behandlung im Wasserbad.	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Obst und Gemüse mit hohen Vitamin-C-Gehalten.	9
Tabelle 2: Chemikalienliste.....	26
Tabelle 3: Laborausstattung	26
Tabelle 4: Pipettierschema der Standardreihe zur Fluoreszenzdetektion.....	30
Tabelle 5: Pipettierschema der Standardreihe zur UV-Detektion	32
Tabelle 6: Wiederfindungsraten und systematische Abweichungen der untersuchten Lebensmittel....	45
Tabelle 7: Vergleich des ermittelten Vitamin-C-Gehaltes aus der Standardaddition mit jenem aus der Grundkalibrierung.	50
Tabelle 8: Vergleich der Vitamin-C-Gehalte aus Analysenwerten und aus Datenbanken.....	74

Abkürzungsverzeichnis

AA	L-Ascorbinsäure (L-ascorbic acid)
AO	Ascorbat-Oxidase
DHAA	Dehydroascorbinsäure (dehydroascorbic acid)
DKG	2,3-Diketogulonsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
GSH	Glutathion, reduzierte Form
GSSG	Glutathion, oxidierte Form
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
MDHA	Monodehydroascorbat
MPA	meta-Phosphorsäure (metaphosphoric acid)
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
OPDA	o-Phenylendiamin
PEF	Gepulste elektrische Felder (pulsed electric fields)
STABW	Standardabweichung
TAA	Gesamtascorbinsäure (total ascorbic acid)
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TM	Trockenmasse
USDA	United States Department of Agriculture
VB	Vertrauensbereich

Zusammenfassung

Auf dem Gebiet der Vitamin-C-Analytik gibt es viele Herausforderungen und zahlreiche Studien wurden bisher publiziert. Ein Großteil der Analysen wird mittels HPLC durchgeführt. Während die UV-Detektion bereits gut erforscht ist, beschäftigen sich nur wenige Studien mit Fluoreszenzdetektion. Im Zuge dieser Arbeit wurde eine HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion zur Quantifizierung von Vitamin C aus Obst und Gemüse evaluiert. Dazu wurde eine Derivatisierung mit o-Phenylendiamin durchgeführt. Ein häufig beobachtetes Problem ist die Differenzierung in L-Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure. Mit meta-Phosphorsäure als Extraktionsmittel wurden Interferenzen im Chromatogramm der Dehydroascorbinsäure beobachtet. Durch die Verwendung eines Phosphatpuffers konnten die Interferenzen beseitigt werden, jedoch stabilisierte der Puffer das Vitamin nicht ausreichend, sodass es zu einem Verlust an Vitamin C kam. Bei der beschriebenen Methode mit Fluoreszenzdetektion lag die Bestimmungsgrenze bei 0,04 µg/mL. In Wiederfindungsversuchen konnten bei Paprika, Heidelbeeren und Avocado keine systematischen Abweichungen festgestellt werden. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 89-105%. Bei der Gurke kam es, mit einer Wiederfindung von 75%, zu Abweichungen. Aus dem Extraktionsmittelvergleich von meta-Phosphorsäure und Phosphatpuffer ging hervor, dass die meta-Phosphorsäure das Vitamin C besser stabilisiert. Eine thermische Inaktivierung der Ascorbat-Oxidase, sowie ein Zellaufschluss durch gepulste elektrische Felder brachte keine Steigerung der Vitamin-C-Ausbeute. Bei einem Vergleich zwischen UV- und Fluoreszenzdetektion wurden keine großen Unterschiede festgestellt. Kleine Abweichungen können auf eine unterschiedliche Grundkalibrierung beider Methoden zurückzuführen sein. Prinzipiell ist auf eine ausreichende Probenhomogenität zu achten, da der Gehalt in rohen Lebensmitteln auf natürliche Weise stark schwanken kann.

Schlüsselwörter: Vitamin C, HPLC, Fluoreszenz, meta-Phosphorsäure, L-Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure, Obst und Gemüse

Abstract

There are many challenges in the field of vitamin C analysis and numerous studies have been published. HPLC is frequently used for the analysis. While UV detection is already well researched, few studies deal with fluorescence detection. The aim of this work is to investigate a HPLC method with fluorescence detection for the quantification of the vitamin C content of fruits and vegetables. For this purpose, a derivatization with o-phenylenediamine was carried out. A frequently observed problem is the differentiation into L-ascorbic acid and dehydroascorbic acid. With the use of metaphosphoric acid as an extractant interferences were observed in the chromatogram of dehydroascorbic acid. By using a phosphate buffer, the interferences could be eliminated, but the buffer did not sufficiently stabilize the vitamin, resulting in a loss of vitamin C. In the method with fluorescence detection described here, the quantification limit was 0.04 µg/mL. In recovery experiments no systematic errors were found in peppers, blueberries and avocados. The recovery rates ranged between 89-105%. Cucumber had a recovery of 75%, and showed systematic errors. The comparison of metaphosphoric acid and phosphate buffer as extractants showed that metaphosphoric acid stabilizes vitamin C better. A thermal inactivation of ascorbate oxidase, as well as a cell disruption by pulsed electric fields did not increase the vitamin C yield. When comparing UV and fluorescence detection, no major differences were found. Small deviations may be due to a different basic calibration of both methods. In principle sufficient sample homogeneity should be taken into account, as the content in raw foods may vary widely in a natural way.

Key words: Vitamin C, HPLC, fluorescence, metaphosphoric acid, L-ascorbic acid, dehydroascorbic acid, fruits and vegetables

1 Einleitung

1.1 Einleitende Betrachtungsweise der Vitamin-C-Analytik

Die Vitamin-C-Analytik kann aus verschiedenen Perspektiven betrachtet werden. Dabei nehmen unter anderem ernährungswissenschaftliche und analytische Aspekte einen großen Stellenwert ein. Aus Sicht des Konsumenten ist es wichtig, dass der angegebene Gehalt möglichst dem wahren Wert entspricht und der Vitaminbedarf über ein breites Spektrum an Lebensmitteln gedeckt werden kann. In Hinblick auf Analysenwerte ist es für den Endverbraucher entscheidend zu wissen wie viel an Gesamascorbinsäure im Lebensmittel enthalten ist, und, dass die erhobenen Daten vertrauenswürdig sind. Der Vitamin-C-Gehalt, also die Gesamascorbinsäure, ergibt sich aus der Summe von L-Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure, da beide Formen Vitaminaktivität besitzen und vom menschlichen Körper aufgenommen werden. Betrachtet man die Sichtweise der lebensmittelverarbeitenden Industrie, so liegen die Prioritäten in der Konservierung von Vitamin C während Verarbeitungsprozessen. Neben dem Gehalt an Gesamascorbinsäure ist hier auch der Anteil der L-Ascorbinsäure wesentlich. Als Antioxidans ist sie wichtig um Qualitätseinbußen während der Lagerung von Lebensmitteln vorzubeugen. Vermutlich wird daher in Studien häufig nur der Gehalt an L-Ascorbinsäure erfasst. Wenn es um die Beurteilung der Auswirkungen auf den Vitamin-C-Gehalt geht, die durch Lagerung, thermische Prozesse oder neuere Verfahren zur Konservierung von Lebensmitteln entstehen, dann sollte aus meiner Sicht unbedingt auch der Gehalt an Gesamascorbinsäure ermittelt werden. Wird nur die L-Ascorbinsäure bestimmt, so kann nicht sicher gesagt werden, ob es sich um einen tatsächlichen Vitaminverlust in Form eines kompletten Abbaus der L-Ascorbinsäure zur Diketogulonsäure handelt. Genauso gut könnte es sich lediglich um eine Oxidation zur Dehydroascorbinsäure handeln, die nachwievor Vitaminaktivität aufweist. Bei Untersuchungen zur Stabilität von Vitamin C ist es also wesentlich sicherzustellen, ob ein Vitaminverlust vorliegt oder ob es zu einer Verschiebung des Verhältnisses zwischen L-Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure kommt.

Bei der Quantifizierung von Vitamin C gibt es einige Aspekte zu beachten, da das Molekül in wässriger Lösung nicht besonders stabil ist. Die Wahl des Extraktionsmittels und das Extraktionsverfahren spielen eine wichtige Rolle. Ein niedriger pH-Wert, Sauerstoffausschluss, Lichtausschluss, sowie der Einsatz von Chelatbildnern zur Bindung von Metallionen wirken stabilisierend auf Vitamin C. Die thermische Inaktivierung der Ascorbat-Oxidase kann das Vitamin vor enzymatischer Oxidation schützen. Gleichzeitig können aber, durch die thermi-

sche Instabilität des Vitamin C, Verluste durch hohe Temperaturen oder eine lange Behandlungsdauer auftreten. Besonders bei rohem Obst und Gemüse spielt die Probenhomogenität eine große Rolle. Der Vitamingehalt kann in Obst und Gemüse aufgrund vieler Faktoren, wie klimatischen Bedingungen, Umwelteinflüssen, Lagerung, Sorte, Jahreszeit oder Anbaubedingungen relativ stark variieren. Auch innerhalb eines Lebensmittels können beispielsweise unterschiedliche Gehalte in Stielen, Blättern oder Schalen vorliegen. All dies kann zu unterschiedlichen Analyseergebnissen führen. Daher ist es umso wichtiger die Entnahme einer homogenen Probe sicherzustellen, etwa indem eine große Menge der Probe homogenisiert wird und daraus eine Teilprobe zur Analyse gezogen wird. Die anschließende Wahl des Analysenverfahrens basiert meist auf Kriterien, wie Bestimmungsgrenze, linearer Bereich, Analysenpräzision, einfache Probenaufbereitung, geringer Arbeitsaufwand, verfügbares Laborequipment, Art der Probe, Analysendauer oder der Vermeidung von Matrixeinflüssen. Vitamin C kann mittels nasschemischer Methoden, wie Titration oder Photometrie, aber auch mittels instrumenteller Analytik, wie der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt werden. Der Fokus in dieser Arbeit liegt auf der Quantifizierung von Vitamin C in Obst und Gemüse mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion. Grundsätzlich basiert diese Methode auf der Oxidation des Vitamin C zur Dehydroascorbinsäure und der anschließenden Derivatisierung mit o-Phenylendiamin zu einer fluoreszierenden Verbindung.

Aus der Sicht des Analytikers/der Analytikerin ist es folglich bedeutend, dass der gemessene Wert möglichst dem wahren Wert entspricht. Demzufolge sollte der Gehalt an Vitamin C und das Verhältnis zwischen L-Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure durch die gewählte Methode möglichst wenig beeinflusst werden.

1.2 Chemische Eigenschaften von L-Ascorbinsäure

Die Struktur der L-Ascorbinsäure (AA) basiert auf einem C₆-Grundgerüst und ist damit ähnlich aufgebaut wie C₆-Zucker. Am Lactonring der AA befindet sich eine Endiol-Gruppe an den Atomen C₂ und C₃, welche für den sauren Charakter des Vitamins verantwortlich ist. Das Proton an der Hydroxylgruppe des C₃-Atoms dissoziiert bereits bei einem pK_{S1} von 4,13, wodurch das Anion, L-Ascorbat gebildet wird. Die dabei entstehende, negative Ladung wird über das π -Elektronensystem delokalisiert, und das Molekül dadurch mesomeriestabilisiert (siehe Abbildung 1). Aufgrund des niedrigen pK_{S1} liegt das Vitamin auch bei physiologischem pH-Wert als Anion vor. Die zweite Hydroxylgruppe hat, mit einem pK_{S2} von 11,6, nur einen sehr schwach sauren Charakter (1).

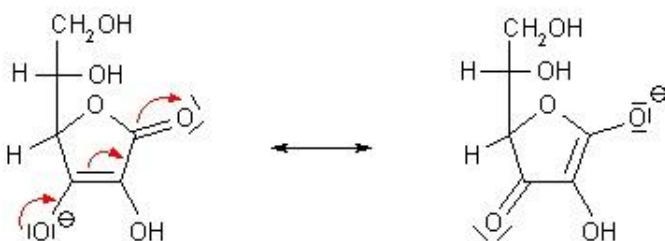


Abbildung 1: Mesomere Grenzstrukturen des L-Ascorbat-Anions

Als wasserlösliches Vitamin ist AA am besten in Wasser, und in einem geringeren Ausmaß auch in Methanol, Ethanol und Isopropanol löslich. Mit abnehmender Polarität des Lösungsmittels sinkt die Löslichkeit der AA. Bei einer Temperatur von 20°C löst sich, verglichen mit Wasser, in Methanol um 61%, in Ethanol um 91% und in Isopropanol um 97% weniger AA. In der chemischen Struktur der AA sind vier Hydroxylgruppen und zwei hydrophile Sauerstoffatome enthalten, mit denen Wassermoleküle naturgemäß Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Die Verbindung zu Methanol, Ethanol oder Isopropanol, die sich jeweils durch eine Hydroxylgruppe auszeichnen, ist schwächer als jene zu Wasser. Daher, und auch bedingt durch die zunehmende Kettenlänge, lösen alkoholische Verbindungen weniger AA. Außerdem wird die Löslichkeit stark von der Temperatur beeinflusst. Mit zunehmender Temperatur löst sich mehr AA. Vor allem in Lösungsmittelgemischen mit Wasser nimmt die Entropie einen großen Einfluss auf die Löslichkeit (2).

1.3 Oxidation der L-Ascorbinsäure

In trockener, kristalliner Form ist die L-Ascorbinsäure (AA) stabil. Liegt sie jedoch in Lösung vor, so kann sie durch Einflüsse wie pH-Wert, Temperatur, Licht oder durch die Anwesenheit von Kupfer- oder Eisenionen unter Umständen schnell oxidieren (1). Die Oxidation der AA

ist stark vom pH-Wert der Lösung abhängig und wird durch Metallionen beschleunigt. Ist eine Lösung komplett frei von Metallionen, so ist auch die spontane Oxidationsrate der AA, selbst bei einem pH-Wert von 7, sehr gering. Erst durch das Einbringen von Metallionen, beispielsweise über Pufferlösungen, nimmt die Oxidationsrate stark zu (3).

1.3.1 Oxidativer Abbau von Vitamin C

Die Reaktionsmechanismen beim oxidativen Abbau von Vitamin C sind in Abbildung 2 dargestellt. Im ersten Schritt der Abbaureaktion entsteht durch Oxidation der AA das Radikal Monodehydroascorbat (auch: Semidehydroascorbat oder Ascorbylradikal). Unter geeigneten Bedingungen kann das Radikal wieder zur AA reduziert werden, oder aber aus zwei Molekülen Monodehydroascorbat entstehen durch Disproportionierung je ein Molekül AA und DHAA (Dehydroascorbinsäure). Schreitet die Oxidation des Monodehydroascorbat jedoch voran, so bildet sich aus dem Radikal in weiterer Folge die DHAA und anschließend durch hydrolytische Ringspaltung die 2,3-Diketogulonsäure (DKG) (1, 4). Der letztere Schritt wird bei physiologischem pH-Wert als irreversibel angesehen, jedoch könnte die hydrolytische Ringspaltung unter bestimmten Bedingungen, wie etwa durch den Einsatz von Thiolverbindungen, zumindest teilweise reversibel sein (4).

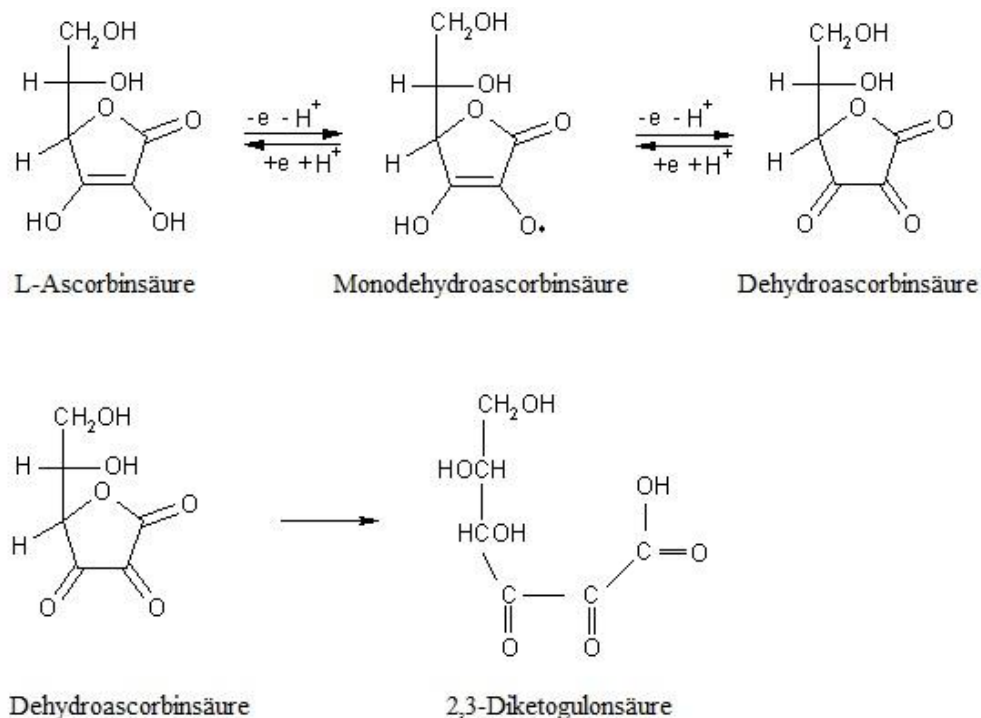


Abbildung 2: Oxidativer Abbau von Vitamin C: Oxidation der L-Ascorbinsäure zur Monodehydroascorbinsäure und weiter zur Dehydroascorbinsäure. Hydrolyse der Dehydroascorbinsäure zur 2,3-Diketogulonsäure.

1.3.2 Dehydroascorbinsäure

In Lösung liegt die Dehydroascorbinsäure (DHAA) bevorzugt als Hemiacetal vor und ist ebenso wie ihre reduzierte Form, die AA, in gelöster Form instabil. Ob die DHAA wieder zur AA reduziert wird oder zur DKG hydrolysiert und weiter oxidativ abgebaut wird, hängt von den umgebenden Bedingungen und Reaktionspartnern ab. Damit kann die DHAA sowohl als Oxidations-, aber auch als Reduktionsmittel agieren (4). Mit der hydrolytischen Ringspaltung der DHAA geht die Vitaminaktivität verloren. Die Hydrolyse zur DKG ist stark vom pH-Wert abhängig. Bei pH-Werten zwischen 2-3 ist die DHAA stabiler als bei physiologischem pH-Wert. Kommerziell ist die DHAA auch als Dimer erhältlich, und kann als Standard bei analytischen Bestimmungen verwendet werden. Je nach pH-Wert in dem es gelöst wird, kann die dimere Struktur der DHAA, entweder in das Monomer DHAA, oder in hydratisierte Dimere Verbindungen umgewandelt werden (siehe Abbildung 3). Für eine Verwendung der dimeren DHAA als Standardsubstanz sollte daher auf den verwendeten pH-Wert zum Lösen der Verbindung geachtet werden (5).

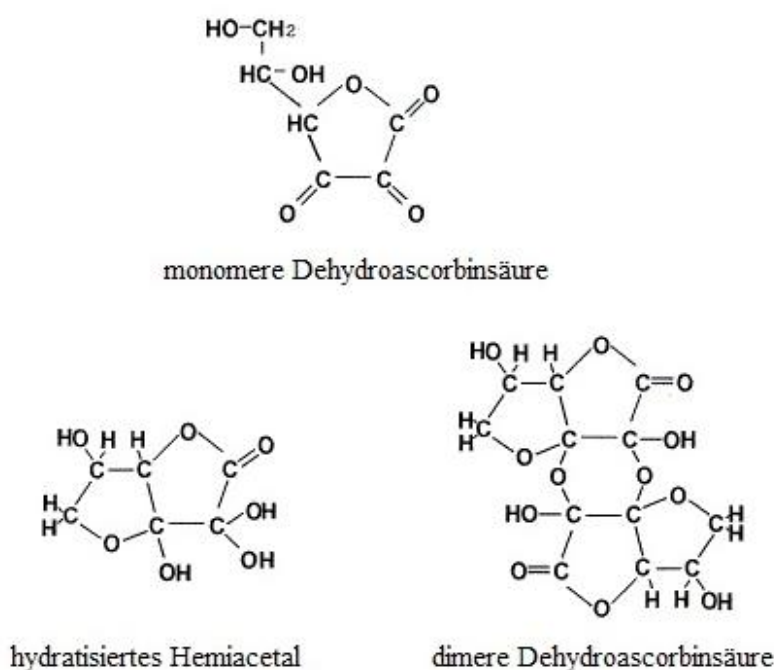


Abbildung 3: Strukturen der Dehydroascorbinsäure: monomere DHAA, hydratisiertes Hemiacetal, dimere DHAA.

1.3.3 Enzymatische Oxidation

Die Oxidation der L-Ascorbinsäure kann auch enzymatisch durch die Ascorbat-Oxidase erfolgen. Das Enzym katalysiert die Oxidation der AA bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und ist in der Pflanzenwelt weit verbreitet. Die Ascorbat-Oxidase wurde besonders in der Familie der Kürbisgewächse (*Cucurbitaceae*), beispielsweise in Gurken oder Kürbis,

reichlich nachgewiesen (6). Die Funktion der Ascorbat-Oxidase für den pflanzlichen Organismus ist derzeit noch nicht ganz klar, es wird aber ein Zusammenhang mit Zellwachstumsprozessen vermutet. Das Enzym kommt in Pflanzenzellen frei oder membrangebunden vor und wird vermehrt bei Stresszuständen exprimiert. Die Oxidation der AA wird über zentrale Kupferionen des Enzyms katalysiert (7). Das pH-Optimum der Ascorbat-Oxidase liegt bei einem pH-Wert von 6. Bei pH-Werten zwischen 5,5-7 liegt die Enzymaktivität bei 80% (6). Ab Temperaturen von 50°C nimmt die Aktivität der Ascorbat-Oxidase stufenweise ab, und durch eine thermische Behandlung von 10 min bei 80°C kann das Enzym komplett und irreversibel inaktiviert werden (7, 8). Das Inaktivierungsverhalten ist dennoch sortenabhängig und nicht unbedingt für jedes Lebensmittel gleich. Indem die enzymatische Oxidation der AA durch thermische Inaktivierung der Ascorbat-Oxidase unterbunden wird, kann die Stabilität von Vitamin C in Lebensmitteln wesentlich verbessert werden (7).

1.4 Bedeutung des Vitamin C für den Menschen

Bekannt geworden ist die L-Ascorbinsäure (AA) durch ihren antiskorbutischen Effekt. Heute werden dem Vitamin neben der wirksamen Behandlung bei Skorbut zahlreiche andere Funktionen im menschlichen Organismus zugeordnet. Die AA ist ein wichtiger Cofaktor in der Kollagensynthese, sowie der Biosynthese von Katecholaminen und Neurohormonen. Es zeigt außerdem unterstützende Wirkung auf das Immunsystem, und spielt eine Rolle als Antioxidans bei Alterungsprozessen oder bei Krankheiten, wie Krebs und kardiovaskuläre Erkrankungen, die mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden (1, 9). Sowohl AA, als auch DHAA können durch orale Aufnahme den Spiegel an Vitamin C im Blutplasma erhöhen und eine antiskorbutische Wirkung erzielen. Sie gelten daher beide als Vitamin-C-Quelle für den menschlichen Organismus (4, 9). Das Stereoisomer der L-Ascorbinsäure, die D-Isoascorbinsäure hingegen, zeigt kaum Vitamin-C-Aktivität (1). Der Vitamin-C-Gehalt von Lebensmitteln wird daher in der Regel als Summe von AA und DHAA, also Gesamtascorbinsäure (TAA), angegeben (9).

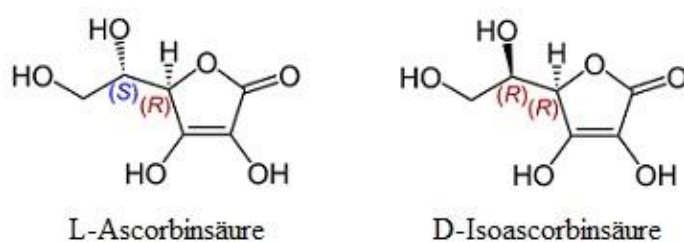
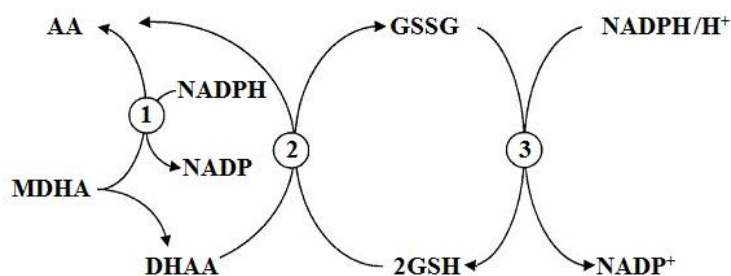


Abbildung 4: Stereoisomere L-Ascorbinsäure und D-Isoascorbinsäure

1.4.1 Funktionen des Vitamin C im Körper

Zu den grundlegenden Funktionen des Vitamin C in biologischen Systemen gehören die Aktivität als Cofaktor für Enzyme, sowie die Rolle als Radikalfänger und Elektronendonator bzw. -akzeptor. Als Cofaktor ist Vitamin C für den menschlichen Organismus vor allem in Bezug auf die Kollagenbiosynthese, sowie die Synthese von Katecholaminen wichtig. Das Vitamin sorgt dafür, dass Eisen- oder Kupferionen im aktiven Zentrum verschiedener Enzyme in ihre reduzierte Form überführt werden und steigert damit die Aktivität der Enzyme. Häufig handelt es sich dabei um Enzyme der Klasse der Oxidoreduktasen (1).

In Hinblick auf die antioxidativen Eigenschaften kann Vitamin C Radikalkettenreaktionen terminieren, sodass dabei keine weiteren radikalischen Produkte entstehen. Vielmehr stehen am Ende der Reaktion mit sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nicht-toxische Produkte, wie etwa DHAA oder DKG (1). Somit schützt die AA als Antioxidans gemeinsam mit Vitamin E low-density Lipoproteine vor oxidativen Schäden und beugt somit einer Lipidoxidation und Membranschäden vor. Dabei wirkt die AA als Elektronendonator für radikalische Verbindungen wie Hydroxylradikale oder Peroxylradikale und wird selbst zum Ascorbylradikal (Monodehydroascorbat) oxidiert. Dieses Radikal ist wenig reaktiv und wird entweder über den Ascorbat-Glutathion-Zyklus (siehe Abbildung 5) wieder reduziert oder disproportioniert zu AA und DHAA (3).



① Monodehydroascorbat-Reduktase

② Dehydroascorbat-Reduktase

③ Glutathion-Reduktase

Abbildung 5: Ascorbat-Glutathion-Zyklus: 1) Reduktion des Monodehydroascorbat (MDHA, Ascorbylradikal) zur L-Ascorbinsäure. 2) Reduktion der Dehydroascorbinsäure zur L-Ascorbinsäure. 3) Regeneration des Glutathion (GSSG → 2GSH) durch die Glutathion-Reduktase.

Da die Oxidation der AA über die Bildung des Ascorbylradikals erfolgt, können durch diesen Prozess sowohl reduktive als auch oxidative Vorgänge gefördert werden. Eben wegen dieser Radikalbildung zeigt das AA-DHAA-System mitunter auch pro-oxidative Effekte (4). Die

Kombination aus Eisenionen und AA wird beispielsweise in der organischen Chemie als oxidierendes System für die gezielte Oxidation von Verbindungen eingesetzt. Pro-Oxidative Effekte durch AA hängen auch im menschlichen Körper mit der Konzentration an freien Eisenionen im Plasma zusammen. Üblicherweise liegen Eisenionen im Plasma gebunden an Transportproteine, wie Transferrin oder Ferritin, vor. Eine unkontrollierte Freisetzung von protein-gebundenem Eisen kann in pathologischen Situationen, wie chronisch entzündlichen Krankheiten, vorkommen. Eine höhere Konzentration an freien Eisenionen in Verbindung mit AA kann schließlich zu vermehrter Bildung von Radikalen führen und damit pro-oxidativ wirken (3).

1.4.2 Zirkulation des Vitamin C im Körper

Schon während der Verarbeitung von Lebensmitteln über die Aufnahme des Vitamin C durch den Menschen, bis hin zu zellulären Mechanismen im Körper, in denen das Vitamin seine Wirkung entfaltet, kommt es immer wieder zu Redoxreaktionen zwischen AA und DHAA. Bereits im Lumen des Gastrointestinaltraktes kann AA die Oxidation von beispielsweise Flavonoiden oder Phenolen verhindern, indem es Elektronen abgibt und zur DHAA oxidiert. Im Dünndarm erfolgt schließlich die Absorption von Vitamin C durch die Enterozyten. Sowohl für AA, als auch für DHAA gibt es Transportmechanismen für die zelluläre Aufnahme. Die maximale Aufnahmerate ist für beide Verbindungen etwa gleich, allerdings kann Glukose die Aufnahme von AA hemmen. In den Enterozyten wird DHAA durch eine Reduktase wieder zur AA umgewandelt. Dadurch wird ein Konzentrationsgradient gebildet, welcher die Aufnahme von DHAA aus dem Gastrointestinaltrakt begünstigt. Über die Enterozyten gelangt das Vitamin in die Blutbahn, wo es schließlich zu den verschiedensten Zellen des menschlichen Körpers transportiert wird. Dort findet die AA Verwendung als Cofaktor für Enzyme oder als Antioxidans, wodurch wiederum DHAA gebildet werden kann (9). Einige Zellen, wie Erythrozyten, Hepatozyten oder glatte Muskelzellen können die entstandene DHAA wieder zur AA reduzieren, sodass das Vitamin wiederverwertet werden kann und nicht sofort ausgeschieden wird. Diese Reduktion wird bewerkstelligt durch komplexe Redoxsysteme in den Zellen, die NADPH, Glutathion oder andere Thiole beinhalten (4, 9).

1.4.3 Deckung des Vitamin-C-Bedarfes

Vitamin C ist ein in der Pflanzenwelt weit verbreitetes Vitamin und ist in vielerlei Obst und Gemüse zu finden. Daher ist ein Mangel an Vitamin C in entwickelten Ländern sehr selten und eher durch Alkoholismus oder Armut bedingt (1). Die empfohlene tägliche Zufuhrmenge

für Vitamin C liegt laut der Österreichischen Gesellschaft für Ernährung für 25- bis unter 51-jährige Personen, für Männer bei 110 mg und für Frauen bei 95 mg (10).

Die Deckung des Vitamin-C-Bedarfes kann über verschiedenste Obst- und Gemüsesorten erfolgen. Aus Tabelle 1 können die Angaben für Vitamin-C-Gehalte der "United States Department of Agriculture (USDA) Food Composition Database" und der "Souci-Fachmann-Kraut-Datenbank" für einige Obst- und Gemüsesorten entnommen werden. Dabei ist auffällig, dass unter den Gemüsesorten die Familie der Kreuzblütler (*Brassicaceae*), wie etwa Grünkohl oder Brokkoli, zu den Pflanzen mit den höchsten Vitamin-C-Gehalten zählen.

Tabelle 1: Obst und Gemüse mit hohen Vitamin-C-Gehalten. Angabe als Mittelwert in mg Gesamtascorbinsäure pro 100 g essbarer Anteil rohen Lebensmittels.

Lebensmittel	USDA (11) mg/100g	Souci, Fachmann, Kraut (12) mg/100g
Schwarze Ribisel	181	177
Paprika	128	121
Grünkohl	93	105
Brokkoli	89	100
Kohlrabi	62	63
Erdbeeren	59	63
Rotkraut	57	57
Orangen	59	49
Zitronen	53	51
Kartoffel	20	17

Obwohl Lebensmittel wie Paprika oder viele Kreuzblütler relativ hohe Gehalte an Vitamin C aufweisen, kommt es dennoch auch auf die verzehrte Menge, die Bioverfügbarkeit und Verluste während der Lagerung und Zubereitung an, wie stark ein Lebensmittel zur Deckung des Vitaminbedarfes beiträgt. Früchte werden beispielsweise häufiger roh verzehrt, wodurch Verarbeitungsverluste vernachlässigbar werden. Außerdem stabilisiert der vergleichsweise niedrige pH-Wert, etwa in Zitrusfrüchten, das Vitamin C während der Lagerung. Einen außerordentlichen Stellenwert zur Deckung des Vitamin-C-Bedarfes nehmen in Europa die Kartoffeln ein. Obwohl der Vitamin-C-Gehalt von Kartoffeln, verglichen mit anderen Lebensmitteln, nur im Mittelfeld liegt, tragen Kartoffeln in Europa aufgrund der großen Verzehrsmenge wesentlich zur Versorgung mit Vitamin C bei (1).

1.5 Einfluss von Umwelt- und Anbaubedingungen auf den Vitamin-C-Gehalt von Lebensmitteln

Der Gehalt an Vitamin C in Lebensmitteln kann auf vielfältige Weise, beginnend bei der Kultivierung von Pflanzen, bis hin zur Verarbeitung in der Küche, beeinflusst werden. Dabei spielen Umweltfaktoren, Anbau- und Lagerbedingungen, sowie Verarbeitungsprozesse, wie Zerkleinern, Blanchieren oder Gefrieren eine große Rolle (1).

Viele umweltbedingte Faktoren wie Anbaubedingungen, klimatische Einflüsse, der Reifungsprozess von Pflanzen, der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln oder die Sorte führen zu unterschiedlichen Vitamin-C-Gehalten in Lebensmitteln. So nehmen beispielsweise Licht, Temperatur, Trockenheits- und Salzstress, Umweltverschmutzung oder der Einsatz von Herbiziden schon während des Pflanzenwachstums Einfluss auf den Vitamingehalt. Durch starke Lichteinflüsse können Pflanzen vermehrt AA anreichern. Außerdem kann ein Wechsel von intensiven zu schwachen Lichtbedingungen zu einem vorübergehenden, schnellen Anstieg von AA führen. Zudem konnte in jungem, noch wachsendem Pflanzengewebe eine höhere Konzentration an AA nachgewiesen werden, die sich durch den Reifeprozess verändert. Auch saisonale oder tagesabhängige Unterschiede an AA-Gehalten wurden beobachtet, ebenso wie ein Zusammenhang mit der Ozonbelastung der Pflanzen. Es ist daher naheliegend, dass Pflanzen auf vorliegende Stressfaktoren reagieren und ihre antioxidativen Ansprüche, und damit den AA-Gehalt anpassen (1). In einer aktuellen Studie wurden Auswirkungen auf den Vitamin-C-Gehalt von Camu-Camu Früchten durch unterschiedliche klimatische Bedingungen, wie die intensivere Sonneneinstrahlung im Sommer und Anbaubedingungen, wie die Art Bodenbewässerung, sowie der Erntezeitpunkt beobachtet. So war etwa der AA-Gehalt von Proben aus überflutungsgefährdeten Gebieten höher. Außerdem konnten höhere Vitamin-C-Gehalte festgestellt werden, wenn Camu-Camu-Früchte in Monaten mit stärkerer Sonneneinstrahlung geerntet wurden (13).

Es ist außerdem nicht ungewöhnlich, dass von Frucht zu Frucht starke Schwankungen des Vitamin-C-Gehaltes auftreten. Abhängig von Sorte, Reifegrad, Fruchtgröße, Lichteinfluss und ähnlichen Faktoren wurden in diversen Studien beispielsweise bei Tomaten 7-fache, bei Äpfeln 10-fache, bei Orangen 3-fache oder bei Kiwis 7-fache Abweichungen des Vitamin-C-Gehaltes festgestellt (1). Eine Studie aus 2017 von Fang et al. untersuchte den Gehalt an AA in über 400 verschiedenen Sorten von Äpfeln aus aller Welt. Dabei konnte insgesamt eine mehr als 26-fache Abweichung des AA-Gehaltes zwischen den untersuchten Äpfeln festgestellt werden. Neben den kultivierten Sorten befanden sich unter den beprobten Äpfeln auch

wilde Sorten. Die wilden Sorten ergaben im Durchschnitt einen signifikant höheren Gehalt an AA. Außerdem wurde eine negative Korrelation zwischen dem AA-Gehalt und dem Fruchtgewicht sichtbar. Da kultivierte Äpfel häufig auf ein höheres Fruchtgewicht hin gezüchtet wurden, lässt sich dadurch der geringere AA-Gehalt im Vergleich zu wilden Sorten erklären. Auch der Einfluss des Reifegrades auf den AA-Gehalt wurde untersucht. Während in der Entwicklungsphase der Äpfel der Gehalt noch relativ hoch war, enthielten ausgereifte Äpfel zwischen 8-13 mal weniger AA. Die geografische Herkunft beeinflusste den Gehalt an AA hingegen nicht. Daher unterschieden sich die Vitamin-C-Gehalte von Äpfeln unterschiedlicher geografischer Herkunft nicht signifikant voneinander (14).

1.6 Lagerung und Verarbeitung von Lebensmitteln

Sowohl die Lagerung und Verarbeitung von Obst und Gemüse im eigenen Haushalt, als auch die industrielle Verarbeitung nehmen Einfluss auf den Vitamingehalt von Lebensmitteln. Üblicherweise werden klassische Verfahren, wie Gefrieren, Trocknen, Hitzebehandlungen in Form von Blanchieren oder Pasteurisieren, oder auch die Herstellung von Konserven angewandt. Eine große Rolle spielen dabei lebensmitteleigene Enzyme, die meist durch thermische Behandlungen inaktiviert werden. Andernfalls führen Enzyme, die während der Lagerung aktiv sind, unter Umständen zum Abbau von wichtigen Lebensmittelinhaltsstoffen, wie der AA, und damit zur Qualitätsminderung oder zum Verderb von Lebensmitteln. Für eine möglichst lange Lagerdauer und Erhalt der Lebensmittelqualität ist es daher besonders wichtig effektive, aber schonende Verarbeitungsmethoden zu wählen (1). Daher werden in diesem Kapitel auch neuere Verfahren zur Haltbarmachung von Lebensmitteln, wie Ohmsche Erhitzung, gepulste elektrische Felder und Hochdruckbehandlung thematisiert.

1.6.1 Verarbeitung im Haushalt

Es gibt wenige Daten zu Vitaminverlusten, die in der eigenen Küche entstehen. Werden jedoch Verarbeitungsverfahren angewandt, wie sie in der Industrie üblich sind, so sind ähnliche Verluste zu erwarten. Gefrieren ist in Haushalten eine weit verbreitete Methode um saisonales Obst oder Gemüse länger haltbar zu machen. Wird hier auf das Blanchieren von Gemüse vor dem Gefrieren verzichtet, so kann es zu beträchtlich höheren AA-Verlusten während der Tiefkühlagerung kommen. Auch durch die Art des Kochens entstehen Unterschiede in der Erhaltung von AA. Beim Dämpfen oder Garen in der Mikrowelle und unter Verwendung von möglichst wenig Wasser kommt es zu geringeren Vitaminverlusten. Vor allem, wenn im Verhältnis zum Gargut viel Wasser eingesetzt wird, können größere Mengen an wasserlöslichen

Vitaminen verloren gehen. Der Einfluss durch Auslaugung ist durchaus größer, als jener, der durch thermische Beanspruchung entsteht (1).

1.6.2 Lagerung und Zerkleinerung von Lebensmitteln

Während der Lagerung von Obst oder Gemüse wirken sich vor allem Enzymaktivität, Unversehrtheit und Lagertemperatur auf die Stabilität des Vitamin C aus. So ist beispielsweise leicht verletzliches Obst mit weicher Textur, wie Erdbeeren oder Himbeeren, anfälliger für Qualitätseinbußen (1). Mit zunehmender Lagerdauer sinkt der Anteil an AA in Obst und Gemüse und es kommt selbst bei Lagerung im Kühlschrank zu täglichen Verlusten an AA zwischen 2-7% (15). Aus einer Studie, in der die Kühlagerung von Erdbeeren untersucht wurde, ging hervor, dass der Gehalt an AA nach dem ersten Tag sinkt, aber zwischen dem 2.-5. Tag der Lagerung konnte kein Unterschied beobachtet werden. Der Gehalt an AA wird in Studien zur Lagerung und Verarbeitung von Lebensmitteln häufig untersucht, jedoch bleibt der Gehalt an TAA, der sich aus der Summe von AA und DHAA ergibt, oft unbeachtet. Dies kann schnell zu einer Unterschätzung des Vitamin-C-Gehaltes führen (16).

Durch das Schneiden von Lebensmitteln werden Stressreaktionen in Gang gesetzt. Vor allem für gebrauchsfertige Produkte kommt vorgeschnittenes Obst oder Gemüse zum Einsatz. An Blattspinat wurde gezeigt, dass durch das Schneiden der Blätter der Gehalt an AA bereits nach 1 h um 25% sinkt. Durch den zusätzlichen Vergleich zweier Lagertemperaturen, indem, sowohl geschnittener, als auch unverletzter Blattspinat bei 4°C und 20°C gelagert wurde, wurde der positive Effekt einer Kühlagerung sichtbar. Unter Kühlagerung bleibt die AA in Blattspinat generell über mehrere Tage wesentlich besser erhalten, als bei einer höheren Lagertemperatur (17).

1.6.3 Thermische Verarbeitung von Lebensmitteln

Thermische Behandlungen haben in der Lebensmittelverarbeitung vielseitige Wirkungszwecke, wie beispielsweise die Inaktivierung von Mikroorganismen und Enzymen, die Verbesserung der Extraktausbeute und der Schälbarkeit von Früchten oder die Austreibung von Sauerstoff durch Erhitzungsprozesse. Durch diese Effekte werden Lebensmittel haltbar gemacht und Qualitätseinbußen während der Lagerung vorgebeugt. Die L-Ascorbinsäure nimmt als Qualitätsparameter für thermische Behandlungen einen besonderen Stellenwert ein. Das Vitamin ist wasserlöslich und empfindlich gegenüber Einflüssen wie Temperatur, pH-Wert, Metallionen, Licht und Enzymen. Daher wird Vitamin C häufig als Referenzsubstanz für Nährstoffverluste während thermischer Behandlungen und für Verluste durch Auslaugung herangezogen. Damit können auch die Verluste von anderen Nährstoffen abgeschätzt werden. Die

Haupteinflussfaktoren für Vitamin-C-Verluste während der Verarbeitung sind thermisch oder enzymatisch, oder bei direkter Behandlung in Wasser, durch Auslaugung bedingt (18).

1.6.3.1 Konventionelle thermische Verfahren

Eine direkte Behandlung von Gemüse in kochendem Wasser resultiert in höheren Verlusten an Vitamin C, als durch Verfahren mit Heißdampf oder Mikrowellen. Beim direkten Blanchieren in heißem Wasser treten aber neben thermischen Verlusten, zu einem weitaus größeren Ausmaß, Verluste durch Auslaugung auf. Die Diffusion der AA in das Blanchierwasser steigt mit zunehmender Temperatur. Das Ausmaß der Diffusion kann reduziert werden, indem Blanchierwasser wiederverwendet wird. Sind bereits Stoffe im Wasser gelöst, so verringern sich weitere Verluste durch Auslaugung. Eine Mikrowellen- oder Infraroterhitzung reduziert die Verluste von wasserlöslichen Inhaltsstoffen, da es zu keiner Auslaugung kommt. Durch Mikrowellen oder Infrarotstrahlen erhitzte Lebensmittel konservieren Vitamin C daher in der Regel besser. Ein wesentlicher Nachteil ist jedoch die häufig inhomogene Erhitzung der Produkte und die limitierte Eindringtiefe, was diese Verfahren nur bedingt anwendbar macht. Unter den konventionellen thermischen Verfahren zählt daher die Behandlung mit Heißdampf zu den nährstoffschonenderen Verfahren mit einem großen Anwendungsgebiet (18).

Während der Erhitzung von Apfelpüree im Wasserbad konnte ein deutlicher Einfluss auf das Vitamin durch eine Temperaturerhöhung bis 60°C festgestellt werden. Je höher die Temperatur, desto mehr an AA geht verloren. Jedoch bleibt der Verlust bei Temperaturen von 60-80°C konstant, sodass eine Temperaturerhöhung hier keine Rolle mehr spielt. Stattdessen könnte die Sauerstoffverfügbarkeit in diesem Temperaturbereich der limitierende Faktor für den Abbau der AA sein (19).

Bei einem Vergleich von blanchierten (95°C, 3 min) und nicht blanchierten Proben konnte durch das Blanchieren mehr AA aus Brokkoli und Karotten erhalten werden. Während einer anschließenden Kühlagerung sinkt der Gehalt an AA in blanchiertem Brokkoli kontinuierlich von Tag zu Tag, während sich der Gehalt in blanchierten Karotten über 7 Tage nicht verändert. Bei der Kühlagerung von nicht blanchiertem Gemüse kommt es zu starken Verlusten an AA. Der Gehalt an TAA wurde jedoch in dieser Studie nicht berücksichtigt. Somit kann nicht genau gesagt werden, ob es zu einem kompletten Verlust an Vitamin C oder zu einer Verschiebung des Verhältnisses zwischen AA und DHAA kam (20).

An Maroni wurden verschiedene Zubereitungsarten auf ihre Auswirkungen auf den Gehalt an TAA untersucht. Durch Kochen in Wasser kommt es zu Verlusten zwischen 25-54% und durch Rösten belaufen sich die Vitamin-C-Verluste auf 2-77%, abhängig von der getesteten

Sorte. In manchen Maroni-Sorten ist das Vitamin C also stabiler gegenüber Erhitzungsprozessen. Dies kann an vielerlei Faktoren liegen, wie etwa der Beschaffenheit der Hülse, unterschiedliche Diffusivität oder dem Gehalt an Mineralien, da Metallionen den Abbau des Vitamins begünstigen können (21).

Neben unterschiedlichen Temperatureinflüssen kann auch die Inaktivierung von Enzymen den Vitamin-C-Gehalt beeinflussen. Eine thermische Inaktivierung der Ascorbat-Oxidase führte in einer Studie, in der verschiedenes Obst und Gemüse getestet wurde, zu einem höheren Gehalt an TAA, als aus frischen Lebensmitteln. Der Anteil an AA ist jedoch bei frischen, als auch bei erhitzten Proben, sehr gering. Einerseits wird durch die Erhitzung, andererseits durch enzymatische Aktivität ein Teil der AA zur DHAA oxidiert, was in einem verminderten Anteil an AA resultiert (22). An Karotten wurde beobachtet, dass der Verlust an TAA während einer Hitzebehandlung mit zunehmender Temperatur steigt. Durch eine kurze Hitzeschockbehandlung der Karotten ($>80^{\circ}\text{C}$, 5 min) kann die enzymatische Aktivität der Ascorbat-Oxidase weitgehend gehemmt werden, sodass eine Oxidation der AA zur DHAA verhindert wird. Wird die Ascorbat-Oxidase nicht inaktiviert, so kann es zu einer starken Verschiebung des AA-DHAA-Verhältnisses in Richtung DHAA kommen (7).

1.6.3.2 Ohmsche Erhitzung

Bei der Ohmschen Erhitzung wird die Hitze direkt im Lebensmittel erzeugt. Das Lebensmittel wird von elektrischem Strom durchflossen und stellt dabei einen Widerstand dar, der sich erwärmt. Das Ausmaß der Erhitzung ist also von der angelegten elektrischen Spannung und der elektrischen Leitfähigkeit des Produktes abhängig. Die Ohmsche Erhitzung ist ein energieeffizientes Verfahren mit schneller und homogener Erhitzung des Produktes (18). Mit Ohmscher Erhitzung kann eine Kurzzeit-Hochtemperatur-Pasteurisierung durchgeführt werden und der Erhitzungsprozess kann unverzüglich gestoppt werden, ohne den Effekt einer Nacherhitzung. Während der Behandlung werden die Moleküle durch das elektrische Feld polarisiert. Durch Anlegen einer Wechselspannung und Änderung der Frequenz kann der Prozess der Polarisation beeinflusst werden. Dies kann sich auf die Stabilität von Nährstoffen auswirken. Aus Versuchen von Ohmscher Erhitzung an Acerola ist hervorgegangen, dass bei geringer Frequenz (10 Hz) weniger AA ermittelt werden konnte. Der Grund dafür ist wahrscheinlich die Elektrolyse von Wasser und damit verbundene Entstehung von Sauerstoff, wodurch vermehrt AA oxidiert wird. Eine Ohmsche Erhitzung mit höheren Frequenzen (>100 Hz) liefert vergleichbare Verluste an AA, wie eine konventionelle Erhitzung (23).

Weitere Versuche an Acerola zeigten, dass es höhere Verluste an TAA gibt wenn eine höhere Spannung (200 V) angelegt wird. Durch Erhitzung mit einer geringeren Spannung sind die Verluste insgesamt geringer, und auch geringer als durch eine konventionelle Erhitzung im Wasserbad. Bei dem Vergleich von oxidiert und reduzierter Form des Vitamins wurde deutlich, dass die Verluste an TAA niedriger sind, als jene an AA. Somit findet zwar eine Oxidation der AA zur DHAA statt, aber nicht unbedingt ein weiterer hydrolytischer Abbau der DHAA. In der Lebensmittelverarbeitung ist es daher wichtig zwar den Gehalt an TAA zu erfassen, aber auch auf das Verhältnis zwischen AA und DHAA zu achten. Auch wenn beide Formen biologische Aktivität als Vitamin C haben, ist in Lebensmitteln dennoch der Anteil an AA wichtig für die antioxidativen Eigenschaften im Produkt (24).

1.6.3.3 Gefrieren und Gefriertrocknen

Durch das Gefrieren von Gemüse treten in der Regel AA-Verluste zwischen 10-40% auf. Beeinflusst wird diese Verminderung durch die Art wie das Gemüse vor dem Gefrieren blanchiert wird, durch die Zerkleinerungsweise und -größe, sowie durch Beschädigung des Gutes während der Ernte (1). Der Vergleich von verschiedenen Lagertemperaturen zeigt geringere Verluste an TAA mit sinkender Temperatur. Unter Tiefkühlagerung (-10 bis -20°C) kommt es bei einigen rohen Früchten, und auch bei gedünstetem Brokkoli und Spinat zu keinerlei Verlusten an TAA nach 7 Tagen. Bei Tiefkühlagerung von rohem Gemüse treten hingegen bereits nach einem Tag Verluste auf. Nach 7 Tagen Tiefkühlagerung liegen die Verluste an TAA bei rohem Brokkoli, Spinat und Kartoffeln bei 25-42%. Die Vitaminverluste während der Lagerung im Tiefkühler können also, je nach Lebensmittel und je nach Vorbehandlung stark variieren (25). Bei dem Vergleich von frischen und gefriergetrockneten Lebensmitteln auf ihren Gehalt an TAA wurden die Auswirkungen des Gefriertrocknens untersucht. Der Vergleich zeigte, dass durch eine Gefriertrocknung ein Teil der TAA verloren geht, und daher das Vitamin C nicht ausreichend stabilisiert wird (22).

1.6.4 PEF-Behandlung

Gepulste elektrische Felder (PEF, pulsed electric fields) werden als nicht-thermisches, energiesparendes Verfahren zum Zellaufschluss, beispielsweise zur Erhöhung der Saft- oder Ölausbeute in der Lebensmittelproduktion verwendet (26). PEF dient also häufig als zusätzliche Zellaufschlussmethode bei Extraktionsprozessen. Es kommt dabei zu einer sogenannten Elektroporation der Zellmembran, was die Diffusivität von Pflanzeninhaltsstoffen steigert (27). So kann beispielsweise die Ausbeute an Polyphenolen bei der Saftproduktion aus Heidelbeeren durch einen zusätzlichen Zellaufschluss mittels PEF gesteigert werden (28). Neben

der Anwendung bei Extraktionsprozessen kommt diese Art des Zellaufschlusses auch bei der Konservierung von Lebensmitteln zum Einsatz, indem pathogene Keime inaktiviert werden. Um eine vergleichbare Hemmung mikrobiellen Wachstums, wie durch thermische Pasteurisierung zu erzielen sind PEF-Behandlungen mit höherem Energieeintrag notwendig (29).

Durch eine PEF-Behandlung verbessert sich aber nicht nur die Extraktausbeute durch den stattfindenden Zellaufschluss, gleichzeitig können dadurch auch vermehrt Enzyme freigesetzt werden. Die Ascorbat-Oxidase, sowohl aus dem Zytosol, als auch von der Zellwand gebundene, steigert die enzymatische Oxidation der AA, was zu Vitaminverlusten führen kann. Durch den Zellaufschluss erhöht sich also mitunter die freie Enzymkonzentration, jedoch können bei hohem Energieeintrag ($>500 \text{ kJ/kg}$) Enzyme auch teilweise inaktiviert werden. Das behandelte Gut erwärmt sich durch intensivere PEF-Behandlungen, sodass sehr wahrscheinlich ein kombinatorischer Effekt aus PEF und steigender Temperatur Enzyme zu einem gewissen Grad inaktiviert. Bei einem Versuch in Karottenpüree wurde durch eine PEF-Behandlung eine Temperatur von knapp über 40°C erreicht und damit ein Teil der Ascorbat-Oxidase inaktiviert, obwohl das Enzym ansonsten bei $40\text{--}50^\circ\text{C}$ in der Regel noch stabil ist. Das Enzym ist also nach einer PEF-Behandlung weniger thermostabil. Die verringerte Enzymstabilität und -aktivität lässt sich durch eine veränderte Sekundärstruktur von Proteinen nach der Behandlung erklären (26). Auch bei anderen Molekülen, wie etwa dem Vitamin C, wurden Auswirkungen von PEF auf die Molekülstruktur untersucht. Die Behandlung mit gepulsten elektrischen Feldern kann eine Konformationsänderung der L-Ascorbinsäure bewirken. Es wurde davon berichtet, dass sich das Gleichgewicht zwischen der Endiol- und Ketoform vermehrt in Richtung Ketoform der AA verschiebt (siehe Abbildung 6). Dies kann beispielsweise für Fluoreszenzanalysen des Vitamin C von Bedeutung sein, da die Ketoform der AA, ebenso wie die Dehydroascorbinsäure ein fluoreszierendes Derivat mit o-Phenylendiamin bildet (30).

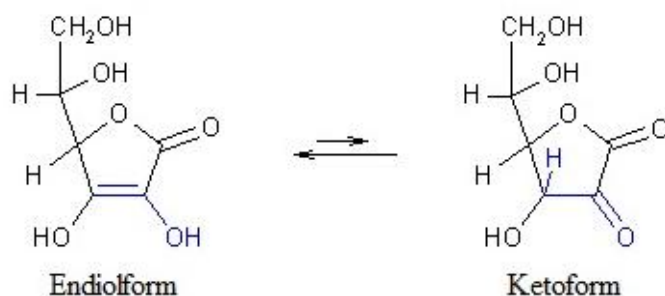


Abbildung 6: Keto-Enol-Tautomerie von Vitamin C: Natürliche Lage des Gleichgewichtes auf der Seite des Endiols.

Wie sich die PEF-Behandlung auf den Gehalt an Vitamin C in Lebensmitteln auswirkt hängt von den Behandlungsbedingungen ab. Einen großen Einfluss haben dabei die angewandte

Feldstärke und die Behandlungsdauer (27). Bei einer Untersuchung von Karottenpüree konnte durch diverse PEF-Behandlungen mit einem spezifischen Energieeintrag von rund 1–500 kJ/kg kein Verlust an Vitamin C festgestellt werden. Es verschob sich jedoch das Verhältnis von reduzierter und oxidiert Form des Vitamins in Richtung der DHAA (26).

1.6.5 Hochdruckbehandlung

Hochdruckbehandlungen werden als nicht-thermisches Verfahren zur Pasteurisierung von Getränken, wie Fruchtsäften eingesetzt. Dadurch können eine thermische Belastung und damit verbundene Vitaminverluste reduziert werden. Durch die Behandlung mit hohem Druck (400-600 MPa) werden vegetative Formen von Mikroorganismen zerstört und das Produkt dadurch haltbar gemacht. Die Gehalte an AA von unbehandelten und mit Hochdruck behandelten Fruchtsäften unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Eine Hochdruckpasteurisierung kann auch in Kombination mit einer thermischen Pasteurisierung erfolgen. Die Auswirkungen einer solchen Behandlung auf den Gehalt an AA wurden am Beispiel von Ananassaft untersucht. Bei der kombinatorischen Behandlung kann die Heißhaltezeit verkürzt werden und somit können auch die Verluste an AA, verglichen mit thermisch pasteurisiertem Saft, reduziert werden (31).

1.7 Extraktion und Stabilisierung von Vitamin C in Lösungen

Beide Formen des Vitamin C, AA und DHAA, besitzen biologische Aktivität, weshalb es bei der Analyse von Lebensmitteln wichtig ist den Gehalt an Gesamascorbinsäure (TAA) zu erfassen. Bei der Extraktion von Vitamin C aus Lebensmitteln kann die AA durch Einflüsse wie pH-Wert, Temperatur, Licht, Sauerstoff, Metallionen oder Enzyme schnell zur DHAA oxidiert werden. Infolgedessen kann es zum irreversiblen Verlust von Vitamin C durch die Hydrolyse der DHAA kommen. Eine große Herausforderung in der Probenvorbereitung ist es daher, nicht nur Vitaminverluste zu unterbinden, sondern auch das Gleichgewicht zwischen AA und DHAA nicht zu verändern und beide Komponenten zu quantifizieren. In frischem Obst und Gemüse liegt der Anteil an DHAA üblicherweise bei max. 10% der TAA, und steigt mit zunehmender Lagerdauer an (15). Der Anteil an DHAA lag bei, mit HPLC-MS/MS analysierten Paprika, Orangen, Zitronen und Tomaten zwischen 3-43% der Gesamascorbinsäure, wobei der Anteil an DHAA bei Zitrusfrüchten geringer ist als bei Paprika oder Tomaten (32). In, mit HPLC-UV/Vis analysierten tropischen Früchten machte der Anteil an DHAA maximal 10% der TAA aus (33). Neben der Vermeidung von Vitaminverlusten spielt bei der Extraktion von Vitamin C auch die Homogenität der Probe eine große Rolle. Bei Brokkoli gibt es beispielsweise unterschiedliche Vitamin-C-Gehalte in den Röschen und den Stielen, und das

Vitamin wird in unterschiedlichem Ausmaß enzymatisch abgebaut, was dazu führt, dass in Röschen weniger TAA festgestellt werden konnte als in Stielen (34).

1.7.1 Extraktion von Vitamin C aus Lebensmitteln

Für die Extraktion von Vitamin C empfiehlt es sich möglichst frische Proben zu verwenden, da es auch bei Lagerung im Kühlschrank oder Tiefkühler zu Verlusten an AA kommen kann. Eine Gefriertrocknung von Tomaten vor der Extraktion führt ebenfalls zu Verlusten an AA. Es wurde jedoch in anderen Studien auch berichtet, dass sich gefriergetrocknete Lebensmittel nicht von frischen in ihren AA-Gehalten unterscheiden. Eine Gefriertrocknung scheint sich also abhängig vom Lebensmittel unterschiedlich auszuwirken (15).

Neben der Probenvorbereitung spielt auch die Wahl des Extraktionsmittels eine wichtige Rolle bei der Extraktion von Vitamin C aus frischen Lebensmitteln. Nach der Probenahme sollte möglichst rasch ein saures, stabilisierendes Milieu geschaffen werden. Eine Lösung aus meta-Phosphorsäure wird am häufigsten als Extraktionsmittel verwendet. Sie stabilisiert das Vitamin C, hemmt Enzymaktivität, sowie metallkatalysierte Oxidation und präzipitiert Proteine für ein klares Extrakt. Zusätzlich können EDTA oder Mononatriumglutamat die Stabilität des Vitamins verbessern (15).

Es gibt viele Studien in denen unterschiedliche Extraktionsmittel getestet wurden. Meist wird eine Lösung aus meta-Phosphorsäure (MPA) mit anderen Extraktionsmitteln verglichen. Cotrut und Badulescu (2016) zeigten, dass sich eine MPA-Lösung besser zur Stabilisierung der AA eignet als Zitronensäure. Der Gehalt an AA aus verschiedenen Lebensmitteln war in MPA-Lösung höher als in Zitronensäure-Lösung, mit Ausnahme von Orangen. Da Zitronensäure bereits ein natürlicher Bestandteil von Orangen ist, scheint sie als Extraktionsmittel in diesem Fall besser geeignet zu sein (35).

Die Extraktion mit einer Mischung aus 3% MPA und 8% Essigsäure zeigte sich bei tropischen Früchten als effizienter, und resultiert in stabileren Extrakten, als eine Extraktion mit 0,1% Oxalsäure. Außerdem können die MPA-Extrakte für 24 h bei 4°C gelagert werden, ohne dass sich die Konzentration an AA wesentlich ändert. Eine Lagerung der Extrakte bei -80°C ist für zumindest ein Monat möglich und die AA bleibt dabei stabil (33). Auch Klimczak und Gliszczyńska-Swigło berichteten 2015 von hoher Stabilität von MPA-Extrakten. Die Extrakte aus Fruchtsäften waren in dieser Studie für 24 h in 5%iger MPA-Lösung stabil (36).

Auch in einer wässrigen Lösung aus 0,05% EDTA bleiben die Konzentrationen an AA und DHAA bis zu 2 h nach der Extraktion aus rohem Obst und Gemüse stabil (32).

Bei der Extraktion und Stabilisierung von AA aus Camu-Camu-Früchten wiederum zeigt sich 0,05 M Schwefelsäure, der meta-Phosphorsäure überlegen (13).

Am Beispiel Brokkoli wurde mit kochender Extraktionslösung zur Inaktivierung von Enzymen gearbeitet. Die Heiextraktion mit Phosphatpuffer und EDTA resultiert in vergleichbaren Vitamin-C-Gehalten, wie eine Kaltextraktion mit MPA-Lösung. Eine Kaltextraktion mit Phosphatpuffer hingegen resultiert in der Umwandlung von AA zur DHAA durch oxidative Enzyme. Die Heiextraktion von Vitamin C ist jedoch nur bedingt zu empfehlen, da das thermisch instabile Vitamin dadurch teilweise zur DHAA oxidiert wird (34).

1.7.2 Stabilisierung von Vitamin C in Lösungen

Die Stabilität des Vitamin C ist abhängig von der Matrix, in die es eingebettet ist. Eigenschaften wie pH-Wert, Temperatur, Licht, Sauerstoff oder die Anwesenheit von Kupfer- oder Eise-nionen können zum Verlust von Vitamin C in Lösungen führen (1).

1.7.2.1 pH-Wert

Unter sauren Bedingungen ist die AA am stabilsten. Daher wird in der Regel eine saure Ex-traktion des Vitamins vorgenommen. Am häufigsten wird in Studien meta-Phosphorsäure als Extraktionsmittel verwendet (37). Herbig und Renard (2017) untersuchten den Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität von Vitamin C in Pufferlösungen. Für den Versuch wurden Cit-rat-Phosphat-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten verwendet, wobei sich Vitamin C bei einem pH-Wert von 3,5 am stabilsten zeigt. Das lässt sich dadurch erklären, dass dieser pH-Wert unter dem pK_{S1} der AA liegt, und diese somit vollständig protoniert vorliegt. Zusätzlich ändert sich mit dem pH-Wert auch das Verhältnis von Citrat- und Phosphat-Molekülen im Puffer. Die geringere Stabilität von Vitamin C bei hoherem pH-Wert kann daher auch durch die Komplexbildungseigenschaften der Puffersubstanz mit Metallionen beeinflusst werden (19). Rojas und Gerschenson (1997) zeigten nicht nur, dass AA mit steigendem pH-Wert zu-nehmend abgebaut wird, sondern auch, dass die Wahl der Säure die Stabilität des Vitamins beeinflusst. Sie verzeichneten einen hoheren Verlust an AA, wenn Phosphorsäure im Ver-gleich zu Zitronensäure verwendet wurde, um den pH-Wert einzustellen. Da das Citrat-Anion in groerem Umfang Metallionen komplexiert, als das Phosphat-Anion, schtzt es die AA besser vor Oxidation durch Metallionen (38). Untersucht man den Abbau von Vitamin C in realen Lebensmittelmatrices, so ergeben sich weitaus mehr Einflussfaktoren als in Pufferl-sungen. Dies zeigt ein Vergleich von Karotten- (pH 5,5) und Apfelpüree (pH 3,5) hinsichtlich der Stabilität von Vitamin C während einer Erhitzung auf 80°C. Trotz des geringeren pH-

Wertes ging im Apfelpüree mehr an Vitamin C verloren, als im Karottenpüree. Der pH-Wert scheint in diesem Fall also eine untergeordnete Rolle zu spielen (19).

1.7.2.2 Sauerstoff und Metallionen

Durch die Anwesenheit von Metallionen wird die Stabilität der AA in Lösungen verringert. Vor allem Cu^{2+} und Fe^{3+} beeinflussen die Stabilität des Vitamins negativ. Daher werden häufig Chelatbildner wie EDTA oder Mononatriumglutamat eingesetzt, um die AA in Lösung ausreichend zu stabilisieren (37). Auch Pufferlösungen können kleine Mengen an Metallionen enthalten und damit zu oxidativen Vorgängen beitragen (39, 40). Eine Oxidation von AA bedeutet jedoch nicht, dass das Vitamin C dadurch abgebaut wird, sondern es kann durchaus sein, dass sich nur das Verhältnis von AA und DHAA ändert, nicht aber Gehalt an TAA (39).

Bei der Untersuchung der Auswirkungen von Sauerstoff und Metallionen auf Abbaureaktionen der AA wurde diese durch den Zusatz von Kupferionen und unter Anwesenheit von Sauerstoff schneller abgebaut. Ein kompletter Ausschluss von Sauerstoff hemmt die Oxidation der AA, unabhängig von anwesenden Kupferionen. Durch den Zusatz von Chelatbildnern kann der oxidierende Effekt durch Metallionen ebenfalls unterbunden werden (40). Werden Metallionen durch die Verwendung von Reinstwasser komplett ausgeschlossen oder wird Sauerstoff durch eine Stickstoffatmosphäre komplett ausgeschlossen, so gibt es keine Vitamin-C-Verluste. Es findet also keine Hydrolyse der DHAA statt, da für einen kompletten Vitaminabbau beides, Metallionen und Sauerstoff notwendig sind (39).

Auch bei thermischen Behandlungen spielt der Sauerstoffeintrag eine Rolle. Mit steigender Temperatur sinkt die Konzentration an gelöstem Sauerstoff während eines Erhitzungsprozesses. Untersuchungen einer Ohmschen Erhitzung mit modifizierter Sauerstoffatmosphäre zeigten, dass AA in sauerstoffreichem Medium schneller abgebaut wird (41).

Zudem kann das Verhältnis zwischen Oberfläche und Füllvolumen, hinsichtlich des Sauerstoffeintrags, in vielen Bereichen der Lebensmittelverarbeitung von Bedeutung sein. Eine Studie von Herbig und Renard (2017) zeigte, dass je geringer das Füllvolumen im Verhältnis zur Oberfläche ist, desto größer ist das Ausmaß der Vitamin-C-Verluste während einer thermischen Behandlung. Durch längere Diffusionswege bei höherem Füllvolumen sinkt die Verfügbarkeit von Sauerstoff und damit finden weniger oxidative Vorgänge statt. Je größer, bei gleichbleibender exponierter Oberfläche, das Füllvolumen ist, desto weniger Vitamin C wird daher abgebaut (19).

1.7.2.3 Licht

Tageslicht kann die Stabilität der AA in Lösung negativ beeinflussen, da es sich bei dem Vitamin um ein leicht oxidierbares Molekül handelt. In manchen Studien werden daher braune Glaswaren, oder Aluminiumfolie verwendet, um Lichteinflüsse während der Probenaufbereitung zu mindern, oder auszuschließen (37).

1.8 Methoden zur quantitativen Bestimmung von Vitamin C

Da Vitamin C in Nahrungsmitteln weit verbreitet ist und häufig von Nährwertverlusten durch Lagerung oder Verarbeitung betroffen ist, dient es oft als Indikatorsubstanz für die Beurteilung der Lebensmittelqualität (1). Zur Bestimmung von Vitamin C können verschiedenste analytische Methoden angewandt werden. Dazu zählen titrimetrische, enzymatische, spektrophotometrische oder fluorometrische Methoden, ebenso wie Gas- oder Flüssigkeitschromatographie (36).

1.8.1 Titration

Durch Titration einer Lösung, in der AA enthalten ist, mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol (DCPI) kann der Gehalt an AA bestimmt werden. In sauren Lösungen, wie das bei AA-Lösungen in der Regel der Fall ist, färbt sich die Lösung durch DCPI pink. DCPI reagiert mit der AA und wird dabei reduziert. Solange DCPI mit AA reagiert ist die Lösung farblos. Die Lösung wird titriert, bis eine Farbumschlag nach pink erkennbar wird. In Abbildung 7 ist die Reduktion der Indikatorsubstanz DCPI zur farblosen Leukobase dargestellt (42).

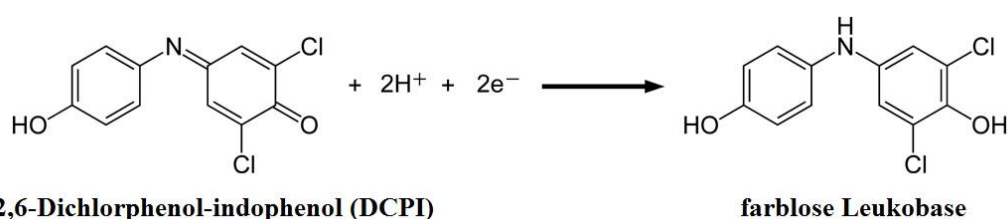


Abbildung 7: Reduktion von 2,6-Dichlorphenol-indophenol

Die titrimetrische Methode liefert Ergebnisse mit guter Analysenpräzision und ist, verglichen mit chromatographischen Methoden, mit geringeren Kosten und Aufwand verbunden. Bei der Bestimmung von AA durch Titration können jedoch, vor allem bei Proben mit komplexer Matrix, auch andere Probenbestandteile wie phenolische Verbindungen, Zucker oder Metallionen mit DCPI reagieren und somit das Ergebnis positiv verfälschen. Außerdem kann bei bereits gefärbten Lösungen, wie beispielweise bei der Analyse von Fruchtsäften, der Farbum-

schlag am Endpunkt der Titration schwieriger erkennbar sein. Zu beachten ist, dass mit dieser Methode nur der Gehalt an AA, nicht aber TAA erfasst werden kann (13, 42, 43).

1.8.2 Spektrophotometrie

Auch die spektrophotometrische Bestimmung der AA basiert auf einer Redoxreaktion. Durch die AA werden Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen reduziert. Das im Reaktionsansatz enthaltene Cuproin reagiert wiederum mit Kupfer(I)-Ionen zu einem gefärbten Komplex, dessen Absorption bei 545 nm im Spektrophotometer gemessen wird. In Abbildung 8 ist die Komplexbildung zwischen Kupfer(I)-Ionen und Cuproin dargestellt (42).

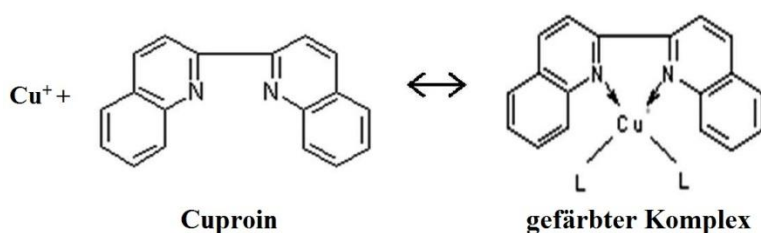


Abbildung 8: Komplexbildung zwischen Cu^+ und Cuproin

Im Vergleich zur titrimetrischen Bestimmung von AA, ist die spektrophotometrische Bestimmung ein empfindlicheres Analysenverfahren mit ebenso guter Analysenpräzision. Die Proben werden bei diesem Verfahren stärker verdünnt als bei der Titration, was Einflüsse durch andere Probenbestandteile oder die Eigenfärbung einer Probe vermindert. Dadurch ist eine bessere Richtigkeit der Ergebnisse, im Vergleich zur Titration gegeben. Auch die spektrophotometrische Methode stellt eine kostengünstige Alternative mit geringerem Aufwand zu chromatographischen Methoden dar (42).

1.8.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

HPLC-Methoden zur Bestimmung von Vitamin C finden große Anwendung, da sie in der Regel selektiver sind als spektrophotometrische oder titrimetrische Methoden, und sich, abhängig von der gewählten Detektionsart, durch eine hohe Empfindlichkeit auszeichnen. Die Auftrennung erfolgt am häufigsten mittels Umkehrphasenchromatographie, aber es kommen auch andere Trennprinzipien, wie Ionenaustausch-, Ionenausschluss- oder hydrophile Interaktionschromatographie zum Einsatz. In der Umkehrphasenchromatographie kommen üblicherweise C-18 Säulen (Octadecylsilan) zum Einsatz. Für eine ausreichende Retention in C-18 Säulen ist es wichtig, dass der Analyt nicht ionisiert vorliegt. Daher werden zur Auftrennung von Vitamin C mobile Phasen mit einem pH-Wert, der kleiner als der pK_{S1} der AA ist, verwendet. Bei der Detektion von Vitamin C liegt die größte Herausforderung darin, beide

Formen des Vitamins, AA und DHAA, zu bestimmen. Dazu ist es notwendig entweder eine der beiden Formen mittels Reduktion oder Oxidation jeweils in die andere umzuwandeln, oder zwei Detektionsarten zu koppeln (37).

1.8.3.1 UV-Detektion

In der UV-Detektion zeigen AA und DHAA unterschiedliches Absorptionsverhalten. Während AA das Absorptionsmaximum bei 244-265 nm hat, zeigt die DHAA nur eine geringe Absorption bei Wellenlängen über 220 nm, was eine direkte Detektion der DHAA schwierig macht. Möglichkeiten um dieses Problem zu umgehen sind einerseits eine Derivatisierung der DHAA, um die Absorptionseigenschaften zu verbessern, oder andererseits die Reduktion der DHAA zur AA. Bei Letzterem wird die Probe zweimal injiziert. Einmal wird die Originalprobe analysiert, um den Gehalt an AA zu bestimmen, und ein weiteres Mal wird die Probe nach der Reduktion analysiert, um den Gehalt an TAA zu bestimmen. Der Gehalt der DHAA errechnet sich anschließend aus der Subtraktion von TAA und AA. Die Grenzen der UV-Detektion liegen darin, dass es bei komplexen Matrices zu Interferenzen im Chromatogramm kommen kann, sobald andere organische Moleküle eine ähnliche UV-Absorption wie die L-Ascorbinsäure zeigen (37).

Wird lediglich die AA, ohne Einsatz eines Reduktionsmittels, erfasst, so sind die Gehalte aus rohen Lebensmitteln in der Regel geringer, als aus Lebensmitteln, die zuvor thermisch behandelt wurden. Die Bestimmung des Anteils der AA ist daher unter Umständen eine Herausforderung. Wird ein Reduktionsmittel zur Bestimmung der TAA verwendet, so ergeben sich für rohe Lebensmittel meist höhere Gehalte, als für verarbeitete Lebensmittel. TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin) als Reduktionsmittel ist in einem sauren Medium, wie es bei der Analyse von Vitamin C der Fall ist, effizienter als DTT (Dithiothreitol). Durch eine Behandlung mit TCEP konnten in MPA-Extrakten aus Kartoffeln höhere Vitamin-C-Gehalte ermittelt werden, als mit DTT (44).

1.8.3.2 Fluoreszenzdetektion

Die Fluoreszenzdetektion wird aufgrund der aufwendigeren Probenvorbereitung weniger häufig verwendet, als die UV-Detektion. Weder AA noch DHAA besitzen Fluoreszenzeigenschaften. Daher wird die DHAA üblicherweise mit o-Phenylendiamin in ein fluoreszierendes Derivat umgewandelt. Die Derivatisierung kann vor oder nach der Auftrennung in der Säule erfolgen. Eine simultane Bestimmung der AA und DHAA ist möglich, indem sowohl UV-, als auch Fluoreszenzdetektion verwendet werden. Dabei wird die AA mittels UV-Detektion und durch eine nachgeschaltete Fluoreszenzdetektion das DHAA-Derivat erfasst. Sollen beide

Formen des Vitamins lediglich durch Fluoreszenzdetektion bestimmt werden, so ist eine Oxidation der Probe notwendig. Um den Gehalt an TAA zu ermitteln, wird die AA komplett zur DHAA oxidiert und anschließend derivatisiert. Durch Subtraktion von TAA und DHAA, ergibt sich dann, analog zur UV-Detektion, der Gehalt für die AA (37). In Abbildung 9 ist die Reaktion der DHAA zum fluoreszierenden Derivat dargestellt.

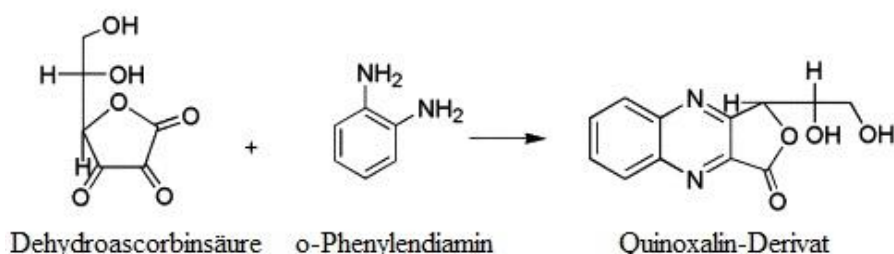


Abbildung 9: Reaktion der DHAA mit OPDA zum fluoreszierenden Quinoxalin-Derivat.

1.8.3.3 Elektrochemische Detektion

Mit elektrochemischen Detektoren kann die AA relativ einfach detektiert werden, während die DHAA wiederum über die Subtraktions-Methode ermittelt werden muss. Elektrochemische Detektoren sind, im Vergleich zu UV-Detektoren, empfindlicher und spezifischer, sodass Interferenzen aus komplexen Matrices eliminiert werden. Nachteilig an dieser Detektionsart ist, die im Allgemeinen sehr lange Equilibrierung der Säule, die zu größerem Zeitaufwand führt (37).

1.8.3.4 Massenspektrometrie

In massenspektrometrischen Analysen wird häufig, nicht nur das Vitamin C, sondern es werden auch andere Komponenten gleichzeitig bestimmt. Häufig wird eine Elektrospray-Ionisation eingesetzt. Dadurch kann die AA gut detektiert werden, bei der DHAA kann es jedoch, abhängig vom pH-Wert, zu Problemen durch eine Hydrolyse des Moleküls kommen (37). Auch Fenoll et al. berichteten 2011 von Schwierigkeiten die DHAA mittels Massenspektrometrie zu bestimmen, weil sich unter Umständen ein hydratisiertes Hemiacetal der DHAA bilden kann. Zudem waren in dieser Studie Matrixeffekte sichtbar, weswegen statt einer Grundkalibrierung eine Standardaddition zur Quantifizierung von AA und DHAA verwendet wurde. Ein wesentlicher Vorteil dieser Detektionsart ist die simultane Bestimmung der AA und DHAA. Zudem ist dafür keine Oxidation, Reduktion oder Derivatisierung notwendig, was die Probenvorbereitung einfacher gestaltet (32).

2 Material und Methoden

2.1 Probenbeschreibung

Frisches Obst und Gemüse wurde in lokalen Supermärkten im Zeitraum von April-August 2018 gekauft und mindestens innerhalb von 24 Stunden nach Kühl Lagerung im Dunkeln zur Vitamin-C-Bestimmung verwendet.

- Kopfsalat aus Österreich
- Apfel Gala aus Österreich
- Rispenparadeiser aus Österreich
- hohes C Frühstückssaft aus Orangen- (40 %), Apfel-, Trauben-, Acerola-, Zitronen- und Karottensaft, MHD 11.09.2018
- Ja! Natürlich Bio Brokkoli aus Italien
- Avocado aus Südafrika
- Gurke aus Österreich
- Heidelbeeren aus Österreich, Obstbau Hofleitner, 7212 Forchtenstein
- grüner Paprika aus Österreich
- SPAR Natur*pur Bio Brokkoli aus Italien
- SPAR Brokkoli aus Österreich, Buchinger Franz, 3142 Perschling
- Kiwi aus Neuseeland

Bei der Auswahl der Lebensmittel wurde darauf geachtet frisches Obst und Gemüse mit möglichst unterschiedlicher Matrix, von niedrigen bis hohen Vitamin-C-Gehalten, und aus verschiedenen botanischen Klassen zu wählen, um ein breites Spektrum an Lebensmitteln abzudecken und mögliche Interferenzen der Matrix oder Probleme in der Probenaufbereitung darzulegen.

2.2 Chemikalien und Laborausstattung

In Tabelle 2 und Tabelle 3 sind die verwendeten Chemikalien und die Laborausstattung aufgelistet.

Tabelle 2: Chemikalienliste

Name	Hersteller
meta-Phosphorsäure	Sigma-Aldrich
Essigsäure (Eisessig)	Chem-Lab NV
Methanol	VWR
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich
o-Phenylendiamin (OPDA)	Sigma-Aldrich
Ammoniumacetat	Carl Roth
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP)	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
Aktivkohle, säuregewaschen (Norit)	Sigma-Aldrich

Tabelle 3: Laborausstattung

Name	Hersteller
Zentrifuge	Beckman J2-HS
Wasserbad	
Trockenschrank	Memmert UFE 600
HPLC-Doppelkolbenpumpe	Shimadzu LC-10AD
HPLC-Fluoreszenzdetektor	Shimadzu RF-535
HPLC-UV/Vis-Detektor	Waters 484 Tunable Absorbance Detector
HPLC-Säule	ACE-1212504: C18-Umkehrphasensäule (100 Å Porengröße, 5 µm Partikelgröße, 4 mm Int. Ø, 250 mm Länge)
HPLC-Software	Shimadzu Class VP Vers. 4.3
Analysenwaage	Acculab Atilon
Vollpipetten, Kolbenhubpipetten	
PEF-Anlage	DIL Quakenbrück, Deutschland
Kombidämpfer	Rational
Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm	
Faltenfilter Nr. 520, 595	Whatman
Exsikkator	
Temperaturfühler	
Labormixer	Kinematica Microtron MB 550

2.3 Methoden

2.3.1 Methodentest und -optimierung

Zur Optimierung einer Methode, mit welcher in möglichst vielen, unterschiedlichen Lebensmitteln der Vitamin-C-Gehalt bestimmt werden kann, wurde die Methode von Dodson et al. aus 1992 aufgegriffen. Dabei handelt es sich um eine HPLC-Messung mit Fluoreszenzdetektion. Zu Beginn wurde die Methode anhand von L-Ascorbinsäure Standardlösungen getestet, um möglichst optimale Einstellungen der HPLC, wie etwa Flussrate oder Laufmittel, zu ermitteln. Außerdem war es wichtig einen praktikablen, zuverlässigen und ökonomischen Ablauf der Probenvorbereitung, beginnend bei der Extraktionsmittelmenge, über Filtrations- und Zentrifugationsschritte, bis hin zur Derivatisierung, zu erproben und zu definieren. Dazu wurden einige Modifikationen der ursprünglichen Methode vorgenommen: Vergleich verschiedener Extraktionsmittel, Überprüfung der Notwendigkeit eines zusätzlichen Klärungsschrittes während der Probenaufbereitung, mögliche Reduktion des Chemikalienverbrauches, passende Probenmenge bei rohem Obst und Gemüse und ein geeignetes Verhältnis von Probenmenge zum Extraktionsmittel. Die leicht modifizierte Methode wird unter Punkt 2.3.3 ausführlich beschrieben und wurde so für die verschiedenen Analysen verwendet.

2.3.2 Unterscheidung in L-Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure und Gesamtascorbinsäure

Zudem wurde versucht mit der Methode von Dodson et al. (1992) eine Unterscheidung zwischen L-Ascorbinsäure (AA), Dehydroascorbinsäure (DHAA) und Gesamtascorbinsäure (TAA) zu erreichen. Dazu wird das Vitamin C aus Lebensmitteln extrahiert. Das erhaltene Extrakt enthält sowohl AA, als auch DHAA. Zum Einen wird also die natürlicherweise in Lebensmitteln enthaltene DHAA direkt nach der Extraktion derivatisiert. Zum Anderen wird das gesamte enthaltene Vitamin C über Aktivkohle oxidiert und derivatisiert, um den Gehalt an TAA zu bestimmen. Aus der Differenz von TAA und DHAA ergibt sich anschließend der Gehalt an AA im Lebensmittel. In vielen Studien, die mit UV-Detektion arbeiten, wird eine Unterscheidung zwischen AA, DHAA und TAA gemacht (7, 8, 22, 26, 33, 34, 36, 44–52). Für die Fluoreszenzmethode wurde nach aktuellem Wissensstand bisher noch keine Studie mit diesem Ansatz veröffentlicht. Lediglich Kall et al. (1999) ermöglichte eine Unterscheidung zwischen AA und DHAA unter Verwendung eines Fluoreszenzdetektors. Dafür wurde die AA mit einem UV-Detektor analysiert. Die DHAA wurde nach der Säule derivatisiert und mit einem Fluoreszenzdetektor bestimmt. Somit wurden beide Formen des Vitamins in einem HPLC-Durchlauf bestimmt (53).

2.3.3 Vitamin-C-Bestimmung mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion

Die Methode zur Vitamin-C-Bestimmung mit Fluoreszenzdetektion entstammt aus der Abhandlung von Dodson et al. aus 1992 und wurde geringfügig modifiziert (54).

Folgende, grundlegende Schritte wurden durchgeführt: Zerkleinerung der Proben, Extraktion des Vitamin C, Oxidation der L-Ascorbinsäure zur Dehydroascorbinsäure, Derivatisierung und HPLC-Analyse (siehe Abbildung 10).

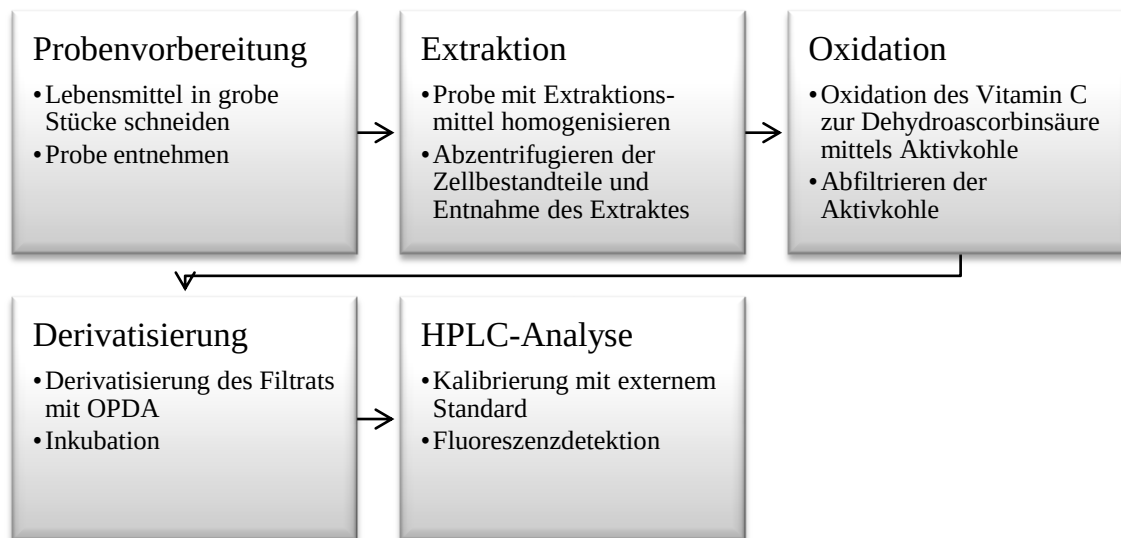


Abbildung 10: Flussdiagramm zur Vitamin-C-Bestimmung, HPLC mit Fluoreszenzdetektion

2.3.3.1 Probenvorbereitung

Um eine möglichst homogene Probe zu schaffen wurden die nicht essbaren Anteile der verwendeten Obst- und Gemüsesorten entfernt, und die Proben anschließend mit einem Messer in gleichmäßige Stücke geschnitten. Die Zerkleinerungsweise variierte dabei geringfügig, je nach Lebensmittel. Meist wurden die Lebensmittel in 1-2 cm große Würfel geschnitten. Heidelbeeren wurden aufgrund ihrer Größe nicht zerkleinert und der Kopfsalat wurde, wegen seines geringen Gewichtes, in gröbere, gleichmäßige Stücke geschnitten. Beim Brokkoli wurde der Hauptstrunk entfernt und einzelne Röschen mit einem kleinen Rest an Strunk abgeschnitten. Größere Röschen wurden nochmals halbiert, damit eine möglichst homogene Größenverteilung erreicht wurde. Die zerkleinerten Lebensmittel wurden kurz durchmischt und anschließend wurde daraus eine Probe von 25 g entnommen.

2.3.3.2 Extraktion

Als Extraktionsmittel wurde, sofern nicht anders angegeben, eine wässrige Lösung aus 3% meta-Phosphorsäure (w/v) und 8% Essigsäure (v/v) verwendet. Die entnommene Probe wurde gravimetrisch auf 100 g mit Extraktionsmittel aufgefüllt und 1 min lang im Labormixer

homogenisiert. Zur Mehrfachbestimmung wurde aus dem Homogenisat die gewünschte Anzahl an Proben zu je 20 g entnommen, in 25 ml Falcons überführt und für 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ in einen 50 mL Messkolben überführt und mit Extraktionslösung bis zur Marke aufgefüllt.

2.3.3.3 Oxidation

Zur Bestimmung der Gesamtascorbinsäure wurde anschließend die L-Ascorbinsäure zur Dehydroascorbinsäure oxidiert. Dazu wurde das Extrakt aus dem 50 mL Messkolben mit ca. 1 g Norit in einem Erlenmeyerkolben vermengt, mit einem Glasstopfen verschlossen und 30 Sekunden lang kräftig geschüttelt. Das Gemisch wurde dann über einen Glastrichter mit Faltenfilter (Whatman Nr. 595 und 520) filtriert, sodass eine klare Lösung erhalten wurde. War das Extrakt nicht klar, so wurde es zusätzlich über einen Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm) filtriert, oder ein Klärungsschritt mit wässriger Natriumacetat-Lösung, wie von Dodson et al. 1992 beschrieben, wurde eingesetzt. Dieser Schritt kann vor Allem bei Proben mit höherem Fettgehalt notwendig sein.

2.3.3.4 Derivatisierung

Die Derivatisierung der Dehydroascorbinsäure erfolgte mit o-Phenylendiamin (OPDA, 2,5 mg/mL in mobiler Phase gelöst). Dazu wurden, je nach erwartetem Gehalt, 0,5 - 3 mL des Proben-Filtrats und 3 mL der OPDA-Lösung in einem 10 mL Messkolben mit Laufmittel auf Volumen gebracht. Die Proben sollten idealerweise in Konzentrationen zwischen 1-3 µg/mL injiziert werden. Zur Minimierung von Lichteinflüssen wurden nach Möglichkeit braune Messkolben verwendet. Der Reaktionsansatz wurde kurz geschüttelt, und dann im Dunkeln, bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert.

2.3.3.5 Kalibrationsstandards

Für die Standardgerade wurde eine L-Ascorbinsäure Stocklösung von 1 mg/mL in Extraktionslösung (3% MPA, 8% Essigsäure) hergestellt. Vor Gebrauch wurde die Stocklösung 1:100 mit Extraktionslösung verdünnt. Ebenso, wie die Proben, wurde die Standardlösung mit ca. 1 g Norit oxidiert, und anschließend zu einer klaren Lösung filtriert. Aus dem Filtrat wurde schließlich eine Standardreihe wie folgt erstellt:

Tabelle 4: Pipettierschema der Standardreihe zur Fluoreszenzdetektion

Standard #	Standard-Filtrat (10µg/mL)	OPDA-Lösung (2,5 mg/mL)	Endkonzentration
S1	0,5 mL	3 mL	0,5 µg/mL
S2	1 mL	3 mL	1 µg/mL
S3	2 mL	3 mL	2 µg/mL
S4	3 mL	3 mL	3 µg/mL
S5	5 mL	3 mL	5 µg/mL

Analog zu den Proben wurde die benötigte Menge an Standard gemeinsam mit der OPDA-Lösung in 10 mL Messkolben pipettiert, mit Laufmittel auf Volumen gebracht und dunkel inkubiert. Das Derivat ist für ca. 6 h bei Raumtemperatur stabil.

Für jede Messreihe wurde eine eigene Kalibriergerade mit externen Standards erstellt. Die Standards wurden so gewählt, dass sie den erwarteten Konzentrationsbereich der Proben umfassen. Die Kalibrierung ergab stets ein Bestimmtheitsmaß (R^2) größer als 0,99. Die aus der Regressionsgeraden erhaltene Kalibrierfunktion ($y = k \times x + d$) wurde zur Errechnung der Analytkonzentration in der Probe verwendet.

2.3.3.6 HPLC-Analyse

Die HPLC-Analyse erfolgte mit einer ACE C18-Umkehrphasensäule (100 Å Porengröße, 5 µm Partikelgröße, 4 mm Int. Ø, 250 mm Länge), mit Vorsäule, bei einer Flussrate von 0,7 mL/min und einem Druck von durchschnittlich 170 bar. Als Laufmittel wurde eine Mischung von 55% Methanol und 45% UHQ-Wasser zur isokratischen Elution verwendet. Die Probe wurde über eine Probenschleife mit 20 µL Injektionsvolumen injiziert. Der Fluoreszenzdetektor wurde auf eine Anregungswellenlänge von 350 nm und eine Emissionswellenlänge von 430 nm eingestellt. Eine Messung dauerte 10 min, wobei das Dehydroascorbinsäure-Derivat nach ca. 4 min eluierte.

2.3.4 Vitamin-C-Bestimmung mittels HPLC und UV-Detektion

Die Bestimmung von Vitamin C durch UV-Detektion hat einen ähnlichen Arbeitsablauf, wie jene mit Fluoreszenzdetektion, und wurde daher als Vergleichsmethode herangezogen. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass zur Erfassung der Gesamtascorbinsäure eine Reduktion der Dehydroascorbinsäure zur L-Ascorbinsäure, anstatt einer Oxidation in umgekehrter Richtung, stattfindet. In der Literatur ist die Methode mit UV-Detektion, aufgrund ihrer etwas einfacheren Anwendbarkeit häufiger zu finden. Für die Analysen im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu die Methodenbeschreibung von Munyaka et al. aus 2010 herangezogen (34). In Abbildung 11 ist der Analysenablauf in einem Fließschema dargestellt.

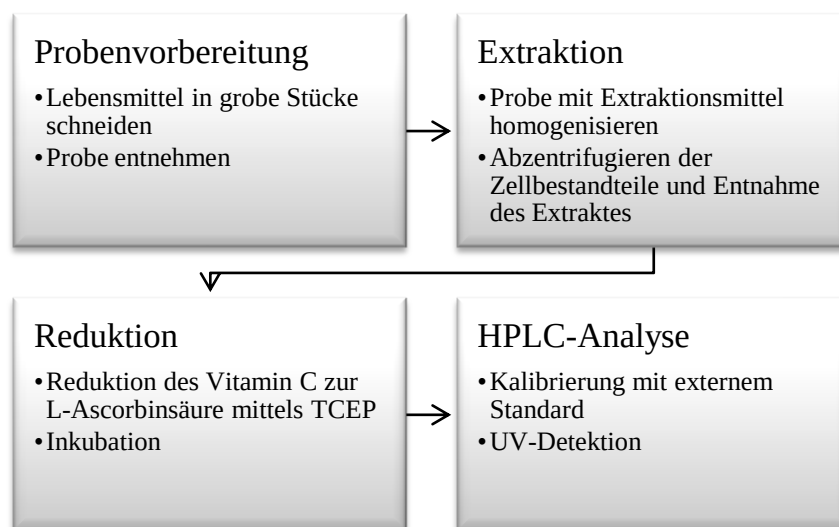


Abbildung 11: Flussdiagramm zur Vitamin-C-Bestimmung, HPLC mit UV-Detektion

2.3.4.1 Probenvorbereitung und Extraktion

Die Probenvorbereitung und -extraktion unterscheidet sich nicht von der Fluoreszenzmethode und kann daher Punkt 2.3.3 entnommen werden. Nach dem Abzentrifugieren der Zellbestandteile wurden ca. 2 mL des Überstandes mit einem Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm) filtriert. 1 mL des Filtrates wurde für die Reduktion und anschließende Bestimmung der TAA verwendet. Der Rest des Filtrates wurde direkt zur Bestimmung der AA injiziert.

2.3.4.2 Reduktion

Zur Reduktion der DHAA wurde TCEP verwendet. Dazu wurden, wie von Munyaka et al. beschrieben, 2,5 mM TCEP, 1 mM EDTA und 20 mM NaH₂PO₄ in deionisiertem Wasser gelöst. Für die Reduktion wurde 1 mL des Proben-Filtrats mit 1 mL TCEP-Lösung versetzt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend bei Raumtemperatur für mind. 30 min dunkel inkubiert.

2.3.4.3 Kalibrationsstandards

Die Standardgerade wurde mit einer L-Ascorbinsäure Stocklösung von 1 mg/mL (gelöst in Extraktionslösung: 3% MPA und 8% Essigsäure) hergestellt. Die Stocklösung wurde vor Gebrauch 1:10 mit Extraktionsmittel verdünnt. Anschließend wurde die Standardreihe, wie in Tabelle 5 dargestellt, jeweils in 10 mL Messkolben pipettiert und mit Laufmittel bis zur Marke aufgefüllt.

Tabelle 5: Pipettierschema der Standardreihe zur UV-Detektion

Standard #	Stocklösung (100 µg/mL)	Endkonzentration
S1	1 mL	10 µg/mL
S2	2 mL	20 µg/mL
S3	3 mL	30 µg/mL
S4	5 mL	50 µg/mL

2.3.4.4 HPLC-Analyse

Zur Analyse mit UV-Detektion wurde dasselbe HPLC-System mit der gleichen Flussrate, wie bei der Fluoreszenz-Methode verwendet. Der Druck war mit durchschnittlich 95 bar bei der UV-Methode geringer und es wurde ein anderes Laufmittel verwendet, wie in der Studie von Munyaka et al. aus 2010 angegeben. Die Elution erfolgte isokratisch mit einem Laufmittel, bestehend aus einer wässrigen Lösung von 10 mM Ammoniumacetat und 1 mM EDTA, pH 3. Die Probe wurde über eine Probenschleife mit 20 µL Injektionsvolumen injiziert. Der UV-Detektor wurde auf eine Wellenlänge von 245 nm eingestellt. Ein Messdurchgang dauerte 10 min und die L-Ascorbinsäure eluierte nach ca. 4 min.

2.3.5 Standardadditionsversuche

Die Wiederfindungsrate der Methode wurde durch die Addition von Standards in verschiedenen Konzentrationen ermittelt. Gleichzeitig konnten damit Matrixeffekte sichtbar gemacht werden. Dafür wurden die Proben und die Stocklösung des AA-Standards (10 µg/mL), wie im Methodenteil (Punkt 2.3.3) beschrieben bis zur Derivatisierung aufbereitet. Zur Derivatisierung wurde anschließend die Probe und die gewünschte Menge an Standard gemeinsam mit dem Derivatisierungsreagenz in 10 mL Messkolben mit Laufmittel auf Volumen gebracht. Die Standardlösung wurde so zur Probenlösung addiert, dass dadurch Endkonzentrationen von 1, 2, 3 und 5 µg Standard pro mL erreicht wurden. Die Wiederfindungsrate wurde aus der Probenkonzentration [µg/mL] nach folgender Formel berechnet (55):

$$WFR[\%] = \frac{(PST - P)}{ST} \times 100$$

WFR Wiederfindungsrate

PST Analysenergebnis aufgestockte Probe in µg/mL

P Analysenergebnis Probe ohne Standard in µg/mL

ST Soll-Konzentration des addierten Standards in µg/mL

2.3.6 Gravimetrische Bestimmung der Trockensubstanz

Die Ermittlung der Trockensubstanz erfolgte im 3-fachen Ansatz nach der Methode beschrieben im Lehrbuch Lebensmittelanalytik 2014 von R. Matissek, G. Steiner, M. Fischer. Zur Vorbereitung wurden Wägeschälchen aus Aluminium bodenbedeckt mit Seesand gefüllt, ein Glasstab zum Vermischen der Probe in das Schälchen gelegt und anschließend wurden die Schälchen im Trockenschrank bei 103 ± 3°C über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Schälchen zum Abkühlen in den Exsikkator gestellt. Anschließend wurde, nachdem das Leergewicht notiert wurde, die Probe (ca. 5 g) in das Schälchen eingewogen, die Einwaage notiert und die Probe gut mit dem Seesand vermischt. Die Proben wurden dann bis zur Massenkonstanz über Nacht im Trockenschrank getrocknet. Nach Abkühlen im Exsikkator konnte die Trockenmasse bestimmt werden, indem die Schälchen mit getrockneter Probe gewogen wurden. Die Trockensubstanz errechnet sich nach folgendem Zusammenhang (55):

$$TM[\%] = \frac{(m_3 - m_1)}{m_2} \times 100$$

TM Trockenmasse

m₁ Leermasse des Wägeschälchens (mit Seesand und Glasstab) in g

m₂ Probeneinwaage in g

m₃ Masse des Wägeschälchens (mit Seesand und Glasstab) und der Probe nach der Trocknung in g

2.3.7 Thermische Probenbehandlung

Um Auswirkungen auf den Vitamin-C-Gehalt, einerseits durch mögliche Enzyminaktivierung und andererseits durch thermische Belastung, zu ermitteln, wurden Proben in einem Wasserbad und mit einem Kombidämpfer gegart.

2.3.7.1 Wasserbad

Die in gleichmäßige Stücke geschnittene Probe wurde gemeinsam mit der Extraktionslösung in einen Kunststoffbeutel gefüllt und nicht ganz luftdicht verschlossen. Ein Temperaturfühler wurde mittels einer Dichtung durch die Beutelwand hindurch in ein Stück Probe gesteckt. Damit konnte die Temperatur im Inneren der Probe über die Behandlungsdauer, zusätzlich zur Temperatur des Wasserbades, aufgezeichnet werden. Der Beutel samt Probe und Extraktionsmittel wurde zur Behandlung in das auf 85°C vorgeheizte Wasserbad gehängt und ausreichend unter Wasser gedrückt. Auf diese Weise wurde die Probe mitsamt der Extraktionslösung für 7 min thermisch behandelt. Damit wurden mögliche Verluste durch Auslaugen direkt in der Extraktionslösung aufgefangen. Nach dem Blanchieren wurde der Beutel unter fließendem, kaltem Wasser gekühlt und die Probe rasch für die HPLC-Analyse verwendet.

2.3.7.2 Kombidämpfer

Die Probe wurde in gleichmäßig kleine Stücke geschnitten und auf einem Garblech ausgebreitet. In zwei Stückchen der Probe wurde ein Temperaturfühler gesteckt, um die Temperatur im Inneren des Gargutes aufzuzeichnen. Nachdem der Kombidämpfer die gewünschte Temperatur von 90°C und eine Luftfeuchtigkeit von 60% erreicht hatte, wurde das Blech mit der Probe in den Dämpfer geschoben. Das Gut wurde 7 min gegart, bis eine Kerntemperatur von 70°C erreicht wurde. Nach dem Blanchieren wurde die Probe rasch für die HPLC-Analyse verwendet.

2.3.8 PEF-Behandlung (pulsed electric field)

Für die Behandlung von Proben mit gepulsten, elektrischen Feldern wurde eine PEF-Anlage des Deutschen Instituts für Lebensmitteltechnik mit einer PEF-Zelle mit parallelen Plattenelektroden in einem Abstand von 135 mm verwendet. Die würfelig geschnittene Probe wurde gemeinsam mit Extraktionsmittel in die Zelle gefüllt. Damit die rohe Probe nicht oben aufschwimmt wurde sie mit einem Deckel aus Kunststoff dauerhaft in die Lösung getaucht. Anschließend wurde die PEF-Behandlung mit 200 Pulsen, einer Frequenz von 2 Hz, einer Pulsdauer von 100 µs und einer Feldstärke von 1 kV/cm durchgeführt. Der daraus resultierende

Energieeintrag belief sich auf 46 kJ/kg. Nach der Behandlung wurde die Probe rasch zur HPLC-Analyse verwendet.

2.4 Auswertung und statistische Analyse

Die Datenauswertung erfolgte mittels Microsoft Excel (2007) und IBM SPSS Statistics (Version 24). Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgt mittels Punkt-Streu-Diagramm und Säulendiagramm.

2.4.1.1 Normalverteilung und Varianzhomogenität

Tests auf Normalverteilung wurden optisch mit einem QQ-Plot und statistisch mittels Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Die Daten wurden auf Ausreißer getestet, indem ein Boxplot mit Ausreißern erstellt und eine z-Standardisierung durchgeführt wurde. Die Homogenität der Varianzen wurde durch einen Levene-Test ermittelt.

2.4.1.2 ANOVA oder T-Test

Für den Vergleich von 2 Gruppen wurde ein T-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Für den Vergleich von mehr als 2 Gruppen wurde bei gegebener Varianzhomogenität eine einfaktorielle ANOVA und ansonsten eine WELCH-ANOVA angewandt. Die Entscheidung, welche Gruppen sich statistisch signifikant voneinander unterscheiden wurde schließlich durch einen Games-Howell post-hoc Test (für inhomogene Varianzen) bzw. einen Tukey post-hoc Test (für homogene Varianzen) getroffen.

2.4.1.3 Statistische Auswertung der Standardaddition

Zur Kontrolle der Analysenpräzision wurden die Verfahrensstandardabweichung der Kalibrierfunktion und die Reststandardabweichung der Wiederfindungsfunktion berechnet. Vergleicht man diese beiden Werte mittels F-Test kann festgestellt werden, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Standardabweichungen vorliegt. Die Analysenpräzision ist gegeben, sofern es keinen signifikanten Unterschied gibt (56).

Die Prüfung auf systematische Abweichungen erfolgte anhand der Berechnung des Vertrauensbereiches (VB) für die Steigung und den Achsenabschnitt der Wiederfindungsfunktion. Um systematische Abweichungen ausschließen zu können, müssen die ermittelten Vertrauensbereiche jeweils die ideale Steigung mit einem Wert von 1, sowie den idealen Achsenabschnitt mit einem Wert von 0, einschließen (56).

Die dazugehörigen Formeln zur Kontrolle der Analysenpräzision und Berechnung der Vertrauensbereiche sind auf den Seiten 39-40 des Lehrbuches "Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie" aus dem Jahr 2005 von W. Funk, V. Dammann und G. Donnevert nachzulesen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Kalibrierdaten

In Abbildung 12 und Abbildung 13 sind Kalibriergeraden für HPLC-Messungen mit Fluoreszenz- oder UV-Detektion dargestellt.

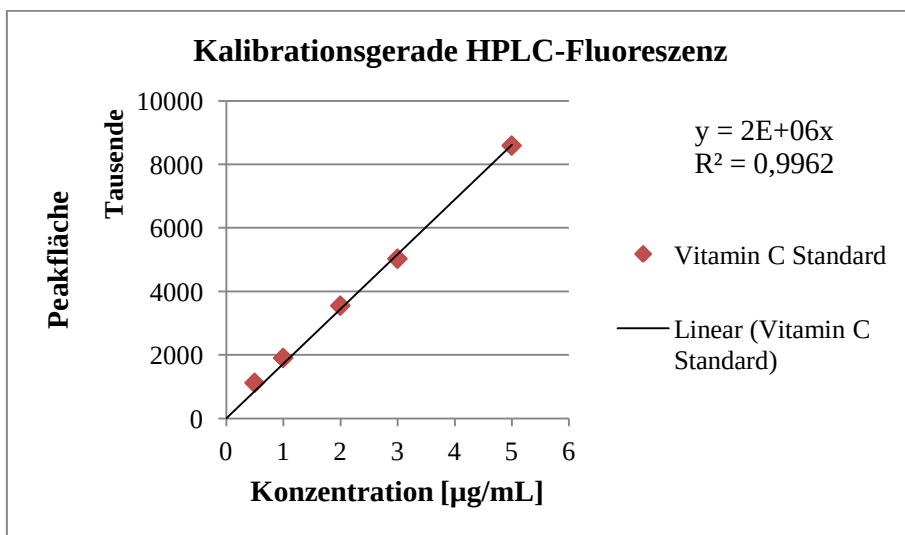


Abbildung 12: Kalibriergerade mit Vitamin C Standardlösungen für HPLC-Fluoreszenz-Analysen

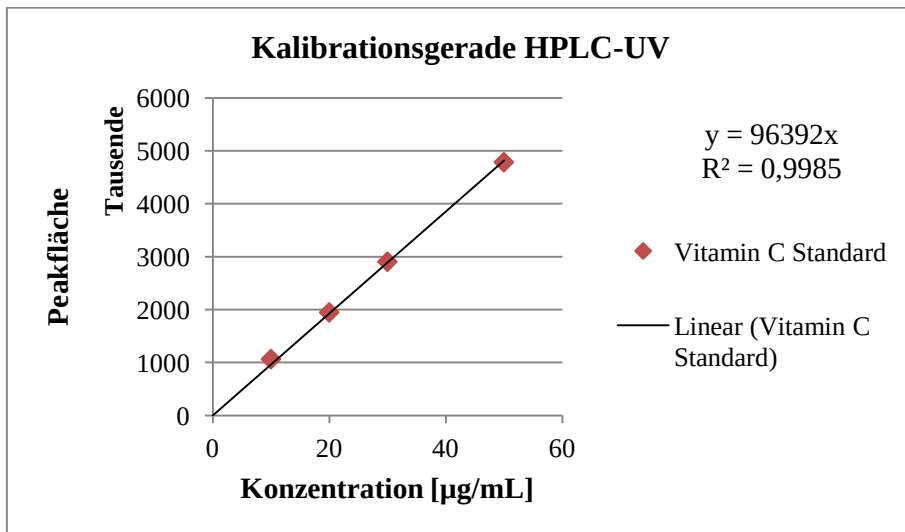


Abbildung 13: Kalibriergerade mit Vitamin C Standardlösungen für HPLC-UV-Analysen

Die Vitamin-C-Konzentration in den Kalibrierlösungen stellt die Endkonzentration vor Injektion der Probe dar. Standardsubstanz für die UV-Messung ist AA (L-Ascorbinsäure) für die Fluoreszenz-Messung das DHAA-Derivat (Dehydroascorbinsäure). Aus der Steigung (k) der

Kalibriergeraden lässt sich gut erkennen, dass die Messung mit dem Fluoreszenz-Detektor eine wesentlich höhere Steigung ergibt, als mit dem UV-Detektor. Das spiegelt die allgemein höhere Empfindlichkeit von Fluoreszenz-Detektoren gut wieder. Aufgrund der höheren Empfindlichkeit wird bei der Fluoreszenz-Methode in einem 10-fach geringeren Konzentrationsbereich, als bei der UV-Methode, gearbeitet. Die Proben werden zur Fluoreszenz-Detektion idealerweise in einer Konzentration von 3 µg/mL injiziert.

3.2 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze wurde durch das Signal-Rausch-Verhältnis von Standardlösungen ermittelt und ist definiert durch ein Signal, das mindestens 10-mal höher ist als das Hintergrundrauschen. Bei der hier verwendeten Methode mit Fluoreszenz-Detektion liegt die Bestimmungsgrenze als Signal-Rausch-Verhältnis bei 0,04 µg/mL. Burini (2007) kam bei einer ähnlichen Methode mit Fluoreszenz-Detektion auf eine Bestimmungsgrenze von 0,83 µg/mL. Dieser Wert wurde rechnerisch aus den Daten der Kalibriergeraden ermittelt und ergibt sich aus der 10-fachen Reststandardabweichung (s_y), dividiert durch die Steigung (k) (57). Wird die Bestimmungsgrenze, für die hier verwendete Methode, auf die gleiche Weise berechnet, so liegt sie bei 0,73 µg/mL, anstatt bei 0,04 µg/mL. Der errechnete Wert ist also beträchtlich höher, als jener, der durch das Signal-Rausch-Verhältnis festgestellt wurde.

Für die Bestimmung von Vitamin C mittels HPLC mit UV-Detektion werden in unterschiedlichen Studien Bestimmungsgrenzen, ermittelt durch das Signal-Rausch-Verhältnis, von 0,0025 - 24 µg/mL angegeben. Das Signal-Rausch-Verhältnis wird am häufigsten herangezogen, da es vergleichsweise einfach zu bestimmen ist und durch Änderung der chromatografischen Bedingungen optimiert werden kann (15). Jedoch wird für das Signal-Rausch-Verhältnis die Peakhöhe herangezogen, während der Analyt mittels Peakfläche quantifiziert wird. Zudem wird das Verhältnis unter Umständen subjektiv bestimmt und ist abhängig vom verwendeten Equipment. Daher können die daraus erhaltenen Werte für die Bestimmungsgrenze von Studie zu Studie relativ stark variieren und sind schwierig zu vergleichen. Neben dem Signal-Rausch-Verhältnis empfiehlt die ICH (Q2 (R1) part 2) auch eine rechnerische Methode basierend auf Kalibrierdaten, um die Bestimmungsgrenze zu ermitteln (58). Diese Methode wird, vermutlich aufgrund des größeren Aufwandes, weniger häufig verwendet (15). An der Berechnung der Bestimmungsgrenze aus Kalibrierdaten wird zudem kritisiert, dass dafür unterschiedliche Werte für die Standardabweichung herangezogen werden können. Einerseits kann die Standardabweichung auf der Messung von Blindproben, andererseits auf der Messung der Kalibriergeraden basieren, was unterschiedliche Ergebnisse liefern kann (58).

Somit sind Werte für Nachweis- oder Bestimmungsgrenzen nicht immer vergleichbar und es sollte für einen Vergleich darauf geachtet werden, mit welcher Methodik die Grenze festgelegt wurde. Außerdem sind die Grenzen auch vom angewandten Analysenverfahren abhängig, und sofern nicht exakt das gleiche Verfahren und die gleiche Ausstattung verwendet werden, variieren Bestimmungs- und Nachweisgrenzen aus unterschiedlichen Studien natürlicherweise. Es ist aber jedenfalls sinnvoll derartige Validierungsparameter und damit die Grenzen für die eigene analytische Methode zu kennen.

3.3 Standardadditionsversuche

Im Zuge von Standardadditionsversuchen wurden unterschiedliche Lebensmittelproben unter Zugabe von AA-Standardlösungen analysiert. Die Versuche wurden für die Methode zur quantitativen Bestimmung von Vitamin C mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion durchgeführt.

Die Wiederfindungsfunktion wurde ermittelt, indem die Soll-Konzentration mit der tatsächlich analysierten Konzentration des addierten Standards verglichen wurde. Mit einem Wiederfindungsversuch kann zum Einen überprüft werden, ob während der Probenaufbereitung Analytmoleküle verloren gehen. Zum Anderen können Matrixeinflüsse festgestellt werden (55, 56).

Mittels einer Standardaddition kann außerdem die Probenkonzentration ermittelt werden. Dabei handelt es sich um einen Wert, der um die Wiederfindung korrigiert ist. Wird die Probenkonzentration auf diese Weise ermittelt, so können Matrixeinflüsse eliminiert werden. Daher eignet sich diese Vorgangsweise gut für Proben, bei denen vermutet wird, dass ein Matrixeinfluss vorliegt (55).

Die Standardaddition wurde in vier unterschiedlichen Matrices durchgeführt. Dafür wurden folgende Lebensmittel ausgewählt:

- Paprika mit hohem, natürlichem Gehalt an Vitamin C
- Gurke mit niedrigem, natürlichem Gehalt an Vitamin C
- Heidelbeeren als Matrix reich an Polyphenolen
- Avocado als fettreiche Matrix

3.3.1 Wiederfindungsversuche

In Abbildung 14 bis Abbildung 17 sind die Wiederfindungsfunktionen verschiedener Lebensmittel für die quantitative Analyse von Vitamin C dargestellt. Dazu wurde die Soll-Konzentration gegen die gefundene Konzentration des addierten Standards aufgetragen. Die dadurch erhaltene Gerade gibt Auskunft über proportional- und konstant-systematische Abweichungen, die durch Analytverluste oder Matrixeffekte entstehen können. Idealerweise verläuft die Gerade durch den Nullpunkt (Achsenabschnitt $d = 0$) und besitzt eine Steigung (k) von 1. Liegen jedoch Abweichungen vor, so ändert sich die Steigung bei proportionalen Fehlern und der Achsenabschnitt bei konstanten Fehlern (55, 56).

Die Analysenpräzision wurde, wie im Methodenteil beschrieben mittels F-Test ($\alpha = 0,01$) überprüft. Zudem wurden die Vertrauensbereiche (VB) für die Wiederfindung der jeweiligen Lebensmittel berechnet um systematische Abweichungen statistisch abzusichern ($\alpha = 0,05$). Die Vertrauensbereiche sollten jeweils die ideale Steigung mit einem Wert von 1, sowie den idealen Achsenabschnitt mit einem Wert von 0 einschließen (56).

3.3.1.1 Wiederfindung Paprika

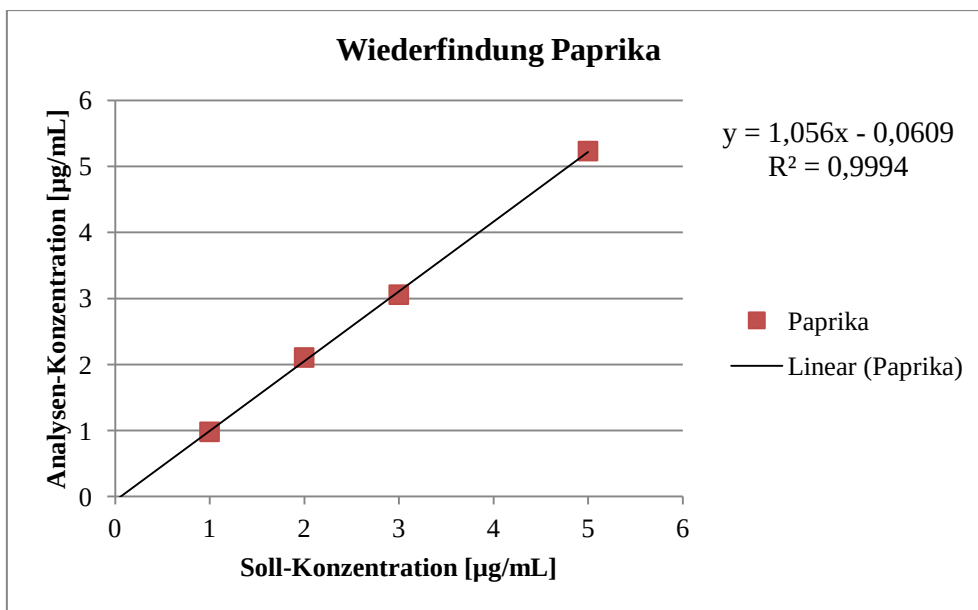


Abbildung 14: Wiederfindungsfunktion, roher, grüner Paprika.

Die Wiederfindung ist dargestellt als Korrelation zwischen der SOLL-Konzentration der addierten Standards (x), und dem Analyseergebnis der addierten Standards (y).

Die grafische Auswertung des Wiederfindungsversuches an rohem, grünem Paprika in Abbildung 14 liefert ein nahezu ideales Ergebnis. Die Gerade hat ihren Ursprung nahe am Nullpunkt und die Steigung ist nahezu 1, daher gibt es keine Hinweise auf einen Matrixeffekt.

Mittels F-Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Standardabweichungen der Kalibrierfunktion und der Wiederfindungsfunktion festgestellt werden. Die Analysenpräzision ist dadurch gegeben. Mit der Ermittlung des VB für die Wiederfindungsfunktion kann die Vermutung, dass kein Matrixeffekt vorliegt, statistisch abgesichert werden. Der Vertrauensbereich der Steigung schließt den Wert 1 mit ein und der Vertrauensbereich des Achsenabschnittes schließt den Wert 0 mit ein. Somit liegen keine konstant- oder proportional-systematischen Abweichungen vor.

3.3.1.2 Wiederfindung Gurke

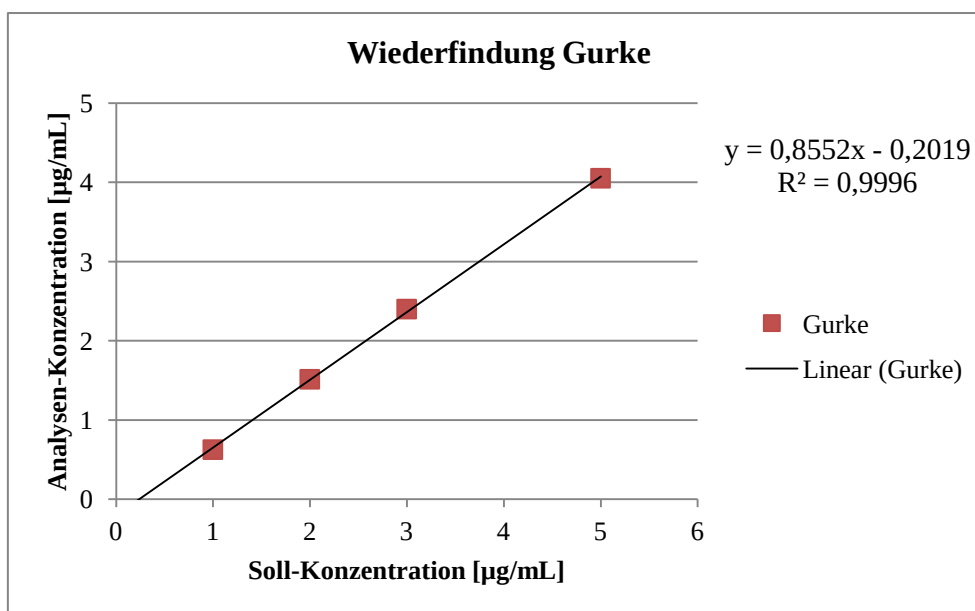


Abbildung 15: Wiederfindungsfunktion, rohe Gurke.

Die Wiederfindung ist dargestellt als Korrelation zwischen der SOLL-Konzentration der addierten Standards (x), und dem Analysenergebnis der addierten Standards (y).

Im Falle der Gurke ist in Abbildung 15 gut zu erkennen, dass sowohl die Steigung deutlich von 1 abweicht, als auch, dass der Achsenabschnitt verschoben ist. Die analysierten Konzentrationen sind allesamt niedriger als die erwarteten Soll-Konzentrationen.

Analysierte Konzentration:	0,6	1,5	2,4	4,1 µg/mL
Soll-Konzentration:	1	2	3	5 µg/mL

Daher ist anzunehmen, dass aufgrund eines konstanten Fehlers ein Teil des Analyten während der Probenaufbereitung verloren ging. In diesem Fall liegt wahrscheinlich eine systematische Abweichung vor.

Mittels F-Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Standardabweichungen der Kalibrierfunktion und der Wiederfindungsfunktion festgestellt werden. Die Analysenpräzision ist dadurch gegeben. Durch die Ermittlung des Vertrauensbereiches (VB) wurde die Vermutung einer systematischen Abweichung bestätigt. Weder der VB der Steigung schließt den Wert 1 mit ein, noch der VB des Achsenabschnittes schließt den Wert 0 mit ein. Daher liegt sowohl ein proportional-, als auch ein konstant-systematischer Fehler vor.

Ein Verlust des Analyten kann beispielsweise durch enzymatische Oxidation oder aber auch durch die oxidative Wirkung von Metallionen und Sauerstoff auftreten. In Gemüseextrakten, insbesondere von Kürbisgewächsen wie der Gurke, sind sowohl der Gehalt an Kupferionen,

als auch, die für Kürbisgewächse typisch, hohe Aktivität der Ascorbat-Oxidase, ausschlaggebend für die Oxidation von Vitamin C (59).

Da die Wiederfindung bei den anderen Proben jedoch ein gutes Ergebnis lieferte, obwohl davon auszugehen ist, dass auch bei diesen Proben Metallionen, Sauerstoff und die Ascorbat-Oxidase in Wirkung treten könnten, handelt es sich bei der Gurke wahrscheinlich um eine Ungenauigkeit, die etwa durch einen Pipettierfehler bei der Zugabe der Standardlösungen, oder Ähnlichem entstanden sein könnte.

3.3.1.3 Wiederfindung Heidelbeere

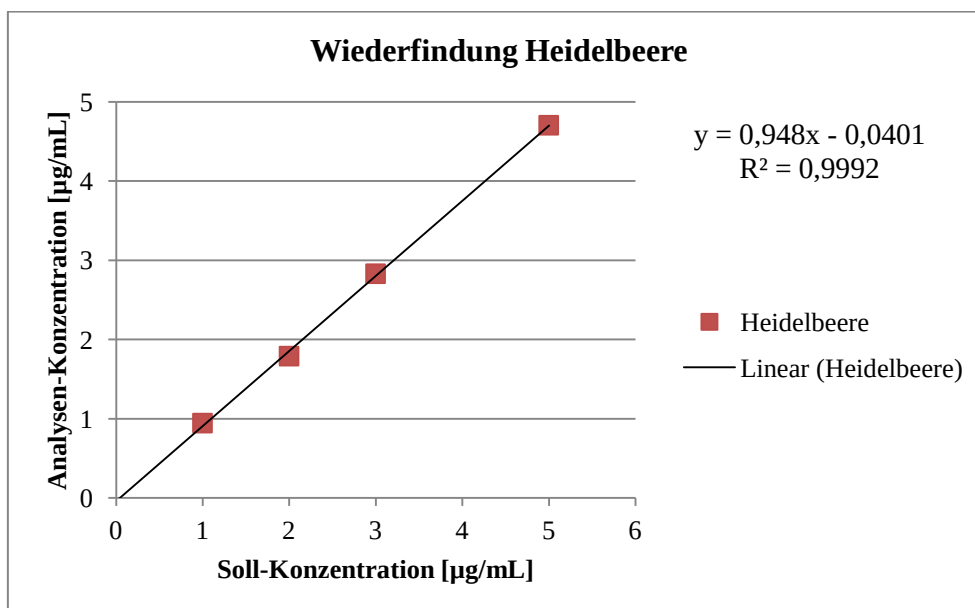


Abbildung 16: Wiederfindungsfunktion, rohe Heidelbeeren.

Die Wiederfindung ist dargestellt als Korrelation zwischen der SOLL-Konzentration der addierten Standards (x), und dem Analyseergebnis der addierten Standards (y).

Die Heidelbeere zeigt, ähnlich wie der Paprika eine gute Wiederfindungsfunktion. Die Steigung liegt nahe bei 1 und der Achsenabschnitt weicht nur geringfügig vom Nullpunkt ab. Daher liegen auch bei der Heidelbeere nach optischer Beurteilung keine Hinweise auf einen Matrixeffekt vor. Mittels F-Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Standardabweichungen der Kalibrierfunktion und der Wiederfindungsfunktion festgestellt werden. Die Analysenpräzision ist dadurch gegeben. Die Ermittlung der Vertrauensbereiche für die Steigung und den Achsenabschnitt bestätigte das Ergebnis der optischen Beurteilung. Es liegen keine proportional- oder konstant-systematischen Abweichungen vor.

3.3.1.4 Wiederfindung Avocado

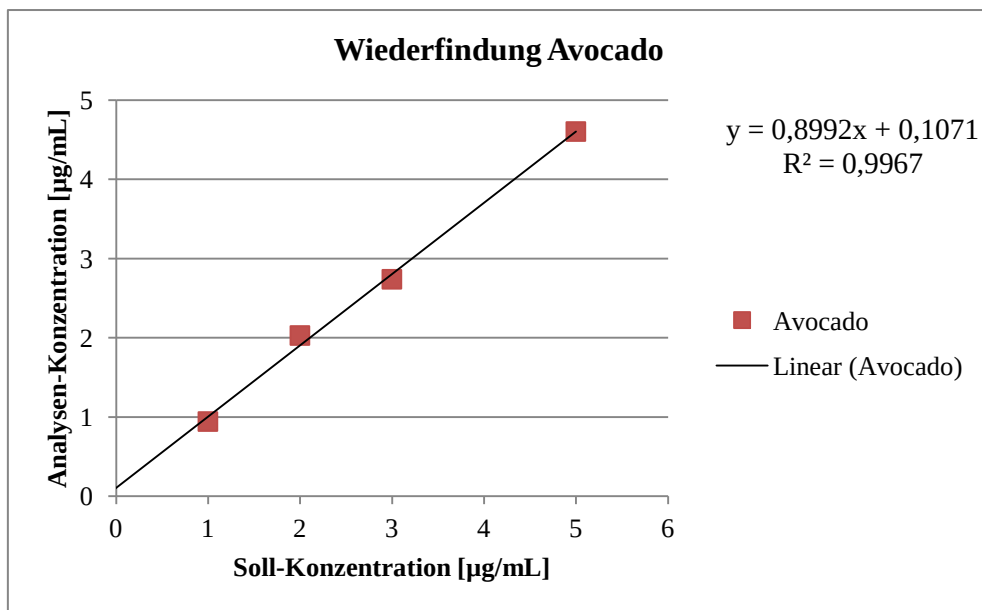


Abbildung 17: Wiederfindungsfunktion, rohe Avocado.

Die Wiederfindung ist dargestellt als Korrelation zwischen der SOLL-Konzentration der addierten Standards (x), und dem Analysenergebnis der addierten Standards (y).

Bei der Avocado zeigt sich eine leichte Verschiebung des Achsenabschnittes in den positiven Bereich. Das könnte ein geringer Matrixeinfluss sein. Auch die Steigung liegt mit 0,8992 unter 90% der idealen Steigung. Obwohl die Abweichungen gering sind, gibt es Tendenzen für systematische Abweichungen. Aus den Messwerten geht hervor, dass der Fehler bei geringer Konzentration kleiner ist und mit zunehmender Konzentration steigt.

Analysierte Konzentration: 0,9 2,0 2,7 4,6 µg/mL

Soll-Konzentration: 1 2 3 5 µg/mL

Mittels F-Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Standardabweichungen der Kalibrierfunktion und der Wiederfindungsfunktion festgestellt werden. Die Analysenpräzision ist dadurch gegeben. Die Ermittlung der Vertrauensbereiche für die Steigung und den Achsenabschnitt ergab keine proportional- oder konstant-systematischen Abweichungen.

3.3.1.5 Zusammenfassung der Wiederfindungsversuche

In Tabelle 6 sind die Daten aus den Wiederfindungsversuchen zusammengefasst. Die Wiederfindungsraten (WFR) wurden nach der Formel, beschrieben in Punkt 2.3.5, aus den Standardkonzentrationen [$\mu\text{g/mL}$] berechnet. Sie sind aufgelistet als Mittelwerte mit Standardabweichung.

Tabelle 6: Wiederfindungsraten und systematische Abweichungen der untersuchten Lebensmittel.

Probe	WFR MW [%]	WFR STABW [%]	Proportional-system. Abweichung	Konstant-system. Abweichung
Paprika	102	± 3	nein	nein
Gurke	75	± 8	ja	ja
Heidelbeere	93	± 2	nein	nein
Avocado	95	± 5	nein	nein

Die WFR für Paprika, Heidelbeere und Avocado bewegen sich zwischen 89-105% und es konnten keine systematischen Abweichungen festgestellt werden. Es ist jedoch auffallend, dass die Wiederfindungsrate bei der Gurke mit durchschnittlich 75% relativ niedrig ist. Die Gurke zeigte keine Auffälligkeiten im Chromatogramm. Es handelte sich um einen klar abgegrenzten Peak mit geringem Tailing, so wie andere Peaks auch. Ein Matrixeffekt kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da durch die Ermittlung der Vertrauensbereiche systematische Abweichungen bestätigt wurden. Es wurde systematisch zu wenig des Analyten gemessen und es wird, wie bereits erwähnt, vermutet, dass es sich um Ungenauigkeiten in der Probenaufbereitung, wie etwa einen Pipettierfehler, handelt. Diese Ungenauigkeit, beziehungsweise ein möglicher Matrixeffekt könnte durch einen erneuten Standardadditionsversuch an der Gurke aufgeklärt werden, beziehungsweise könnte es interessant sein zum Vergleich auch andere Kürbisgewächse auf Matrixeffekte zu untersuchen. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass bei der Extraktion des Vitamin C aus der Gurke ein Teil des Vitamins enzymatisch oxidiert wurde. Dies könnte durch eine thermische Inaktivierung der Ascorbat-Oxidase verhindert werden.

3.3.2 Bestimmung der Probenkonzentration aus der Standardaddition

Aus einem Standardadditionsversuch lässt sich nicht nur eine Wiederfindungsfunktion erstellen, sondern es kann auch die Probenkonzentration ermittelt werden. Wird die Probenkonzentration aus der Standardaddition bestimmt, so ist diese bereits um die Wiederfindung, und etwaige Matrixeinflüsse, korrigiert.

Im Zuge dieses Versuches wurden einerseits die reine Probe und andererseits eine Probenreihe mit Zugabe von definierten Standardmengen gemessen. Da die zugegebenen Standardkonzentrationen bekannt sind, können sie den erhaltenen Peakflächen zugeordnet werden. Der reinen Probe wurde kein Standard zugegeben, daher wird dieser Peakfläche ein Konzentrationswert von 0 zugeordnet. Durch das Zuordnen der bekannten Konzentrationen entsteht eine Gerade, dessen Achsenabschnitt um die Wiederfindung korrigiert ist. Die erhaltenen Peakflächen wurden also gegen die bekannten Konzentrationen der Standards aufgetragen. Der erhaltene Achsenabschnitt stellt die Signalthöhe der Probe dar. Durch Verlängerung dieser Geraden wird ein Schnittpunkt mit der x-Achse erhalten, dessen Betrag der Probenkonzentration entspricht. Dieser Schnittpunkt kann aus der Grafik abgelesen oder mittels Kalibrierfunktion berechnet werden. Wird die Kalibrierfunktion aus der Standardaddition ($y = k \times x + d$) nach x umgeformt, und der Achsenabschnitt (d) mit 0 angenommen, so entsteht folgende Formel zur Berechnung des Schnittpunktes: $(x = \frac{-d}{k})$ (55).

Zudem können in den folgenden Abbildungen proportional-systematische Abweichungen sichtbar gemacht werden, indem die Standardaddition der Grundkalibrierung gegenübergestellt wird. Im Idealfall verlaufen beide Geraden parallel zueinander und besitzen die gleiche Steigung (55). In Abbildung 18 bis Abbildung 21 wurde die Probenkonzentration aus den erhaltenen Diagrammen abgelesen und die beiden Kalibriergeraden wurden auf Parallelität überprüft.

3.3.2.1 Probenkonzentration Paprika

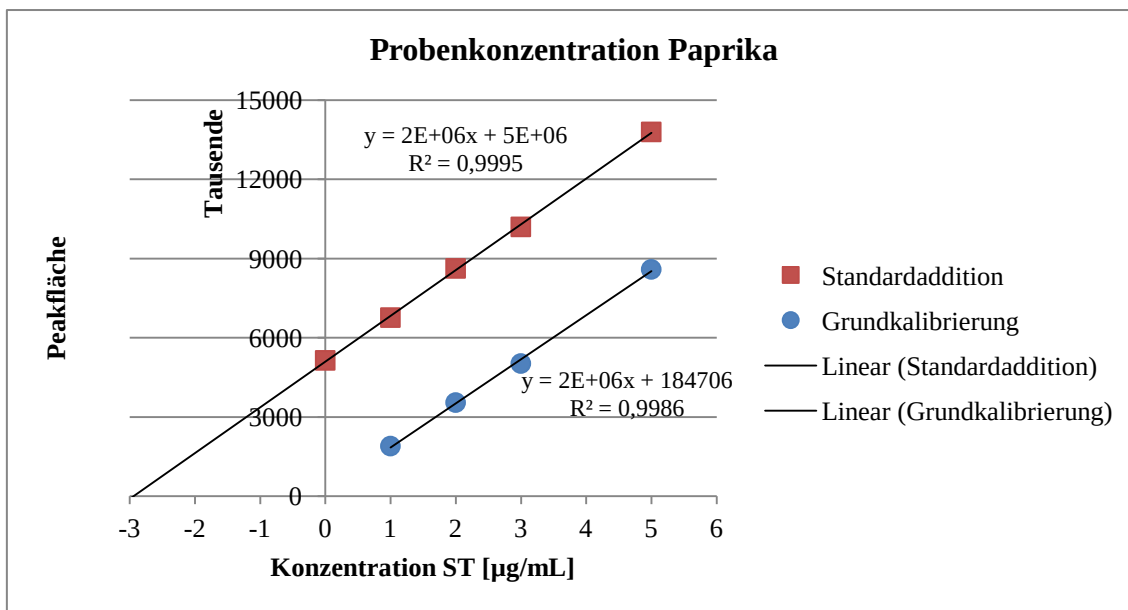


Abbildung 18: Bestimmung der Probenkonzentration aus der Standardaddition (Grüner Paprika). Soll-Konzentration des Standards (x), aus der Standardaddition (■), und aus der Grundkalibrierung (●). Gemessenes Signal in Form der Peakfläche (y).

Aus Abbildung 18 ist gut erkennbar, dass die Standardadditionsgerade von Paprika parallel zur Geraden aus der Grundkalibrierung verläuft. Die Steigungen der Geraden unterscheiden sich nicht wesentlich. Die ermittelte Probenkonzentration liegt bei knapp unter 3 µg/mL. Es gibt keinen Hinweis auf eine proportional-systematische Abweichung.

3.3.2.2 Probenkonzentration Gurke

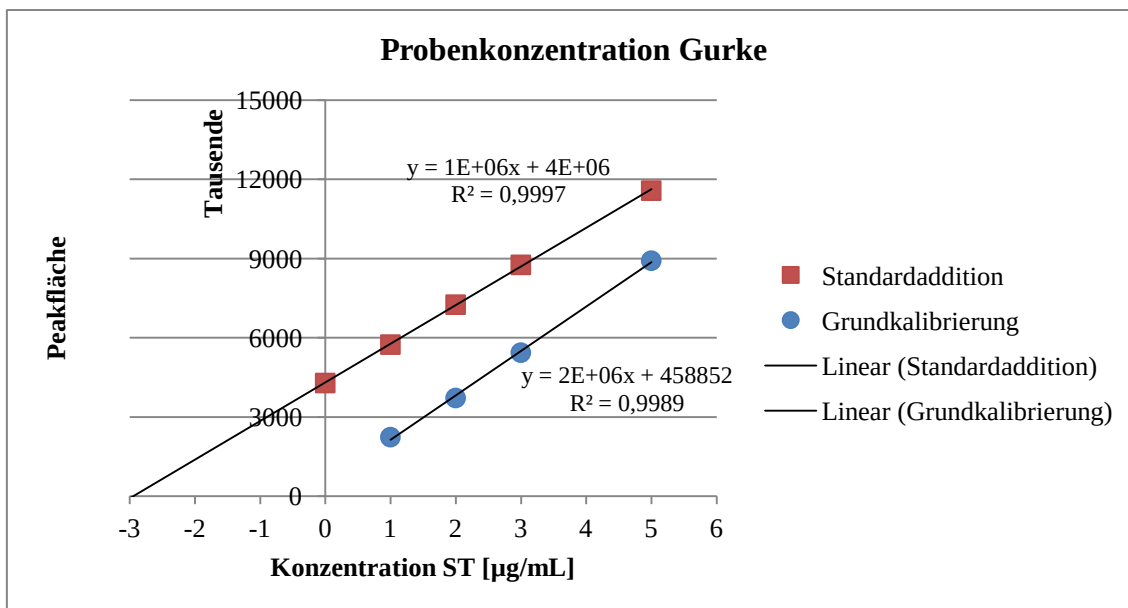


Abbildung 19: Bestimmung der Probenkonzentration aus der Standardaddition (Gurke).

Soll-Konzentration des Standards (x), aus der Standardaddition (■), und aus der Grundkalibrierung (●). Gemessenes Signal in Form der Peakfläche (y).

Bei der Gurke ist eine leichte, proportional-systematische Abweichung erkennbar, da die Geraden sichtlich nicht ganz parallel zueinander verlaufen und sich auch die Steigungen der beiden Kalibrierfunktion deutlich voneinander unterscheiden. Eine proportional-systematische Abweichung konnte bereits durch die Wiederfindungsfunktion und Ermittlung der Vertrauensbereiche bestätigt werden. Die Probenkonzentration ergibt sich bei der Gurke bei knapp unter 3 µg/mL.

3.3.2.3 Probenkonzentration Heidelbeere

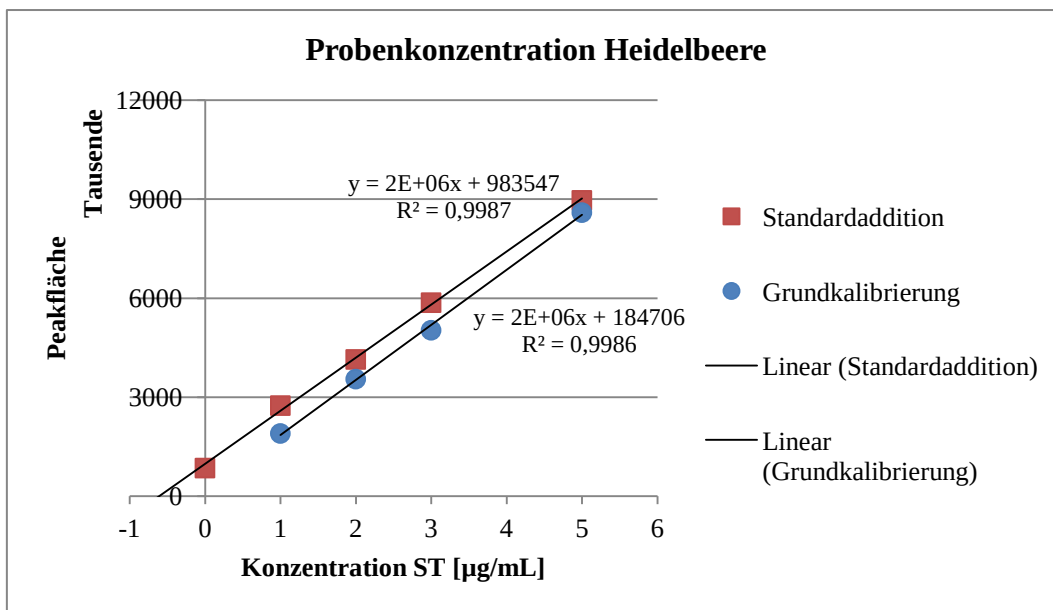


Abbildung 20: Bestimmung der Probenkonzentration aus der Standardaddition (Heidelbeeren). Soll-Konzentration des Standards (x), aus der Standardaddition (■), und aus der Grundkalibrierung (●). Gemessenes Signal in Form der Peakfläche (y).

Die beiden Geraden zeigen gute Parallelität, daher gibt es keinen Hinweis auf proportional-systematische Abweichungen. Die Probenkonzentration der Heidelbeere liegt bei etwa 0,5 µg/mL und wurde ursprünglich etwas höher erwartet. Die jeweiligen Peaks konnten aber gut abgegrenzt und ausgewertet werden.

3.3.2.4 Probenkonzentration Avocado

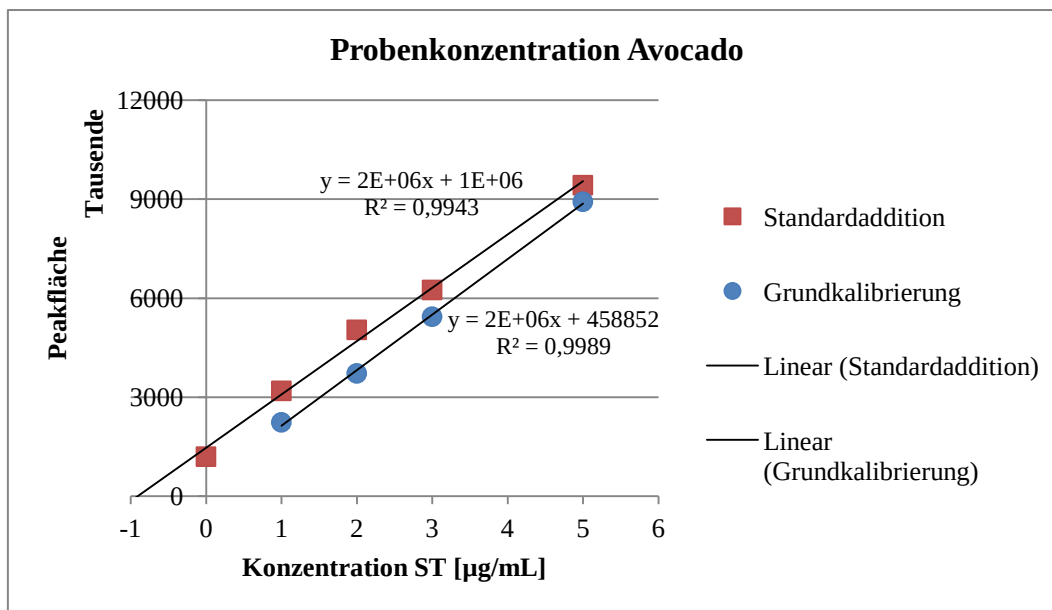


Abbildung 21: Bestimmung der Probenkonzentration aus der Standardaddition (Avocado). Soll-Konzentration des Standards (x), aus der Standardaddition (■), und aus der Grundkalibrierung (●). Gemessenes Signal in Form der Peakfläche (y).

Die Probenkonzentration der Avocado liegt bei knapp unter 1 µg/mL und die beiden Geraden verlaufen in guter Parallelität zueinander. Es gibt keinen Hinweis auf eine proportional-systematische Abweichung.

3.3.2.5 Zusammenfassung der ermittelten Probenkonzentrationen

In Tabelle 7 sind die ermittelten Vitamin-C-Gehalte aufgelistet. Der Vitamingehalt wurde einerseits aus der Standardaddition, andererseits mittels der Grundkalibrierung berechnet. Zum Vergleich sind die erhaltenen Werte für den Gehalt an TAA der jeweiligen Lebensmittel aufgelistet.

Tabelle 7: Vergleich des ermittelten Vitamin-C-Gehaltes aus der Standardaddition mit jenem aus der Grundkalibrierung. Angabe in mg TAA/100g essbarer Anteil frischen Lebensmittels.

Gesamtascorbinsäure [mg/100g]	Paprika	Gurke	Heidelbeere	Avocado
aus der Standardaddition	117,9	14,6	11,2	4,5
aus der Grundkalibrierung	118,8	11,3	9,1	3,5

Vergleicht man jeweils beide Vitamingehalte miteinander, so lässt sich gut erkennen, dass die Werte für Paprika sehr gut übereinstimmen. Auffallend ist wieder der große Unterschied zwischen den Vitamingehalten der Gurke mit 14,6 und 11,3 mg/100g. Dies bestätigt noch einmal die bereits diskutierten Ergebnisse aus dem Wiederfindungsversuch der Gurke. Durch die Standardaddition wurde das Ergebnis, das aus der Grundkalibrierung ermittelt wurde, nach

oben korrigiert. So erhält man für die Gurke anstatt 11,3 mg/100g nun einen korrigierten Vitamin-C-Gehalt von 14,6 mg/100g. Die Gurke weist also wahrscheinlich einen höheren Gehalt auf, als über die Grundkalibrierung ermittelt werden konnte. Beim Paprika lag die Wiederfindung bei knapp über 100%, daher wurde durch die Standardaddition der Gehalt von 118,8 mg/100g etwas nach unten korrigiert auf 117,9 mg/100g. Bei den anderen Lebensmitteln ist dies genau umgekehrt und der aus der Standardaddition ermittelte Vitamin-C-Gehalt ist nach oben korrigiert. Die Standardaddition ist also eine gut geeignete Methode um Matrixeffekte zu korrigieren.

Aus den Standardadditionsversuchen kann festgehalten werden, dass für Paprika, Heidelbeere und Avocado gute Wiederfindungsraten ermittelt werden konnten und die Bestimmung des Vitamin-C-Gehaltes mittels Grundkalibrierung aus externen Standards zuverlässig ist. Es konnten keine Matrixeffekte in Form von systematischen Abweichungen festgestellt werden. Die Ergebnisse der Gurke weisen auf einen Matrixeffekt oder eine unpräzise Probenaufbereitung hin. Es konnten sowohl proportional-, als auch konstant-systematische Abweichungen festgestellt werden. Durch einen erneuten Standardadditionsversuch am Lebensmittel Gurke könnte ein möglicher Matrixeffekt bestätigt werden. Das ermittelte Analysenergebnis aus der Grundkalibrierung scheint bei der Gurke jedenfalls nicht zuverlässig zu sein.

3.4 Vergleiche von HPLC- und Probenvorbereitungsmethoden

Nachfolgend werden HPLC-Methoden und verschiedene Probenaufbereitungen zur Bestimmung von Vitamin C in Form von Gesamtascorbinsäure (TAA) verglichen. Das Hauptaugenmerk liegt auf der HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion, welche mit der häufig verwendeten UV-Detektion verglichen wird. Zudem werden unterschiedliche Probenaufschlussmethoden getestet. Dabei werden rohe Proben sowie thermisch behandelte und mittels PEF (pulsed electric fields) aufgeschlossene Proben gegeneinander abgewogen.

3.4.1 Methodenvergleich: UV/Fluoreszenz am Beispiel Frühstückssaft

In einem Vorversuch wurde der Gehalt an Gesamtascorbinsäure (TAA) mittels Fluoreszenz- und UV-Detektion am Beispiel "Hohes C Frühstückssaft" bestimmt. Der Versuch wurde im Zweifachansatz durchgeführt.

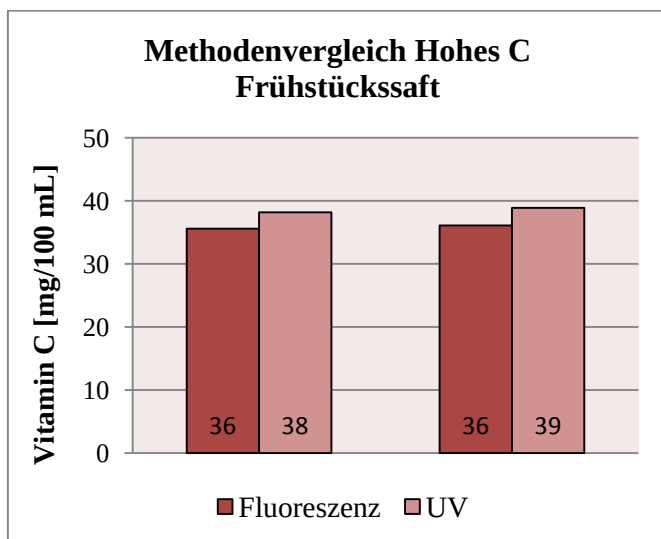


Abbildung 22: Methodenvergleich: Vorversuch an Hohes C Frühstückssaft.

Vergleich der quantitativen Vitamin-C-Bestimmung mit Fluoreszenz- bzw. UV-Detektion. Vitamin C angegeben in mg TAA /100 mL Saft.

Der Vitamin-C-Gehalt von Hohes C Frühstückssaft wurde laut Hersteller mit 35 mg/100 mL angegeben. Der Saft wurde mit meta-Phosphorsäure versetzt und, wie im Methodenteil beschrieben, für die UV- und Fluoreszenzmessung der TAA vorbereitet. Alle Messungen ergaben einen Vitamingehalt der größer als die Herstellerangabe ist, daher ist nicht davon auszugehen, dass bei einer der beiden Methoden wesentliche Vitamin-C-Verluste auftraten. Beide Methoden lieferten zudem ähnliche Werte. Die Herstellerangabe bedeutet, dass mindestens diese Menge an Vitamin C enthalten ist. Es ist aber auch möglich, dass der Gehalt höher ist. Säfte sind in der Regel relativ stabile Produkte, in denen Enzyme durch Haltbarmachungsme-

thoden inaktiviert wurden und der Vitamingehalt vom Hersteller angegeben wird. Daher eignen sich solche Säfte gut um zu testen ob die Messwerte wesentlich vom erwarteten Wert abweichen. Fehler bei den Probenahmen werden minimiert, da es sich bereits um eine homogene Probe handelt. Es muss kein Probenaufschluss mehr erfolgen, weil sich das Vitamin schon in Lösung befindet, was auch den Sauerstoffeintrag durch einen Mixer und eine mögliche Oxidation des Vitamins vermindert. Die Probenaufbereitung zur Vitamin-C-Bestimmung von Säften geht schnell und einfach. Daher wurde für diesen Vorversuch Hohes C Frühstückssaft gewählt. Aus dem Versuch geht kein wesentlicher Unterschied zwischen Fluoreszenz- und UV-Methode zur Bestimmung der Gesamascorbinsäure (TAA) hervor. In weiteren Versuchen ist es sinnvoll, die Methoden anhand von komplexeren Matrices zu vergleichen.

3.4.2 Methodenvergleich: UV/Fluoreszenz am Beispiel Brokkoli

Anhand von Brokkoli wurde ein Methodenvergleich von UV- und Fluoreszenzmessung zur Quantifizierung der Gesamascorbinsäure an einer komplexeren Matrix durchgeführt. Die beiden Methoden wurden zusätzlich anhand von zwei verschiedenen Probenaufschlussmethoden verglichen. Einerseits wurde das Vitamin C aus rohem Brokkoli extrahiert und andererseits wurde vor der Extraktion eine PEF-Behandlung durchgeführt. Die Werte stammen aus einer 3-fachen Bestimmung.

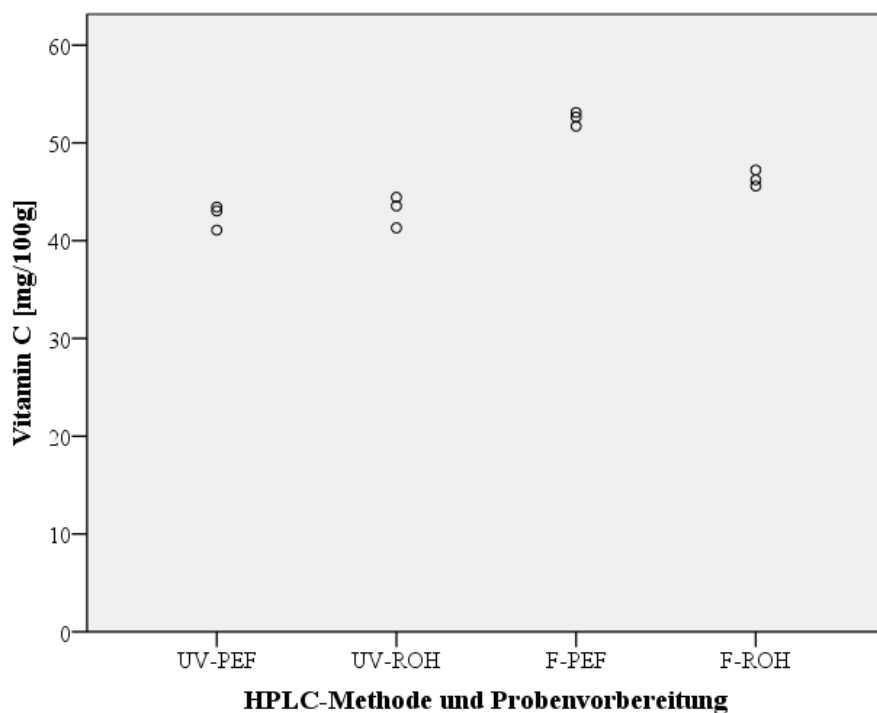


Abbildung 23: Methodenvergleich: UV-/Fluoreszenzdetektion von Vitamin C aus Brokkoli.

UV (UV-Detektion), PEF (pulsed electric fields), F (Fluoreszenz-Detektion), ROH (rohes Lebensmittel). Vitamin C angegeben in mg TAA/100g essbarer Anteil frischen Lebensmittels.

Die Probenvorbereitung beider Methoden unterscheidet sich darin, dass die Probe für die UV-Messung reduziert und für die Fluoreszenzmessung oxidiert und derivatisiert wurde. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse des Methodenvergleichs in einem Punktdiagramm dargestellt. Nach der einfaktoriellen ANOVA mit Tukey post-hoc Test ($\alpha = 0,05$) unterscheidet sich die UV-Methode bei beiden Probenaufschlussmethoden (PEF und roh) signifikant von der Fluoreszenz-Methode. Bei rohem Brokkoli wurde durch die UV-Messung ein um 6-9% geringerer Vitamin-C-Gehalt ermittelt, als durch die Fluoreszenzmessung. Es gibt keinen Unterschied zwischen UV-PEF und UV-Roh. Innerhalb der Fluoreszenz-Methode wurde durch die PEF-Behandlung ein höherer Gehalt an TAA festgestellt, als bei rohem Brokkoli. Mögliche Ursachen für die Unterschiede werden nachfolgend diskutiert.

3.4.2.1 Einfluss der Probenaufbereitung

Der Methodenvergleich wurde ausgehend von derselben Probenahme und demselben Probenaufschluss durchgeführt. Das bedeutet, dass das Vitamin C aus rohem und aus PEF-behandeltem Brokkoli extrahiert wurde und anschließend zur UV- und Fluoreszenzmessung jeweils dieselben Extrakte verwendet wurden. Die Probenahme und Extraktion waren also für beide Methoden identisch. Erst nach der Extraktion wurden die Proben für die UV-Messung und für die Fluoreszenzmessung aufgeteilt und unterschiedlich vorbereitet. Für die UV-Messung erfolgte die Reduktion zur TAA mittels TCEP, während für die Fluoreszenzmessung eine Oxidation über Aktivkohle zur TAA, mit anschließender Derivatisierung durchgeführt wurde. Insgesamt bedeutet dies, dass eine möglicherweise inhomogene Probe oder das Extraktionsverfahren keinen Einfluss auf unterschiedliche Ergebnisse zwischen UV- und Fluoreszenzmessung ausüben können.

3.4.2.2 Einfluss der Grundkalibrierung

Was jedoch einen Einfluss auf die Messergebnisse haben kann sind die unterschiedlich verdünnten Standardreihen für die Grundkalibrierung. Für beide Methoden wurde eine eigene Grundkalibrierung durchgeführt. Die Standardreihe für die Fluoreszenzmessung wurde dabei um eine Zehnerpotenz stärker verdünnt, als jene für die UV-Messung. Außerdem wurde die UV-Detektion mittels einer AA-Standardreihe kalibriert, während für die Fluoreszenz-Detektion die Standardlösung zur DHAA oxidiert wurde. Die bei beiden Methoden unterschiedliche Behandlung und Verdünnung der Standardreihe zur Grundkalibrierung kann das Analysenergebnis durchaus beeinflussen.

Auch die Berechnung des Flächenintegrals kann Einfluss auf das Ergebnis nehmen. Da, wie bereits erwähnt, beide Messungen ausgehend von der gleichen Probenextraktion durchgeführt

wurden, lag die Endkonzentration der Probe für die UV-Messung mit knapp über 10 µg/mL im unteren Konzentrationsbereich der Grundkalibrierung. Dadurch wurde ein relativ kleiner Peak erhalten, der aber dennoch gut abgegrenzt war. Bei der Fluoreszenzmessung hingegen lag der Peak mit einer Probenkonzentration von durchschnittlich 2,5 µg/mL ideal im mittleren Feld der Grundkalibrierung. Für ein bestmögliches Flächenintegral ist eine optimale Peakgröße und -form wünschenswert.

3.4.2.3 Einfluss von Reduktion, Oxidation und Derivatisierung

Weitere Einflussfaktoren auf den ermittelten Vitamin-C-Gehalt können einerseits die Reduktion, andererseits die Oxidation und Derivatisierung sein. Bei diesen Reaktionen ist es wichtig sicherzustellen, dass die Umsetzung vollständig erfolgt.

Zur Reduktion der DHAA für die UV-Messung wurde eine TCEP-Lösung (2,5 mM) zu gleichen Teilen mit dem Extrakt (Vitamin C in MPA) für 30 min dunkel inkubiert. Chebrolu et al. (2012) zeigten, dass TCEP in einer Konzentration von 1,25 mM innerhalb von 30 min für eine effiziente Reduktion der DHAA aus Grapefruit-Extrakten ausreichend ist. Durch eine Erhöhung der TCEP-Konzentration wurde die Reduktionseffizienz nicht gesteigert (45). Bei der Verwendung von TCEP als Reduktionsmittel ist es außerdem wichtig einen destabilisierenden Einfluss von Kupferionen auszuschließen. Durch Kupferionen kann es zur Oxidation von TCEP kommen. Dieses Problem kann umgangen werden, indem TCEP in einer MPA-Lösung mit niedrigem pH-Wert gelöst wird. Unter diesen Bedingungen haben Kupferionen keinen signifikanten Einfluss mehr und TCEP ist stabil (60). In dem aktuellen Versuch wurde zudem EDTA verwendet, welches, aufgrund seiner Eigenschaft als Chelatbildner, die TCEP-Lösung zusätzlich stabilisieren soll. Daher wird davon ausgegangen, dass bei diesem Versuch eine vollständige Reduktion der DHAA erfolgte.

Studien zur Oxidation von AA und Derivatisierung mit OPDA sind kaum vorhanden. Eine Studie aus 1984 berichtet von einer minimalen Reaktionszeit von 25 min, um DHAA mit OPDA (0,1% w/v) vollständig zu derivatisieren (61). Bei dem hier durchgeführten Versuch mit Fluoreszenzmessung wurde OPDA in einer Konzentration von 0,25% (w/v) verwendet, und eine Mindestreaktionszeit von 60 min eingehalten, wie in der Methode von Dodson et al. (1992) beschrieben. Es wird angenommen, dass die von Dodson et al. beschriebene Oxidation der AA und die Derivatisierung der DHAA zu einer vollständigen Umsetzung führt.

Insgesamt ist daher nicht davon auszugehen, dass der niedrigere TAA-Gehalt aus der UV-Messung durch eine unvollständige Reduktion bedingt ist.

3.4.2.4 PEF-Behandlung

Die Auswirkungen einer PEF-Behandlung können sich einerseits in einer besseren Extrahierbarkeit von Zellinhaltsstoffen zeigen und damit zu einem höheren Gehalt im Extrakt führen. Andererseits kann dadurch auch die Stabilität von Vitaminen beeinflusst werden. Ob es zu einem positiven, stabilisierenden Effekt oder zu einem Vitaminverlust kommt, hängt mit den Behandlungsbedingungen zusammen. Die Effekte einer PEF-Behandlung sind jedenfalls abhängig von der Behandlungsdauer und der Feldstärke (27). Bei einer Studie in der Orangensaft untersucht wurde resultierte eine Behandlung mit PEF in einem niedrigeren Gehalt an AA, verglichen mit unbehandeltem Saft. Die Verluste an AA durch eine PEF-Behandlung oder eine thermische Pasteurisierung waren vergleichbar, allerdings bleibt bei geringem Energieeintrag mehr AA erhalten (29). Jedoch wurde in dieser Studie kein Wert für die TAA ermittelt und daher ist es auch möglich, dass sich nur das Gleichgewicht zwischen AA und DHAA verändert hat, jedoch nicht der Gehalt an TAA. Für die Stabilität von Säften ist zwar die reduzierte Form (AA) wichtig, jedoch sind für die menschliche Ernährung beide Formen des Vitamins von Bedeutung, weswegen eine Bestimmung der TAA nicht unwesentlich ist. Leong und Oey (2014) untersuchten sowohl die Auswirkung von PEF auf die Stabilität der Ascorbat-Oxidase, als auch den daraus resultierenden Gehalt an TAA in Karottenpüree. Da es durch eine PEF-Behandlung mit geringem Energieeintrag (unter 20 kJ/kg) bereits zum Zellaufschluss kommt, kann membrangebundene Ascorbat-Oxidase freigesetzt werden und zu einem Abbau von Vitamin C führen. Bei einem höheren Energieeintrag (ab 500 kJ/kg) verliert das Enzym allerdings etwa 40% seiner Aktivität, vermutlich aufgrund eines kombinatorischen Effektes aus PEF und daraus resultierender Wärmeentwicklung. Dennoch kann durch die verbleibende Restaktivität des Enzyms weiterhin AA oxidiert und abgebaut werden. Direkt nach der PEF-Behandlung wurde von Leong und Oey kein wesentlicher Verlust an TAA beobachtet, jedoch wurde der Anteil an oxidierten Form, also DHAA, größer (26). Aus den eigenen Beobachtungen geht hervor, dass sich die Filtrierbarkeit des Extraktes nach der PEF-Behandlung verbessert hat. Ein Verlust an Vitamin C scheint unwahrscheinlich, da es zu keiner maßgeblichen Wärmeentwicklung durch die Behandlung kam. Außerdem wurde die Probe direkt im Extraktionsmittel (MPA) behandelt, was zusätzlich stabilisierend wirken könnte. Dies spiegelt sich auch in den ermittelten Werten wieder, die keinen Verlust im Vergleich zur unbehandelten Probe und im Zuge der Fluoreszenzmessung sogar einen höheren Vitamingehalt ergaben. Warum sich der ermittelte Wert des PEF-behandelten Brokkoli aus der Fluoreszenzmessung signifikant von allen anderen Werten unterscheidet, lässt sich hiermit jedoch nicht erklären.

Zhang et al. untersuchten einen möglichen Effekt durch PEF auf die Struktur von Vitamin C und verzeichneten einen Anstieg des Fluoreszenzsignals nach PEF-Behandlung. Durch eine PEF-Behandlung kann sich die Konformation der AA ändern. Das Gleichgewicht zwischen der Endiol- und Ketoform verschiebt sich nach PEF-Behandlung stärker in Richtung Ketoform. Da die Ketoform der AA, ebenso wie die DHAA, mit OPDA reagiert, kann auch die Ketoform mittels Fluoreszenzmessung detektiert werden (30). Für den hier durchgeführten Methodenvergleich sollte eine Verschiebung in Richtung Ketoform für die Fluoreszenzdetektion jedoch keine Auswirkung haben. Würde es zu einer Konformationsänderung des Vitamins kommen, dann müsste das eigentlich in niedrigeren Messergebnissen resultieren. Zudem wird das Vitamin vor der Derivatisierung ohnehin zur DHAA oxidiert. Dennoch unterscheiden sich die ermittelten TAA-Gehalte der PEF-behandelten Proben aus der UV- und Fluoreszenzmessung signifikant voneinander und eine Auswirkung durch eine PEF-induzierte Konformationsänderung auf eines der beiden Analysenverfahren kann nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine möglicherweise unvollständige Reduktion der DHAA sehr unwahrscheinlich die Ursache für den beobachteten Unterschied zwischen UV- und Fluoreszenzmessung ist. Eine PEF-induzierte Konformationsänderung der AA könnte sich auf die Messergebnisse auswirken. Die Probenaufbereitung bis zur Oxidation/Reduktion war für beide Methoden gleich und die direkte Behandlung der Probe in MPA-Lösung wirkt vermutlich zusätzlich stabilisierend. Letztlich ist erwähnenswert, dass es bei der UV-Detektion zu leichtem Tailing im Chromatogramm kam. Am wahrscheinlichsten scheint jedoch die unterschiedliche Grundkalibrierung oder eine natürliche Schwankungsbreite zwischen der UV- und Fluoreszenzmethode für den kleinen, aber dennoch signifikanten Unterschied der Messergebnisse verantwortlich zu sein.

3.4.3 Vergleich von Probenaufschlussmethoden am Beispiel Brokkoli

Verschiedene Probenaufschlussmethoden wurden verglichen um herauszufinden, ob die Extraktionseffizienz damit verbessert werden kann und ob Extrakte aus thermisch oder PEF-behandelten Proben eine veränderte Stabilität im Vergleich zum rohen Lebensmittel zeigen. Dazu wurden Proben in rohem Zustand, nach indirekter thermischer Behandlung im Wasserbad und nach PEF-Behandlung auf ihren Gehalt an TAA untersucht. Der Versuch wurde an frischem Brokkoli in 5-facher Bestimmung mittels Fluoreszenzdetektion durchgeführt.

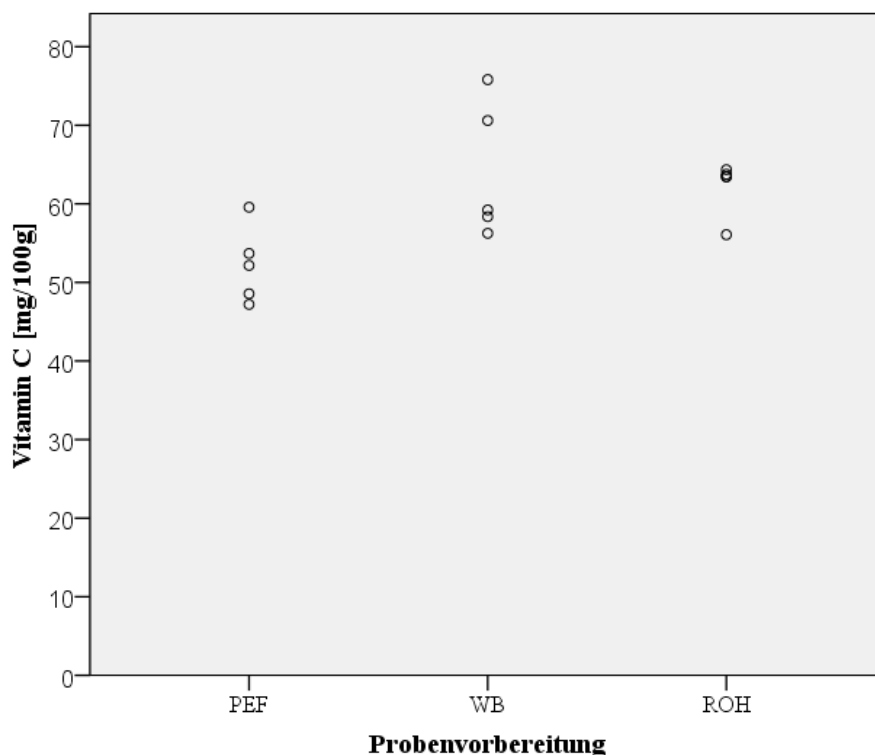


Abbildung 24: Vergleich von Probenvorbereitungen zur Bestimmung von Vitamin C in Brokkoli.

PEF (pulsed electric fields), WB (thermische Behandlung im Wasserbad), ROH (rohes Lebensmittel). Vitamin C angegeben in mg TAA/100g essbarer Anteil frischen Lebensmittels.

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse in einem Punktdiagramm grafisch dargestellt. Es ist auffällig, dass vor allem die Werte aus der thermischen Behandlung (WB = Wasserbad) relativ stark streuen. Aufgrund nicht gegebener Varianzhomogenität wurde daher eine Welch-ANOVA mit Games-Howell post-hoc Test ($\alpha = 0,05$) durchgeführt. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der PEF-Behandlung und dem rohen Brokkoli ermittelt werden. Der PEF-behandelte Brokkoli wies einen geringeren Gehalt an TAA auf, als das rohe Lebensmittel. Daraus ließe sich grundsätzlich folgern, dass eine PEF-Behandlung vor dem mechanischen Probenaufschluss keine zusätzlichen Vorteile für die Ausbeute und Stabilität von Vita-

min C bringt. Die Mittelwerte der Vitamin-C-Gehalte liegen für PEF bei $52,2 \pm 4,9$, für die thermische Behandlung im Wasserbad bei $64,1 \pm 8,6$ und für den rohen Brokkoli bei $62,2 \pm 3,5$ mg/100g. Für eine genauere Interpretation dieser Ergebnisse werden nachfolgend mögliche Einflussfaktoren diskutiert. Außerdem stellt sich die spannende Frage, warum aus den Ergebnissen des Methodenvergleichs (Punkt 3.4.2) eine PEF-Behandlung vorteilhaft scheint, dieser Effekt aber durch die hier präsentierten Ergebnisse nicht bestätigt werden konnte, beziehungsweise, in diesem Fall, eine PEF-Behandlung sogar zu einem geringeren Gehalt an TAA führte.

3.4.3.1 PEF-Behandlung

Die Auswirkungen einer PEF-Behandlung auf den Gehalt und die Stabilität von Vitamin C wurden zum Teil bereits im Zuge des Methodenvergleichs (Punkt 3.4.2) erläutert. Dabei kann festgehalten werden, dass die Auswirkungen von PEF auf die Erhaltung und Stabilität von bioaktiven Inhaltsstoffen, wie Vitaminen stark von den Behandlungsbedingungen abhängig ist. Viele Studien berichten jedoch davon, dass durch eine Behandlung mit PEF mehr Vitamin C in Obst- und Gemüsesäften erhalten bleibt, als nach einer thermischen Behandlung (27). Wahrscheinlich verschiebt sich durch eine PEF-Behandlung das Gleichgewicht zwischen DHAA und AA, aber der Gehalt an TAA ändert sich nicht wesentlich (26). Zudem kann es durch PEF zu einer Konformationsänderung der AA kommen, wobei diese vermehrt in die Ketoform überführt wird (30).

PEF wird häufig als zusätzliche Zellaufschlussmethode bei Extraktionsvorgängen verwendet, da durch eine Elektroporation der Zellmembran die Diffusivität von Pflanzeninhaltsstoffen verbessert wird (27). Beispielsweise wurde der Effekt von PEF auf die Extraktionseffizienz von Saft aus Heidelbeeren untersucht. PEF wurde dabei zusätzlich zu konventionellen Zellaufschlussmethoden wie Gefrieren/Auftauen und Saftpressen angewandt. Damit konnte die Ausbeute an Polyphenolen und die antioxidative Aktivität des Saftes gesteigert werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass PEF die Extraktausbeute von bioaktiven Inhaltsstoffen positiv unterstützt (28). Da der ermittelte TAA-Gehalt durch eine PEF-Behandlung, verglichen mit rohem Brokkoli, aus den hier gewonnenen Ergebnissen jedoch niedriger ist, lässt sich in diesem Fall keine Verbesserung der Extraktausbeute erkennen.

Die auftretenden Effekte durch PEF hängen jedenfalls wesentlich von der Behandlungsdauer und Feldstärke ab. Eine höhere Feldstärke führt zu einem besseren Aufschluss des Zellgewebes von Pflanzen, aber gleichzeitig kann es durch die Wärmeentwicklung bei hohen Feldstärken auch zu einer ohmschen Erhitzung der Probe kommen (27). Negative Auswirkungen

durch eine Erhitzung der Probe während der Behandlung können bei dem durchgeführten Versuch ausgeschlossen werden, da die Temperatur lediglich von 21,1°C auf 22,5°C anstieg.

Pereira et al. (2009) berichteten von einer reversiblen Elektroporation von Pflanzenzellen bei einer Feldstärke von 30-500 V/cm bei einer Impulsdauer von 10-1000 μ s. Unter diesen Bedingungen können kleinere Poren entstehen, die sich nach der Behandlung wieder schließen. Dies kann sogar zu einer Verstärkung der Zellwand durch Quervernetzung führen. Bei intensiveren Behandlungsbedingungen entstehen größere Poren und es kommt zum irreversiblen Zellaufschluss (62). Im aktuellen Versuch wurde eine Feldstärke von 1 kV/cm bei einer Impulsdauer von 100 μ s angewandt. Daher wird von einer irreversiblen Elektroporation der Zellen und einem erfolgreichen Zellaufschluss ausgegangen. Da der ermittelte Gehalt an TAA aus dem PEF-Aufschluss dennoch geringer ist, als jener aus rohen Proben, scheint es einen Vitaminverlust gegeben zu haben. In diesem Fall war also der mechanische Probenaufschluss ausreichend und eine zusätzliche PEF-Behandlung brachte keine Vorteile. Eine Studie, die den Effekt einer PEF-Behandlung mit hoher Intensität (35 kV/cm) auf den Vitamin-C-Gehalt von Orangensaft und Gazpacho untersuchte, konnte ebenfalls einen Vitaminverlust feststellen. Die Gehalte lagen zwischen 84% bis zu 98%, verglichen mit unbehandelten Proben. Bei der Untersuchung verschiedener PEF-Parameter stellten sie fest, dass sich eine geringere Feldstärke, kürzere Behandlungsdauer, geringere Pulsfrequenz und kürzere Impulsdauer positiv auf Vitamin C auswirkt. Nichtsdestotrotz war die PEF-Behandlung in dieser Studie der thermischen Pasteurisierung überlegen und führte zu einem geringeren Vitaminverlust (63). Auch Moussa-Ayoub et al. (2017) berichteten von einer Erhaltung der AA zu 98%, durch eine PEF-Behandlung bei einer Feldstärke von 35 kV/cm. Hingegen kam es durch eine thermische Pasteurisierung bei 95°C für 3 min zu einem Verlust der AA von 22%. In dieser Studie wurde jedoch der Gehalt an TAA nicht berücksichtigt (64). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass es durch eine PEF-Behandlung durchaus zu einem kleinen Vitaminverlust gegenüber der unbehandelten Probe kommt. Auch in den hier ermittelten Ergebnissen wurde aus PEF-behandelten Proben ein geringerer TAA-Gehalt festgestellt, auch wenn die Feldstärke mit 1 kV/cm wesentlich geringer war als in den zitierten Studien mit 35 kV/cm. Dies legt nahe, dass nicht nur die PEF-Behandlung, sondern auch andere Einflüsse, wie beispielsweise Probenhomogenität zu einem signifikanten Unterschied führten.

3.4.3.2 Thermische Behandlung

Aus dem hier durchgeführten Versuch kann kein signifikanter Unterschied zwischen der thermischen Behandlung im Wasserbad und den anderen Proben festgestellt werden. Dies ist

auch darauf zurückzuführen, dass die erhaltenen Werte stark streuen. Es ist eine Tendenz erkennbar, dass die TAA-Gehalte aus den thermisch behandelten Proben zumindest nicht wesentlich niedriger sind, als aus anderen Proben. Es scheint also in diesem Fall keine Vitamin-C-Verluste durch thermische Beanspruchung gegeben zu haben.

Vorwiegend kommt es durch eine thermische Behandlung zu einer Verschiebung des Verhältnisses von AA und DHAA. In einer Studie von Leong und Oey (2012) stieg der Gehalt an DHAA in thermisch behandelten Karottenscheiben stark an, während der Gehalt an AA sank. Abhängig von der Karottensorte wurde durch Hitzebehandlung sowohl ein Verlust, aber auch ein Anstieg an TAA im Vergleich zu unbehandelten Proben verzeichnet (7). Auch Munyaka et al. (2010) konnten bereits ähnliche Effekte einer thermischen Behandlung an Brokkoli feststellen. Zusätzlich konnten sie beobachten, dass eine kurze thermische Behandlung mit hoher Temperatur (90°C, 4 min) in einem höheren Gehalt an TAA resultierte, als eine längere Behandlung bei geringerer Temperatur. Außerdem hatte auch der Zeitpunkt des mechanischen Probenaufschlusses einen Einfluss auf die Stabilität des Vitamins. Wurde die Probe bereits vor der thermischen Behandlung stark zerkleinert, so ging mehr an TAA verloren und der Anteil an DHAA stieg (8). In einer Studie zur Verarbeitung von Fisoln wurde durch direktes Blanchieren in Wasser ein Rückgang des TAA-Gehaltes beobachtet. Dieses Resultat ist jedoch nicht nur auf die thermische Beanspruchung, sondern auch auf einen Verlust durch Auslaugung zurückzuführen (65). Verluste durch Auslaugung können bei diesem Versuch zur Gänze ausgeschlossen werden, da die Proben in der Extraktionslösung (MPA) behandelt wurden.

Eine Möglichkeit um Vitamin C zu stabilisieren ist die pflanzeigene Ascorbat-Oxidase zu inaktivieren. Leong und Oey (2012) zeigten an Karottenscheiben, dass eine thermische Behandlung von 10 min bei 80°C ausreichend ist um das Enzym komplett und irreversibel zu inaktivieren. Bereits bei Temperaturen über 50°C nimmt die Aktivität des Enzyms sukzessive ab. Neben der Ascorbat-Oxidase kann jedoch die Beteiligung anderer Enzyme am Vitaminabbau, wie der Ascorbat-Peroxidase, nicht ausgeschlossen werden. Dem Einfluss durch enzymatische Oxidation des Vitamin C mit anschließendem hydrolytischem Abbau wird mehr Bedeutung zugesprochen, als dem Vitaminverlust durch thermische Beanspruchung (7). Auch Munyaka et al. (2010) konnten die Ascorbat-Oxidase in Brokkoli-Proben durch eine Behandlung von 10 min bei 80°C gänzlich inaktivieren (8).

Die thermische Behandlung des hier durchgeführten Versuches erfolgte im Wasserbad bei 80°C bei einer Haltezeit von 4 min. Der Temperaturverlauf kann

Abbildung 30 im Anhang entnommen werden. Es ist daher möglich, dass nach der Behandlung noch ein Rest an Enzymaktivität vorhanden war, da die Behandlungsdauer kürzer war, als die in Studien beschriebene Inaktivierungszeit für die Ascorbat-Oxidase. Da es zu keinen großen Vitaminverlusten kam, wird aber angenommen, dass das Enzym ausreichend inaktiviert wurde, beziehungsweise das Extraktionsmittel, die meta-Phosphorsäure, zusätzlich stabilisierend wirkte. Auch Munyaka et al. (2010) schreiben von einer Unterdrückung von enzymatischen Reaktionen durch Extraktion in meta-Phosphorsäure (34).

3.4.3.3 Fazit aus dem Vergleich von Probenaufschlussmethoden

Es kann festgehalten werden, dass eine Verarbeitung von Lebensmitteln, sei es durch PEF oder thermisch, natürlicherweise zumindest einen geringen Vitaminverlust mit sich bringt. Für die Lebensmittelverarbeitung ist es daher wichtig herauszufinden unter welchen Bedingungen die geringsten Verluste auftreten, während es für eine quantitative Vitamin-C-Analyse von Bedeutung ist eine Probenaufarbeitung zu wählen, die praktikabel ist und bei der möglichst nichts vom Analyten verloren geht. Ein zusätzlicher Probenaufschluss durch PEF oder eine thermische Enzyminaktivierung scheint in diesem Fall nicht notwendig zu sein. Die Ergebnisse der PEF-Behandlung aus den beiden durchgeführten Versuchen sind nicht eindeutig. Beim Methodenvergleich konnte mit der Fluoreszenzmethode aus PEF-behandelten Proben ein höherer TAA-Gehalt ermittelt werden, als aus rohen Proben. Der Vergleich von Probenaufschlussmethoden zeigte jedoch ein gegenteiliges Ergebnis. Es ist daher nicht sicher, ob PEF gegenüber rohen Proben einen Vorteil bringt. Um zu einem eindeutigeren Ergebnis zu kommen, sollte auch die Reproduzierbarkeit der Probenahme und der PEF-Behandlung untersucht werden. Es handelt sich bei Brokkoli eher um ein inhomogenes Lebensmittel, daher können die unterschiedlichen Ergebnisse auch daraus resultieren, dass beide Versuche an verschiedenen Tagen aus unterschiedlichen Brokkoli-Proben durchgeführt wurden. Die Vitamin-C-Gehalte nach der thermischen Behandlung sind vergleichbar mit jenen aus rohem Brokkoli. Daraus wird geschlossen, dass ein Probenaufschluss in Extraktionslösung (MPA) das Vitamin ausreichend stabilisiert und eine thermische Inaktivierung der Ascorbat-Oxidase nicht unbedingt notwendig ist. Da der Probenaufschluss von rohem Brokkoli direkt in der Extraktionslösung am einfachsten anwendbar ist, spricht nichts für zusätzliche Probenvorbereitungsmaßnahmen. Das größere Problem, als die Stabilisierung des Vitamin C, ist vermutlich die Entnahme einer möglichst homogenen Probe aus rohem Obst und Gemüse. Munyaka et al. (2010) berichteten beispielsweise von unterschiedlichen Vitamin-C-Gehalten und unterschiedlicher enzymatischer Aktivität in den Röschen und Stängeln von Brokkoli (34). Durch unzureichende Probenhomogenität kann es somit sehr schnell zu Schwankungen zwischen

einzelnen Analysen kommen. Diesbezüglich könnte eine Gefriertrocknung und Pulverisierung der Probe als alternatives Probenaufschlussverfahren mit besserer Homogenität in Betracht gezogen werden.

3.5 Quantifizierung des Anteils an Dehydroascorbinsäure (DHAA)

Häufig wird in Studien die Gesamtascorbinsäure (TAA) oder die L-Ascorbinsäure (AA) bestimmt. Soll aber auch ermittelt werden welchen Anteil die Dehydroascorbinsäure (DHAA) an der Gesamtascorbinsäure ausmacht, so kann dies mitunter Schwierigkeiten bereiten. Sehr oft wird dafür die Subtraktions-Methode verwendet. Es werden also die Gehalte für TAA und AA mittels HPLC mit UV-Detektion bestimmt und durch Subtraktion wird der Anteil an DHAA berechnet. Weniger häufig wird die DHAA mittels UV-Detektion bei niedriger Wellenlänge direkt gemessen. Nachfolgend werden Vor- und Nachteile dieser Methoden diskutiert. Außerdem wurde versucht, analog zur UV-Detektion, auch mittels Fluoreszenzdetektion Gehalte für TAA, AA und DHAA über eine Subtraktions-Methode zu unterscheiden.

3.5.1 Bestimmung des DHAA-Anteils durch UV-Detektion

Sowohl die AA, als auch die DHAA absorbieren bei relativ geringen Wellenlängen im UV-Spektrum. Das macht besonders die UV-Detektion von DHAA, die ihr Absorptionsmaximum bei 210 nm hat, schwierig, da es in diesem Bereich häufig zu Interferenzen mit anderen Komponenten der Probenlösung kommen kann. Daher ist es schwierig den Anteil an DHAA direkt durch UV-Detektion zu quantifizieren (49). Stattdessen wird der Anteil an DHAA am Vitamin C häufig durch Subtraktion ermittelt:

$$\text{DHAA} = \text{TAA} - \text{AA}$$

Die Differenzierung in TAA, AA und DHAA erfolgt am häufigsten, indem die Werte für TAA und AA mittels HPLC mit UV-Detektion quantitativ bestimmt werden. Anschließend wird der Wert für die DHAA durch Subtraktion der beiden anderen Werte ermittelt. Mazurek und Jamroz haben 2015 eine Validierung dieser Methode zur Quantifizierung von DHAA in rohem Obst und Gemüse durchgeführt. Während der Gehalt an TAA und AA präzise bestimmt werden konnte, ergab die Berechnung der DHAA Variationskoeffizienten von bis zu 55%. Das resultiert daraus, dass die DHAA, im Verhältnis zur AA, meist nur in sehr geringen Mengen in unverarbeiteten Lebensmitteln vorhanden ist. Dadurch ergibt sich bereits bei einer geringen Standardabweichung ein relativ großer Variationskoeffizient (50). Odriozola-Serrano et al. (2007) kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass die Subtraktion der AA von der TAA unpräzise Ergebnisse mit großen Variationskoeffizienten für die DHAA liefert (66). Mazurek und Jamroz empfehlen daher, wegen ungenügender Präzision der Subtraktions-Methode, eine direkte Analyse über HPLC gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (50).

3.5.2 Bestimmung des DHAA-Anteils durch Fluoreszenzdetektion

Auf ähnliche Weise, wie bei der UV-Detektion, könnte auch mittels Fluoreszenzdetektion der Anteil an DHAA an der Gesamtascorbinsäure ermittelt werden. Dazu wurde die Probe einmal direkt nach der Extraktion und einmal nach Oxidation über Aktivkohle derivatisiert. Auf diese Weise werden sowohl die natürlicherweise im Lebensmittel enthaltene DHAA, als auch die Gesamtascorbinsäure (TAA) direkt quantifiziert. Der Anteil für die AA wird anschließend rechnerisch ermittelt ($AA = TAA - DHAA$). Dieses Verfahren wurde zum Einen mit Phosphatpuffer, und zum Anderen mit meta-Phosphorsäure als Extraktionsmittel an Brokkoli in einer 4-fachen Bestimmung getestet.

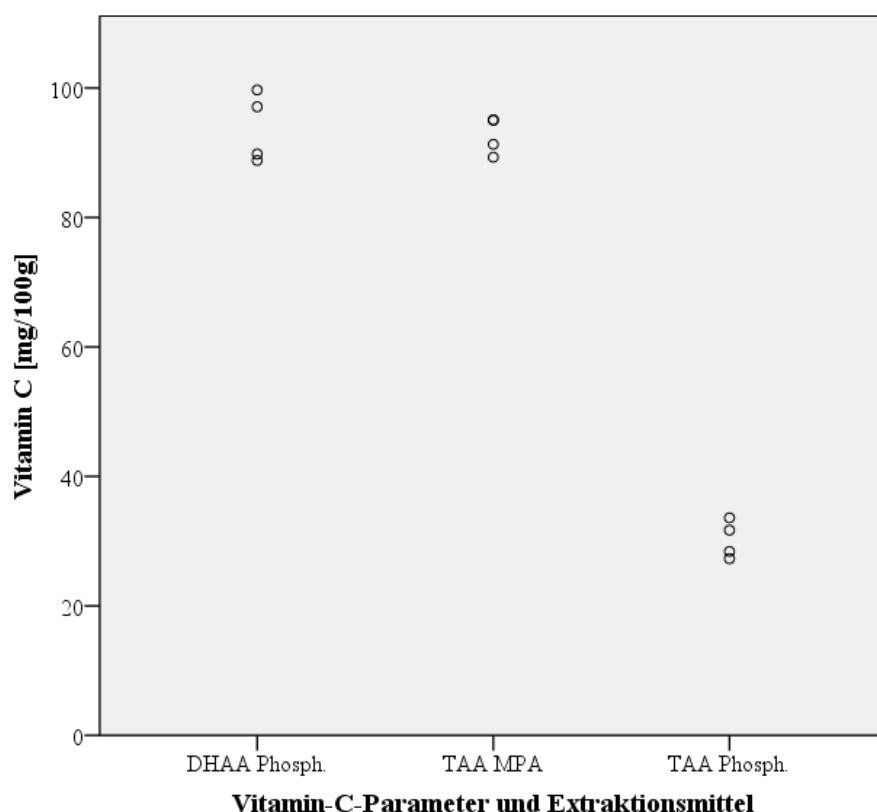


Abbildung 25: Quantifizierung des DHAA-Anteils aus Brokkoli mit verschiedenen Extraktionslösungen.

MPA (3% meta-Phosphorsäure, 8% Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 1,3), Phosphatpuffer (20 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 2,1). Vitamin C angegeben in mg TAA oder DHAA /100g essbarer Anteil frischen Lebensmittels.

Bei der Extraktion mit meta-Phosphorsäure zeigte das Chromatogramm für die DHAA Interferenzen und der Peak konnte nicht klar abgegrenzt werden. Daher konnten Peaks für die DHAA, die mit MPA extrahiert wurden, nicht ausgewertet werden. Wurde die Extraktion jedoch mit einem Natriumphosphatpuffer durchgeführt, so wurde ein klar abgegrenzter Peak für die DHAA sichtbar. Anhand eines Games-Howell post-hoc Test konnte ein statistisch signifikanter Unterschied der TAA, mit Phosphatpuffer extrahiert, zu den beiden anderen Para-

metern festgestellt werden. Dieser Unterschied ist auch sehr deutlich in Abbildung 25 erkennbar. Mit dem Phosphatpuffer wurde im Durchschnitt um 67% weniger TAA aus rohem Brokkoli erhalten, als mit MPA als Extraktionsmittel. Gleichzeitig ist aber der Wert für die DHAA in Phosphatpuffer in etwa so hoch wie der Wert für die TAA in MPA. Das würde bedeuten, dass im Natriumphosphatpuffer das gesamte Vitamin C oxidiert wurde und zum Zeitpunkt der Derivatisierung nur mehr als DHAA vorlag. Es ist jedoch unlogisch, dass Extrakte mit Phosphatpuffer weniger TAA enthalten als DHAA. Da sich die Gesamtascorbinsäure (TAA) als Summe aus der L-Ascorbinsäure (AA) und der Dehydroascorbinsäure (DHAA) ergibt, muss dieser Wert der höchste sein.

Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass das extrahierte Vitamin C im Phosphatpuffer nicht ausreichend stabilisiert wurde, dadurch zur DHAA oxidiert wurde und in weiterer Folge abgebaut wurde. Beide Werte des Natriumphosphatpuffers stammen aus demselben Extrakt, lediglich der Zeitpunkt der Derivatisierung unterscheidet die DHAA von der TAA. Zur Bestimmung der DHAA erfolgte die Derivatisierung unmittelbar nach der Extraktion, während das Extrakt zur Bestimmung der TAA vor der Derivatisierung noch über Aktivkohle oxidiert wurde. Wenn nun vor der Behandlung mit Aktivkohle das Vitamin C ohnehin schon in seiner oxidierten Form vorlag, so könnte die wenig stabile DHAA durch Aktivkohle oder andere Einflüsse hydrolysiert und damit abgebaut worden sein.

Insgesamt war es nicht möglich mit der verwendeten Fluoreszenzmethode den Anteil an DHAA zu bestimmen. Einerseits kam es mit MPA als Extraktionsmittel zu Interferenzen im Chromatogramm. Diese Interferenzen waren nicht mehr sichtbar sobald das Extrakt zur Bestimmung der TAA mit Aktivkohle behandelt wurde. Andererseits scheint ein Phosphatpuffer das Vitamin nicht ausreichend zu stabilisieren, wodurch das Vitamin wahrscheinlich zur Gänze als DHAA vorlag. Zudem wurde im Phosphatpuffer nach Behandlung mit Aktivkohle ein Verlust an TAA festgestellt. Damit eine Bestimmung des DHAA-Anteils mit der Fluoreszenzmethode gelingt, könnte ein anderes Extraktions- oder Oxidationsmittel getestet werden.

3.6 Vergleich von Extraktionsmitteln

Für die Extraktion von Vitamin C aus Lebensmitteln ist die Wahl des Extraktionsmittels eine wichtige Entscheidung. Bei der Wahl fließen sicherlich ökologische und ökonomische Aspekte mit ein, aber vor allem sollte das Vitamin im Extrakt möglichst stabil sein. Eine Extraktion im sauren Milieu, bei einem pH-Wert von ungefähr 2,1, wirkt sich positiv auf die Stabilität des Vitamin C aus (37). In Studien werden daher verschiedenste wässrige Extraktionslösungen aus Säuren, wie Zitronensäure, Trichloressigsäure oder Oxalsäure mit niedrigem pH-Wert getestet (19, 35, 45, 47, 52, 53, 67). Manchmal kommt auch deionisiertes Wasser zum Einsatz (14, 49). Am häufigsten wird jedoch eine wässrige Lösung von meta-Phosphorsäure (MPA), oft in Verbindung mit EDTA, eingesetzt (7, 16, 17, 23, 25, 29, 31, 33, 35, 36, 43–45, 48, 50, 51, 53, 54, 57, 64, 65). MPA an sich, aber auch EDTA als Chelatbildner üben dabei einen stabilisierenden Effekt auf das Vitamin C aus (37).

Auch in der Studie von Dodson et al. (1992), aus der die Methode zur fluorometrischen Bestimmung von Vitamin C entnommen wurde, wird MPA als Extraktionsmittel eingesetzt (54). Munyaka et al. (2010) hingegen verwendeten für die HPLC-Analyse von Vitamin C mittels UV-Detektion einen Phosphatpuffer mit EDTA als Extraktionslösung (34). In den folgenden Versuchen wurden daher vor allem MPA und Phosphatpuffer zur Extraktion und Stabilisierung von Vitamin C verglichen. Dazu wurde die Methode mit Fluoreszenzdetektion, wie im Methodenteil beschrieben, verwendet. Am Beispiel Brokkoli wurden mehrere Extraktionsversuche in Doppelbestimmung durchgeführt. Außerdem wurde der Zusatz von EDTA zur Extraktionslösung, und mögliche Auswirkungen einer thermischen Behandlung des Brokkoli im Kombidämpfer auf die Extrahierbarkeit und Stabilität von Vitamin C überprüft.

Auf den folgenden Seiten sind die Ergebnisse aus zwei durchgeführten Extraktionsmittelvergleichen und einer Untersuchung der Extraktstabilität grafisch dargestellt und werden diskutiert.

3.6.1 Extraktionsmittelvergleich - Vorversuch

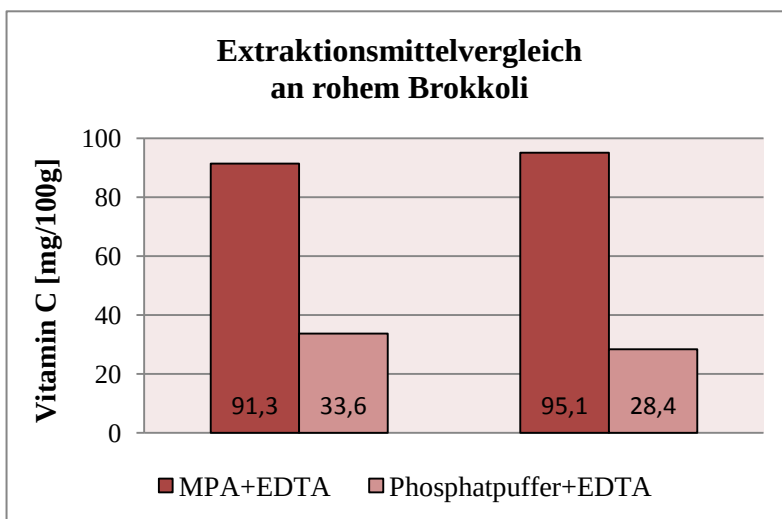


Abbildung 26: Vergleich von Extraktionsmitteln zur Extraktion von Vitamin C aus Brokkoli.

MPA (3% meta-Phosphorsäure, 8% Essigsäure, pH 1,3), EDTA (1 mM), Phosphatpuffer (20 mM NaH_2PO_4 , pH 2,1). Vitamin C angegeben in mg TAA/100g essbarer Anteil frischen Lebensmittels.

Aus Abbildung 26 geht ein deutlicher Unterschied zwischen MPA und Phosphatpuffer als Extraktionslösung für Vitamin C aus rohem Brokkoli hervor. Obwohl beiden Lösungen EDTA als Chelatbildner zugesetzt und ein pH-Wert von max. 2,1 verwendet wurde, konnte mit dem Phosphatpuffer deutlich weniger Vitamin C extrahiert werden, als mit MPA, beziehungsweise war das Vitamin im Phosphatpuffer weniger stabil. Für beide Extraktionen wurde eine Probe vom gleichen Brokkoli entnommen und der Probenaufschluss sowie die HPLC-Analyse wurden für alle Proben auf die gleiche Weise durchgeführt. Besonders bei einem eher inhomogenen Lebensmittel wie Brokkoli, der aus Stielen und Röschen besteht, können Schwankungen der Analysenergebnisse auftreten. Allerdings ist der Unterschied zwischen MPA und Phosphatpuffer relativ groß, sodass es sich nicht nur um eine Schwankung, sondern sehr wahrscheinlich um einen Verlust an TAA handelt. Der niedrigere Gehalt in Phosphatpuffer könnte durch enzymatische Einflüsse, Metallionen oder auch Sauerstoff bedingt sein, die zum Abbau von Vitamin C beitragen. Die Ascorbat-Oxidase zeigt bei pH-Werten unter 4 jedoch kaum noch enzymatische Aktivität (68). Der pH-Wert war bei beiden Extraktionslösungen geringer, daher wird kein großer enzymatisch bedingter Verlust vermutet. Wahrscheinlich unterstützen mehrere Faktoren den Verlust an TAA und ein Phosphatpuffer scheint diesbezüglich weniger stabilisierende Wirkung zu haben als MPA.

3.6.2 Extraktionsmittelvergleich

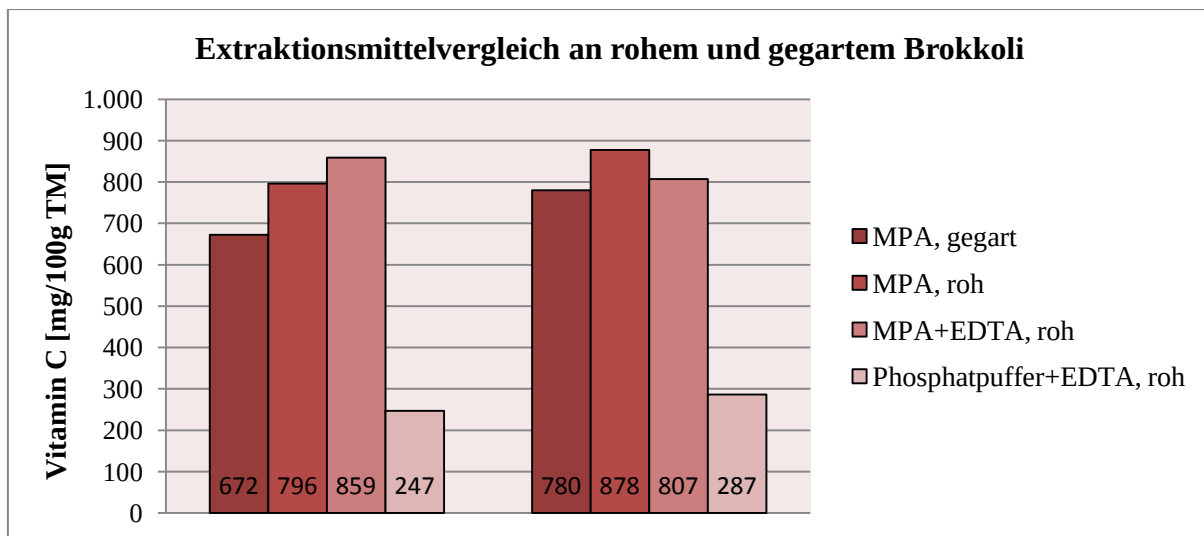


Abbildung 27: Vergleich von Extraktionsmitteln zur Extraktion von Vitamin C aus Brokkoli.

MPA (3% meta-Phosphorsäure, 8% Essigsäure, pH 1,3), EDTA (1 mM), Phosphatpuffer (20 mM NaH_2PO_4 , pH 2,1), gegart (thermische Behandlung im Kombidämpfer). Vitamin C angegeben in mg TAA/100g TM (Trockenmasse).

Wie aus Abbildung 27 gut erkennbar ist, besteht zwischen den unterschiedlichen Extrakten mit MPA kein großer Unterschied. Dafür ist der Unterschied zwischen MPA und Phosphatpuffer als Extraktionsmittel umso deutlicher. Die Extrakte mit MPA, sei es aus rohem oder gegartem Brokkoli, weisen allesamt einen weitaus höheren Gehalt an TAA auf, als Extrakte mit Phosphatpuffer. Auch der Zusatz von EDTA als Chelatbildner scheint keine wesentlichen Unterschiede zu bringen. Wie auch beim ersten Extraktionsmittelvergleich gab es hier keine Unterschiede in der Probenaufbereitung, die einen derart großen Unterschied zwischen MPA und Phosphatpuffer erklären würden. Um Lichteinflüsse zu minimieren wurden die Probenröhrchen mit Alufolie umwickelt. Die Extraktion wurde bei Raumtemperatur und unter normaler Luftatmosphäre durchgeführt. Ein Sauerstoffeinfluss kann daher nicht ausgeschlossen werden. Da für die fluorometrische Bestimmung aber ohnehin eine Oxidation der AA zur DHAA vorgenommen wurde, erschien eine Verarbeitung der Proben unter Sauerstoffausschluss nicht notwendig. Es wurde angenommen, dass Einflüsse wie der pH-Wert, stabilisierende Eigenschaften des Extraktionsmittels oder enzymatische Aktivität eine größere Rolle für Vitamin-C-Verluste spielen. Vergleicht man die gegarten und rohen Brokkoli-Proben, so ist kein großer Unterschied erkennbar. Die Proben wurden im Kombidämpfer bei 90°C und 60% Luftfeuchtigkeit für 7 min gegart. Der Temperaturverlauf des Garvorganges kann Abbildung 29 im Anhang entnommen werden. Gegarter Brokkoli zeigt zwar eine leichte Tendenz zu einem niedrigeren Gehalt an TAA, jedoch wurde dies nicht statistisch belegt und könnte

genauso gut eine natürliche Schwankung aufgrund von Inhomogenität zwischen einzelnen Brokkoli-Proben sein.

3.6.2.1 Studienlage zu meta-Phosphorsäure

Es gibt einige Studien, die ebenfalls das Extraktionsverhalten von MPA, jenem anderer Extraktionsmittel gegenübergestellt haben. Hernández et al. verglichen die Extraktion von einer Mischung aus 3% MPA und 8% Essigsäure mit jener von 0,1% Oxalsäure an tropischen Früchten. Die MPA-Essigsäure-Mischung ergab bei manchen Früchten eine deutlich bessere Ausbeute an TAA und wird daher gegenüber der Oxalsäure favorisiert (33). Chebrolu et al. (2012) zeigten, dass die AA aus Grapefruitsaft in MPA-Extrakten stabil ist, nicht aber in Extrakten mit Trichloressigsäure. Die Hauptgründe für die Stabilität von MPA-Extrakten liegen darin, dass oxidative Vorgänge, verursacht durch die Ascorbat-Oxidase und Metallkatalysatoren, inhibiert werden (45). Ein Vergleich der Extraktion von Vitamin C mit MPA (9%) und Zitronensäure (3%) aus verschiedenem Obst und Gemüse zeigte eine bessere Ausbeute und Stabilisierung von AA durch MPA. Lediglich bei Orangen erwies sich die Zitronensäure als besseres Extraktionsmittel, vermutlich weil diese Säure bereits ein natürlicher Bestandteil von Orangen ist (35). Die Extraktion von Vitamin C aus Kohl und Tomaten mittels Wasser wurde von Campos et al. (2009) untersucht. Eine Extraktion mit Wasser stellte sich als nicht effizient heraus und führt zu hohen Verlusten an AA verglichen mit MPA als Extraktionsmittel. Der Verlust durch Extraktion mit Wasser war bei Tomaten geringer als bei Kohl. Dies lässt sich durch den natürlichen, niedrigeren pH-Wert von Tomaten erklären, welcher zu einer Stabilisierung von Vitamin C beiträgt. Da die Ascorbat-Oxidase in Gemüse sehr präsent ist, kam es bei Extraktion mit Wasser zu einem Verlust an AA durch enzymatische Oxidation. Der pH-Wert einer MPA-Lösung ist deutlich niedriger als jener von Wasser, wodurch das Enzym weitgehend inaktiviert wird (68).

In den meisten Fällen konnten die Extrakte also durch die Verwendung von MPA besser stabilisiert werden als mit anderen Extraktionslösungen. Dennoch ist anzumerken, dass in manchen Studien lediglich der Gehalt an AA und nicht der Gehalt an TAA untersucht wurde. In solchen Fällen kann nicht nachgewiesen werden ob es zu einem tatsächlichen, unumkehrbaren Vitaminverlust, nämlich einem Verlust an TAA kam, oder ob sich lediglich das Gleichgewicht zwischen AA und DHAA verschoben hat. Nichtsdestotrotz ist eine Stabilisierung des Verhältnisses von AA und DHAA durch ein geeignetes Extraktionsmittel natürlich wünschenswert. Diese Eigenschaften scheint MPA als Extraktionsmittel zu erfüllen.

MPA als Extraktionsmittel kann jedoch auch Probleme bei chromatografischen Analysen mit sich bringen. Campos et al. (2009) berichteten von Interferenzen bei der Bestimmung von Vitamin C mittels HPLC mit UV-Detektion, verursacht durch MPA. MPA-Kristalle können sich in der Säule ablagern und dadurch die Auflösung der Peaks negativ beeinflussen. Durch eine veränderte Zusammensetzung des Extraktionsmittels konnten diese Interferenzen beseitigt werden. Es wird daher empfohlen, anstatt einer reinen MPA-Lösung, eine Mischung aus MPA, Essigsäure und EDTA mit geringerer MPA-Konzentration (3%) zur Extraktion zu verwenden (68).

Insgesamt geht aus den beiden durchgeführten Extraktionsversuchen hervor, dass Phosphatpuffer die TAA aus rohen Brokkoli-Proben nicht ausreichend stabilisiert. Da der Puffer mit 2,1 einen relativ niedrigen pH-Wert aufweist, sollte die Enzymaktivität weitestgehend gehemmt gewesen sein. Sauerstoff und Metallionen könnten hierbei eine größere Rolle gespielt haben, obwohl EDTA als Chelatbildner eingesetzt wurde. Sollte eine Extraktion mit Phosphatpuffer durchgeführt werden, empfiehlt sich möglicherweise eine höhere Konzentration an EDTA zu testen. Außerdem könnte der Ausschluss von Sauerstoff oder eine andere Probenvorbereitung, wie beispielsweise eine Gefriertrocknung, ebenfalls hilfreich sein um das Vitamin zu stabilisieren. Darüber hinaus ist MPA für die Extraktion von Vitamin C, aufgrund der aktuellen Studienlage und der hier präsentierten Ergebnisse, sehr empfehlenswert. Besonders bei Gemüse, das natürlicherweise einen höheren pH-Wert aufweist und dadurch das Vitamin C weniger stabilisiert, als viele Obstsorten, ist der stabilisierende Effekt durch MPA von Vorteil.

3.6.3 Untersuchung der Extraktstabilität

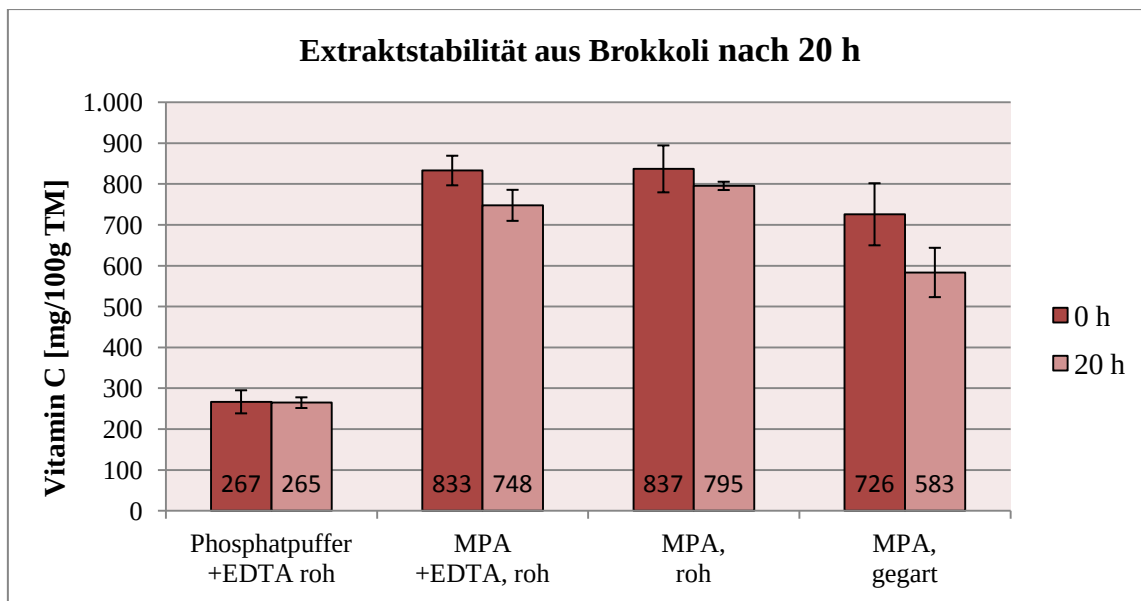


Abbildung 28: Stabilität von Vitamin C aus Brokkoli-Extrakten nach 20 h Kühlagerung.

MPA (3% meta-Phosphorsäure, 8% Essigsäure, pH 1,3), EDTA (1 mM), Phosphatpuffer (20 mM NaH_2PO_4 , pH 2,1), gegart (thermische Behandlung im Kombidämpfer). Vitamin C angegeben in mg TAA/100g TM (Trockenmasse).

Die Extrakte aus dem 2. Extraktionsmittelvergleich wurden für 20 h in Schottflaschen im Kühlschrank gelagert. Die Extrakte wurden vor der Lagerung bereits über Aktivkohle oxidiert, somit lag das darin enthaltene Vitamin C als DHAA vor. Nach 20 h Lagerung wurden die Extrakte sofort derivatisiert und mittels HPLC und Fluoreszenzmessung analysiert. In Abbildung 28 wurden die mittleren Gehalte der Vitamin-C-Extrakte vor und nach Lagerung miteinander verglichen. Die Werte stammen aus Doppelbestimmungen. In Anbetracht der Standardabweichungen unterscheiden sich die ermittelten Gehalte nicht wesentlich voneinander. Die Konzentration an Vitamin C in den verschiedenen Extraktionslösungen hat sich nach 20-stündiger Kühlagerung nicht maßgeblich verändert. Sowohl die MPA-Lösung, als auch der Phosphatpuffer scheinen das Vitamin nach erfolgter Oxidation über Aktivkohle gut zu stabilisieren. Ein Ausschluss von Sauerstoff erfolgte nicht. Für die Stabilisierung des Vitamin C war es ausreichend Licht auszuschließen, sowie die Extrakte bei Kühltemperatur und geringem pH-Wert zu lagern.

Der limitierende Faktor in den angeführten Extraktionsversuchen ist sicherlich die Anzahl der Bestimmungen. Um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten, sollten die Ergebnisse mit einer Mehrfachbestimmung abgesichert werden. Die erhaltenen Ergebnisse decken sich dennoch mit den Untersuchungen der Extraktstabilität aus anderen Studien. Extraktionsversuche an Grapefruitsaft von Chebrolu et al. (2012) zeigten, dass Extrakte in MPA-Lösungen

(1-5%, w/v) bei Raumtemperatur bis zu 48 h stabil sind und es zu keinen signifikanten Vitamin-C-Verlusten kommt (45). Die Stabilität von AA in MPA-Lösungen wurde auch durch Klimczak und Gliszczyńska-Świgło untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass eine bessere Stabilität von Vitamin C in höher konzentrierten MPA-Lösungen gegeben ist. Getestet wurde die Stabilität von Fruchtsäften und Vitamin-C-Tabletten in Extrakten mit 5-10% MPA. Innerhalb von 24 h Lagerung im Kühlschrank kam es zu minimalen, vernachlässigbaren Verlusten an Vitamin C (36). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Vitamin-C-Extrakte in geeigneten Lösungen auch über mehrere Stunden stabil sind, was für gleichzeitige Analysen mehrerer Proben wichtig ist, da zwischen der Probenaufbereitung und der Messung unterschiedliche Zeitspannen liegen können und sich auch der Zeitpunkt an dem einzelne Proben gemessen werden unterscheidet.

3.7 Vergleich der Vitamin-C-Gehalte aus Datenbanken

Wer im Internet nach dem Nährstoffgehalt von Lebensmitteln sucht, wird auf viele Seiten, mit teilweise sehr unterschiedlichen Angaben ohne Quellenangabe stoßen. Unter diesem Zusammenhang und auch um die, im Zuge dieser Arbeit, ermittelten Analysenwerte zu vergleichen, sowie natürliche Schwankungen von Vitamingehalten aufzuzeigen, sind in Tabelle 8 Mittelwerte für Vitamin-C-Gehalte aus etablierten Datenbanken angeführt.

Tabelle 8: Vergleich der Vitamin-C-Gehalte aus Analysenwerten und aus Datenbanken. USDA (United States Department of Agriculture), SFKDB (Souci-Fachmann-Kraut Datenbank). Vitamin C angegeben als Mittelwert in mg Gesamtascorbinsäure/100g essbarer Anteil frischen Lebensmittels.

Lebensmittel	USDA (11) mg/100 g	SFKDB (12) mg/100 g	Analysenwert mg/100 g
Apfel	5	12	1
Heidelbeeren	10	22	9
Kiwi	93	46	61
Avocado	10	13	3
Kopfsalat	4	13	7
Paradeiser	14	19	18
Brokkoli	89	100	92
Gurke	3	8	11
Paprika, grün	80	121	118

Die Analysenwerte stammen aus Doppelbestimmung, nur der Wert für Brokkoli stammt aus einer 4-fachen Bestimmung. Die Mittelwerte aus den durchgeführten Analysen stimmen in den meisten Fällen relativ gut mit zumindest einer der beiden Datenbanken überein. Ein paar Abweichungen sind auffällig. Der Apfel sticht heraus, da hier bei der Sorte "Gala" nur ein sehr geringer Vitamin-C-Gehalt von 1 mg/100 g ermittelt werden konnte, während in Datenbanken höhere Gehalte von 5-12 mg/100 g angegeben werden. Bei Äpfeln lässt sich dieser Unterschied relativ einfach daraus erklären, dass es viele unterschiedliche Sorten gibt und daher die Gehalte dementsprechend stark variieren können. Dies zeigten auch Fang et al. (2017), die über 400 verschiedene Apfelsorten untersuchten und dabei eine mehr als 26-fache Abweichung des AA-Gehaltes feststellen konnten (14).

Auch die Angaben aus der "USDA Food Composition Database" und der "Souci-Fachmann-Kraut-Datenbank" variieren relativ stark. In beiden Datenbanken können nicht nur die Mittelwerte, sondern auch Minima und Maxima nachgelesen werden. Paprika sind ein gutes Beispiel dafür, wie stark Vitamin-C-Gehalte in rohem Obst und Gemüse auf natürliche Weise

schwanken. Die SFKDB gibt für "Paprikafrüchte" ein Minimum von 91 mg/100 g und ein Maximum von 200 mg/100 g an (12). Die USDA gibt für "Peppers, sweet, green" ein Minimum von 65 mg/100 g und ein Maximum von 134 mg/100 g für den Vitamin-C-Gehalt an (11). Solche Unterschiede ergeben sich bei rohen, unverarbeiteten Lebensmitteln natürlicherweise aus vielerlei Faktoren wie beispielsweise Sorte, Anbaubedingungen, Umwelt- und Klimaeinflüsse, Reifegrad oder Lagerung (1). Außerdem spielen bei Angaben in Datenbanken sicherlich auch die Aktualität der Werte, sowie die verwendeten Analysenverfahren eine Rolle, weshalb sich Ergebnisse unterscheiden können.

4 Conclusio

Die beschriebene HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion eignet sich gut zur Bestimmung der Gesamtascorbinsäure in rohem Obst und Gemüse. Zur Differenzierung in L-Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure ist, sowohl bei UV-Detektion, als auch bei Fluoreszenzdetektion noch Forschungsarbeit notwendig. Der Anteil der Dehydroascorbinsäure konnte im Zuge dieser Arbeit mit Fluoreszenzdetektion nicht erfolgreich bestimmt werden, da es zu Interferenzen im Chromatogramm kam, beziehungsweise die Extraktlösung nicht stabil genug war. Ebenso gibt es Studien zur UV-Detektion, die davon berichten, dass die Subtraktionsmethode zur Bestimmung des Anteils an Dehydroascorbinsäure unpräzise Ergebnisse mit großen Variationskoeffizienten liefert. Es ist derzeit also zweifelhaft wie präzise Angaben zum Anteil der Dehydroascorbinsäure an der Gesamtascorbinsäure sind. Die Problematik ist wahrscheinlich auch zum Teil darauf zurückzuführen, dass sich das Verhältnis zwischen L-Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure durch vielerlei Einflussfaktoren schnell ändern kann. Beide Moleküle sind in Lösung relativ instabil, daher gilt es bei der Probenvorbereitung viele Aspekte zu beachten.

Die Fluoreszenzdetektion bietet meist eine höhere Empfindlichkeit als eine UV-Detektion und ist durch die Derivatisierung der Probe selektiver, wodurch Interferenzen mit anderen Probenbestandteilen vermieden werden können. Daher eignet sich die Fluoreszenzdetektion vor allem für Proben mit komplexer Matrix oder Proben bei denen im UV-Chromatogramm Interferenzen sichtbar sind. Ein weiterer Grund eine Fluoreszenzdetektion zu wählen können Lebensmittel mit sehr geringen Vitamin-C-Gehalten sein, die unter Umständen mit einer UV-Detektion nicht mehr gut erfasst werden können. Dies hängt natürlich individuell vom verwendeten Detektor ab. Die aufwendigere Probenvorbereitung ist ein klarer Nachteil der Fluoreszenzdetektion. Durch die Oxidation mit Aktivkohle ist ein zusätzlicher Filtrationsschritt notwendig, bei dem die Aktivkohle wieder entfernt wird und die Derivatisierung mit o-Phenylendiamin stellt ebenfalls einen zusätzlichen Schritt in der Probenaufbereitung dar. Sofern eine UV-Detektion problemlos abläuft und keine Matrixprobleme auftreten, ist es also nicht unbedingt notwendig Vitamin C mittels Fluoreszenzdetektion zu bestimmen. Bei dem Vergleich beider Methoden am Beispiel Fruchtsaft haben alle ermittelten Werte für die Gesamtascorbinsäure den Herstellerangaben entsprochen und es wurde kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Methoden festgestellt. Ein weiterer Versuch an der komplexeren Matrix des Brokkoli ergab einen kleinen Unterschied. Mittels UV-Detektion wurde signifi-

kant weniger an Gesamtascorbinsäure ermittelt, als mit der Fluoreszenzdetektion. Für diesen Vergleich wurde besonders auf die Probenhomogenität geachtet. Daher wurde eine größere Menge an Probe aufgeschlossen, aus der dann jeweils Teilproben für die UV- und Fluoreszenzmessung gezogen wurden. Somit wurden Unterschiede der Messergebnisse durch inhomogene Proben ausgeschlossen. Vor allem bei Brokkoli, der aus Stielen und Röschen besteht, ist dies ein wesentlicher Faktor. Es wird vermutet, dass es durch unterschiedliche Probenvorbereitung und Grundkalibrierung zu einer kleinen Abweichung der Ergebnisse zwischen UV- und Fluoreszenzdetektion kam. Die Proben wurden nach dem Aufschluss einerseits reduziert, andererseits oxidiert und derivatisiert und damit auch unterschiedlich verdünnt. Die Grundkalibrierung beider Methoden erfolgt ebenfalls mit unterschiedlichen Verdünnungsreihen. Bei der UV-Methode wird die L-Ascorbinsäure, bei der Fluoreszenzmethode ein Dehydroascorbinsäure-Derivat als Standardsubstanz herangezogen. Dies kann durchaus zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Da keine gravierenden Unterschiede beobachtet wurden deutet nichts auf einen systematischen Fehler durch eine der beiden Methoden hin. Der Forschungsschwerpunkt liegt derzeit stark bei der UV-Detektion und es gibt kaum Studien bei denen eine Fluoreszenzdetektion verwendet wird. Dennoch sollten die Vorteile einer Fluoreszenzdetektion unter Umständen in Betracht gezogen werden und die Forschung auf diesem Gebiet weiter betrieben werden.

In Wiederfindungsversuchen an rohem Obst und Gemüse wurden mögliche Matrixeinflüsse mittels Fluoreszenzdetektion untersucht. An Heidelbeeren, Paprika und Avocado konnten keine systematischen Abweichungen und keine Matrixeinflüsse festgestellt werden. Die Wiederfindungsraten dieser Lebensmittel lagen zwischen 89-105%. Für Gurken wurde eine Wiederfindung von 75% ermittelt und es lagen sowohl proportional- als auch konstant-systematische Abweichungen vor. Gurken stellen mit ihrem relativ Geringen Gehalt an Vitamin C und der hohen Aktivität der Ascorbat-Oxidase, von der in Kürbisgewächsen berichtet wurde, eine schwierige Matrix dar. Es könnte sich allerdings auch um einen Pipettierfehler während der Standardaddition gehandelt haben. Um das Ergebnis zu verifizieren könnte eine erneuter Wiederfindungsversuch an Gurken hilfreich sein, beziehungsweise könnten zum Vergleich auch andere Kürbisgewächse auf Matrixeinflüsse getestet werden.

Es gibt viele Studien die sich mit den Auswirkungen auf die Stabilität des Vitamin C durch Temperatur, pH-Wert, Wahl des Extraktionsmittels, Sauerstoff oder Metallionen beschäftigen. Studien zu thermischen Behandlungen versuchen entweder die Folgen von intensiveren thermischen Behandlungen zur Pasteurisierung von Lebensmitteln zu verdeutlichen oder es wird der Effekt einer eher kurzen Erhitzung zur Inaktivierung der Ascorbat-Oxidase und dem

Schutz des Vitamin C vor enzymatischer Oxidation beschrieben. Im Zuge dieser Arbeit wurde ein Probenaufschluss mit thermischer Inaktivierung der Ascorbat-Oxidase, sowie ein Probenaufschluss durch gepulste elektrische Felder mit unbehandelten Proben verglichen. Durch die thermische Behandlung wurden einerseits Verluste aufgrund der thermischen Instabilität des Vitamin C vermutet, andererseits wurde aber auch eine Stabilisierung des Vitamins durch Inaktivierung der Ascorbat-Oxidase erhofft. In der Literatur wird von einer stufenweisen Abnahme der Enzymaktivität ab 50°C und einer kompletten Inaktivierung durch eine Behandlung von 10 min bei 80°C berichtet. Die hier durchgeführte Behandlung war etwas kürzer, die Temperatur allerdings etwas höher, was zu der Annahme führt, dass das Enzym ausreichend inaktiviert wurde. Insgesamt konnte kein signifikanter Unterschied zwischen einer thermischen Behandlung der Proben und unbehandelten Proben festgestellt werden. Ein wichtiger Aspekt des Versuches ist die indirekte Erhitzung der Probe. Die Probe wurde im Extraktionsmittel, also meta-Phosphorsäure, über ein Wasserbad erhitzt. Daraus lässt sich schließen, dass das Enzym bereits durch die meta-Phosphorsäure gehemmt wurde und eine thermische Inaktivierung in diesem Fall keine zusätzlichen Vorteile brachte.

Aus der Behandlung mit gepulsten elektrischen Feldern wurden zweierlei Effekte vermutet. Zum Einen eine höhere Vitamin-C-Ausbeute durch den zusätzlichen Zellaufschluss, andererseits eine Freisetzung der membrangebundenen Ascorbat-Oxidase und damit eine verstärkte Oxidation des Vitamin C. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit gepulsten elektrischen Feldern (PEF) sind nicht eindeutig. Es wurde durch PEF sowohl ein Anstieg des Fluoreszenzsignals, als auch eine Abnahme des Gehaltes an Gesamtascorbinsäure verglichen mit unbehandelten Proben verzeichnet. In Studien wurde von einer möglichen Konformationsänderung des Vitamin C und einem damit verbundenen Anstieg des Fluoreszenzsignals, aber auch von geringen Verlusten durch PEF gegenüber unbehandelten Proben berichtet. Im Vergleich zu einer thermischen Behandlung resultieren PEF-Behandlungen meist in geringeren Verlusten. Bei PEF-Behandlungen mit intensivem Energieeintrag kann es zu einer Erwärmung der Proben und damit zu einem kombinatorischen Effekt aus PEF und Temperatur kommen. Dies kann zur Inaktivierung der Ascorbat-Oxidase, aber auch zu geringen Vitaminverlusten führen. Die Auswirkungen von PEF hängen also stark vom Energieeintrag und der Behandlungsdauer ab. Insgesamt kann aus den durchgeführten PEF-Versuchen kein eindeutiges Fazit gezogen werden. Eine Konformationsänderung und damit verbundene Erhöhung des Fluoreszenzsignals hatte vermutlich keine Auswirkungen, da die Probe nach der PEF-Behandlung über Aktivkohle zur Dehydroascorbinsäure oxidiert wurde. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind vielmehr dadurch erklärbar, dass sich die Reproduzierbarkeit der Probenahme aus rohem

Brokkoli an verschiedenen Tagen schwierig gestaltet. Der Gehalt an Vitamin C ist nicht in jedem Brokkoli gleich und kann relativ stark schwanken. Auch das Ausmaß in welchem die Stiele des Brokkoli entfernt wurden und in welchem Verhältnis dadurch Stiele und Röschen in der Probe vertreten sind kann einen Einfluss auf den ermittelten Vitamin-C-Gehalt nehmen. Es ist daher nicht sicher, ob eine PEF-Behandlung einen Vorteil gegenüber dem Aufschluss von unbehandelten Proben in meta-Phosphorsäure bringt.

Neben einer thermischen Behandlung und einer PEF-Behandlung wurden auch die Auswirkungen von unterschiedlichen Extraktionslösungen auf die Stabilisierung des Vitamin C untersucht. Meta-Phosphorsäure hat sich bereits in vielen Studien als vorteilhaft herausgestellt. Positive Effekte wie eine Hemmung der Enzymaktivität und der metallkatalysierten Oxidation des Vitamin C werden der meta-Phosphorsäure zugesprochen. Zum Vergleich wurde ein Puffer aus Natriumdihydrogenphosphat und EDTA herangezogen. Mit meta-Phosphorsäure als Extraktionsmittel, sei es mit oder ohne Zusatz von EDTA, mit oder ohne thermischer Vorbehandlung der Proben, wurden keine wesentlichen Unterschiede der Vitamin-C-Gehalte festgestellt. Die MPA-Extrakte waren zudem über einen Zeitraum von 20 h unter Kühlung ohne wesentliche Vitamin-C-Verluste stabil. Durch Verwendung von Phosphatpuffer hingegen konnte deutlich weniger Vitamin C ermittelt werden. Das deutet darauf hin, dass durch Verwendung des Phosphatpuffers, obwohl der pH-Wert mit 2,1 relativ niedrig war und EDTA als Chelatbildner zugesetzt wurde, das Vitamin nicht ausreichend stabilisiert wurde. Gründe für den Vitaminverlust in Phosphatpuffer könnten ein Einfluss durch Sauerstoff oder eine enzymatische Aktivität der Ascorbat-Oxidase sein. Daher sollte die Probenvorbereitung bei Verwendung von Phosphatpuffer angepasst werden, indem eine höhere Konzentration an EDTA eingesetzt wird, Sauerstoff ausgeschlossen wird oder eine thermische Enzyminaktivierung erfolgt. Die Ergebnisse aus diesem Versuch sind durch die Anzahl der durchgeführten Bestimmungen limitiert, da lediglich eine Doppelbestimmung erfolgte. Dennoch sprechen die Ergebnisse für die Verwendung von meta-Phosphorsäure zur Extraktion von Vitamin C aus rohen Lebensmitteln, da das Vitamin dadurch auch ohne thermische Enzyminaktivierung stabilisiert werden kann.

5 Literaturverzeichnis

1. Davey MW, van Montagu M, Inzé D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie IJJ, Strain JJ, Favell D, Fletcher J. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.* 2000; doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<825:AID-JSFA598>3.3.CO;2-Y.
2. Galvão AC, Robazza WS, Bianchi AD, Matiello JA, Paludo AR, Thomas R. Solubility and thermodynamics of vitamin C in binary liquid mixtures involving water, methanol, ethanol and isopropanol at different temperatures. *The Journal of Chemical Thermodynamics* 2018; doi:10.1016/j.jct.2018.02.005.
3. Du J, Cullen JJ, Buettner GR. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012; doi:10.1016/j.bbcan.2012.06.003.
4. Deutsch JC. Dehydroascorbic acid. *J Chromatogr A* 2000; doi:10.1016/S0021-9673(00)00166-7.
5. Wechtersbach L, Polak T, Ulrih NP, Cigić B. Stability and transformation of products formed from dimeric dehydroascorbic acid at low pH. *Food Chemistry* 2011; doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.055.
6. Sekiya J, Hamade R, Kimura O, Mizuno K, Shimose N. Purification and properties of ascorbate oxidase from cucumber fruit. *Soil Science and Plant Nutrition* 1990; doi:10.1080/00380768.1990.10415704.
7. Leong SY, Oey I. Effect of endogenous ascorbic acid oxidase activity and stability on vitamin C in carrots (*Daucus carota* subsp. *sativus*) during thermal treatment. *Food Chemistry* 2012; doi:10.1016/j.foodchem.2012.04.002.
8. Munyaka AW, Makule EE, Oey I, van Loey A, Hendrickx M. Thermal stability of L-ascorbic acid and ascorbic acid oxidase in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *J Food Sci* 2010; doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01573.x.
9. Wilson JX. The physiological role of dehydroascorbic acid. *FEBS Letters* 2002; doi:10.1016/S0014-5793(02)03167-8.
10. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Österreichische Gesellschaft für Ernährung (ÖGE), Schweizerische Gesellschaft für Ernährung (SGE). D-A-CH Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 3. aktualisierte Ausgabe. Neuer Umschau Buchverlag: Bonn, 2017.
11. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Internet: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/> [cited 2019 Jan 14].

12. Scherz H, Senser F, eds. Food composition and nutrition tables. 6th rev. and. Medpharm Scientific Publ.; CRC Press: Stuttgart, Boca Raton, London, New York.
13. Cunha-Santos ECE, Viganó J, Neves DA, Martínez J, Godoy HT. Vitamin C in camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh: evaluation of extraction and analytical methods. *Food Res Int* 2019; doi:10.1016/j.foodres.2018.08.031.
14. Fang T, Zhen Q, Liao L, Owiti A, Zhao L, Korban SS, Han Y. Variation of ascorbic acid concentration in fruits of cultivated and wild apples. *Food Chemistry* 2017; doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.014.
15. Spínola V, Llorent-Martínez EJ, Castilho PC. Determination of vitamin C in foods: current state of method validation. *J Chromatogr A* 2014; doi:10.1016/j.chroma.2014.09.087.
16. Octavia L, Choo WS. Folate, ascorbic acid, anthocyanin and colour changes in strawberry (*Fragaria × annanasa*) during refrigerated storage. *LWT* 2017; doi:10.1016/j.lwt.2017.08.049.
17. Cocetta G, Baldassarre V, Spinardi A, Ferrante A. Effect of cutting on ascorbic acid oxidation and recycling in fresh-cut baby spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Postharvest Biology and Technology* 2014; doi:10.1016/j.postharvbio.2013.09.001.
18. Xiao H-W, Pan Z, Deng L-Z, El-Mashad HM, Yang X-H, Mujumdar AS, Gao Z-J, Zhang Q. Recent developments and trends in thermal blanching – A comprehensive review. *Information Processing in Agriculture* 2017; doi:10.1016/j.inpa.2017.02.001.
19. Herbig A-L, Renard CMGC. Factors that impact the stability of vitamin C at intermediate temperatures in a food matrix. *Food Chemistry* 2017; doi:10.1016/j.foodchem.2016.10.012.
20. Patras A, Tiwari BK, Brunton NP. Influence of blanching and low temperature preservation strategies on antioxidant activity and phytochemical content of carrots, green beans and broccoli. *LWT - Food Science and Technology* 2011; doi:10.1016/j.lwt.2010.06.019.
21. Barros AIRNA, Nunes FM, Gonçalves B, Bennett RN, Silva AP. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry* 2011; doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.013.
22. Leong SY, Oey I. Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. *Food Chemistry* 2012; doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.052.
23. Mercali GD, Schwartz S, Marczak LDF, Tessaro IC, Sastry S. Ascorbic acid degradation and color changes in acerola pulp during ohmic heating: Effect of electric field frequency. *Journal of Food Engineering* 2014; doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.09.011.

24. Mercali GD, Jaeschke DP, Tessaro IC, Marczak LDF. Study of vitamin C degradation in acerola pulp during ohmic and conventional heat treatment. *LWT - Food Science and Technology* 2012; doi:10.1016/j.lwt.2011.12.030.
25. Phillips KM, Council-Troche M, McGinty RC, Rasor AS, Tarrago-Trani MT. Stability of vitamin C in fruit and vegetable homogenates stored at different temperatures. *Journal of Food Composition and Analysis* 2016; doi:10.1016/j.jfca.2015.09.008.
26. Leong SY, Oey I. Effect of pulsed electric field treatment on enzyme kinetics and thermostability of endogenous ascorbic acid oxidase in carrots (*Daucus carota* cv. Nantes). *Food Chemistry* 2014; doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.096.
27. Barba FJ, Parniakov O, Pereira SA, Wiktor A, Grimi N, Boussetta N, Saraiva JA, Raso J, Martin-Belloso O, Witrowa-Rajchert D, et al. Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. *Food Research International* 2015; doi:10.1016/j.foodres.2015.09.015.
28. Lamanaukas N, Bobinaitė R, Šatkauskas S, Viškelis P, Pataro G, Ferrari G. Pulsed electric field-assisted juice extraction of frozen/thawed blueberries. *Zemdirbyste-Agriculture* 2015; doi:10.13080/z-a.2015.102.007.
29. Agcam E, Akyildiz A, Akdemir Evrendilek G. A comparative assessment of long-term storage stability and quality attributes of orange juice in response to pulsed electric fields and heat treatments. *Food and Bioproducts Processing* 2016; doi:10.1016/j.fbp.2016.04.006.
30. Zhang Z-H, Zeng X-A, Brennan CS, Brennan M, Han Z, Xiong X-Y. Effects of Pulsed Electric Fields (PEF) on Vitamin C and Its Antioxidant Properties. *Int J Mol Sci* 2015; doi:10.3390/ijms161024159.
31. Dhakal S, Balasubramaniam VM, Ayvaz H, Rodriguez-Saona LE. Kinetic modeling of ascorbic acid degradation of pineapple juice subjected to combined pressure-thermal treatment. *Journal of Food Engineering* 2018; doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.12.016.
32. Fenoll J, Martínez A, Hellín P, Flores P. Simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in vegetables and fruits by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chemistry* 2011; doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.140.
33. Hernández Y, Lobo MG, González M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chemistry* 2006; doi:10.1016/j.foodchem.2005.04.012.
34. Munyaka AW, Oey I, van Loey A, Hendrickx M. Application of thermal inactivation of enzymes during vitamin C analysis to study the influence of acidification, crushing and

- blanching on vitamin C stability in Broccoli (*Brassica oleracea* L var. *italica*). *Food Chemistry* 2010; doi:10.1016/j.foodchem.2009.10.029.
35. Cotruț R, Bădulescu L. UPLC Rapid Quantification of Ascorbic Acid in Several Fruits and Vegetables Extracted Using Different Solvents. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 2016; doi:10.1016/j.aaspro.2016.09.047.
36. Klimczak I, Gliszczyńska-Świąło A. Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. *Food Chemistry* 2015; doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.104.
37. Nováková L, Solich P, Solichová D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2008; doi:10.1016/j.trac.2008.08.006.
38. Rojas AM, Gerschenson LN. Influence of System Composition on Ascorbic Acid Destruction at Processing Temperatures. *J. Sci. Food Agric.* 1997; doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199707)74:3<369:AID-JSFA812>3.3.CO;2-Y.
39. Herbig A-L, Maingonnat J-F, Renard CMGC. Oxygen availability in model solutions and purées during heat treatment and the impact on vitamin C degradation. *LWT - Food Science and Technology* 2017; doi:10.1016/j.lwt.2016.09.033.
40. Boatright WL. Oxygen dependency of one-electron reactions generating ascorbate radicals and hydrogen peroxide from ascorbic acid. *Food Chemistry* 2016; doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.141.
41. Jaeschke DP, Marczak LDF, Mercali GD. Evaluation of non-thermal effects of electricity on ascorbic acid and carotenoid degradation in acerola pulp during ohmic heating. *Food Chemistry* 2016; doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.117.
42. da Silva TL, Aguiar-Oliveira E, Mazalli MR, Kamimura ES, Maldonado RR. Comparison between titrimetric and spectrophotometric methods for quantification of vitamin C. *Food Chemistry* 2017; doi:10.1016/j.foodchem.2016.12.052.
43. Tarrago-Trani MT, Phillips KM, Cotty M. Matrix-specific method validation for quantitative analysis of vitamin C in diverse foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 2012; doi:10.1016/j.jfca.2012.03.004.
44. Gutiérrez-Quequezana L, Vuorinen AL, Kallio H, Yang B. Improved analysis of anthocyanins and vitamin C in blue-purple potato cultivars. *Food Chemistry* 2018; doi:10.1016/j.foodchem.2017.09.002.
45. Chebrolu KK, Jayaprakasha GK, Yoo KS, Jifon JL, Patil BS. An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC. *LWT - Food Science and Technology* 2012; doi:10.1016/j.lwt.2012.02.004.

46. Gamboa-Santos J, Cristina Soria A, Pérez-Mateos M, Carrasco JA, Montilla A, Villamiel M. Vitamin C content and sensorial properties of dehydrated carrots blanched conventionally or by ultrasound. *Food Chemistry* 2013; doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.122.
47. Gamboa-Santos J, Megías-Pérez R, Soria AC, Olano A, Montilla A, Villamiel M. Impact of processing conditions on the kinetic of vitamin C degradation and 2-furoylmethyl amino acid formation in dried strawberries. *Food Chemistry* 2014; doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.004.
48. Gómez Ruiz B, Roux S, Courtois F, Bonazzi C. Kinetic modelling of ascorbic and dehydroascorbic acids concentrations in a model solution at different temperatures and oxygen contents. *Food Res Int* 2018; doi:10.1016/j.foodres.2018.01.051.
49. Gökmen V, Kahraman N, Demir N, Acar J. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* 2000; doi:10.1016/S0021-9673(00)00080-7.
50. Mazurek A, Jamroz J. Precision of dehydroascorbic acid quantitation with the use of the subtraction method--validation of HPLC-DAD method for determination of total vitamin C in food. *Food Chemistry* 2015; doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.065.
51. Usaga J, Manns DC, Moraru CI, Worobo RW, Padilla-Zakour OI. Ascorbic acid and selected preservatives influence effectiveness of UV treatment of apple juice. *LWT* 2017; doi:10.1016/j.lwt.2016.08.037.
52. Reyes LF, Villarreal JE, Cisneros-Zevallos L. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. *Food Chemistry* 2007; doi:10.1016/j.foodchem.2006.03.032.
53. Kall MA, Andersen C. Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1999; doi:10.1016/S0378-4347(99)00193-0.
54. Dodson KY, Young ER, Soliman AGM. Determination of total vitamin C in various food matrixes by liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of AOAC International* 1992; 75:887–91.
55. Matissek R, Steiner G, Fischer M, eds. *Lebensmittelanalytik*. 5., vollst. überarb. u. akt. Aufl. 2014. Imprint: Springer Spektrum: Berlin, Heidelberg.
56. Funk W, Dammann V, Donnevert G, eds. *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*. Anwendungen in der Umwelt-, Lebensmittel- und Werkstoffanalytik, Biotechnologie und

- Medizintechnik. 2., vollständig überarb. und erweit. Auflage. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA: Weinheim.
57. Burini G. Development of a quantitative method for the analysis of total L-ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2007; doi:10.1016/j.chroma.2007.03.013.
58. Rozet E, Ceccato A, Hubert C, Ziemons E, Oprean R, Rudaz S, Boulanger B, Hubert P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J Chromatogr A* 2007; doi:10.1016/j.chroma.2007.03.111.
59. Meiklejohn GT, Stewart CP. Ascorbic acid oxidase from cucumber. *Biochem. J.* 1941; doi:10.1042/bj0350755.
60. Wechtersbach L, Cigić B. Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. *J Biochem Biophys Methods* 2007; doi:10.1016/j.jbbm.2007.04.007.
61. Speek AJ, Schrijver J, and Schreurs, Wil H. P. Fluorometric determination of total vitamin C and total isovitamin C in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization. *J. Agric. Food Chem.* 1984; 32:352–5.
62. Pereira RN, Galindo FG, Vicente AA, Dejmek P. Effects of Pulsed Electric Field on the Viscoelastic Properties of Potato Tissue. *Food Biophysics* 2009; doi:10.1007/s11483-009-9120-0.
63. Elez-Martínez P, Martín-Belloso O. Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup. *Food Chemistry* 2007; doi:10.1016/j.foodchem.2006.04.048.
64. Moussa-Ayoub TE, Jäger H, Knorr D, El-Samahy SK, Kroh LW, Rohn S. Impact of pulsed electric fields, high hydrostatic pressure, and thermal pasteurization on selected characteristics of *Opuntia dillenii* cactus juice. *LWT - Food Science and Technology* 2017; doi:10.1016/j.lwt.2016.10.061.
65. Rigaux C, Georgé S, Albert I, Renard CMGC, Carlin F. A mechanistic and probabilistic model estimating micronutrient losses in industrial food processing: Vitamin C and canned green beans, a case-study. *LWT - Food Science and Technology* 2016; doi:10.1016/j.lwt.2016.01.051.
66. Odriozola-Serrano I, Hernández-Jover T, Martín-Belloso O. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chemistry* 2007; doi:10.1016/j.foodchem.2007.02.037.
67. Zhang Y, Zhao J-H, Ding Y, Xiao H-W, Sablani SS, Nie Y, Wu S-J, Tang X-M. Changes in the vitamin C content of mango with water state and ice crystals under state/phase tran-

sitions during frozen storage. Journal of Food Engineering 2018;
doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.11.003.

68. Campos FM, Ribeiro SMR, Della Lucia CM, Pinheiro-Sant'Ana HM, Stringheta PC. Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. Quím. Nova 2009; doi:10.1590/S0100-40422009000100017.

6 Anhang

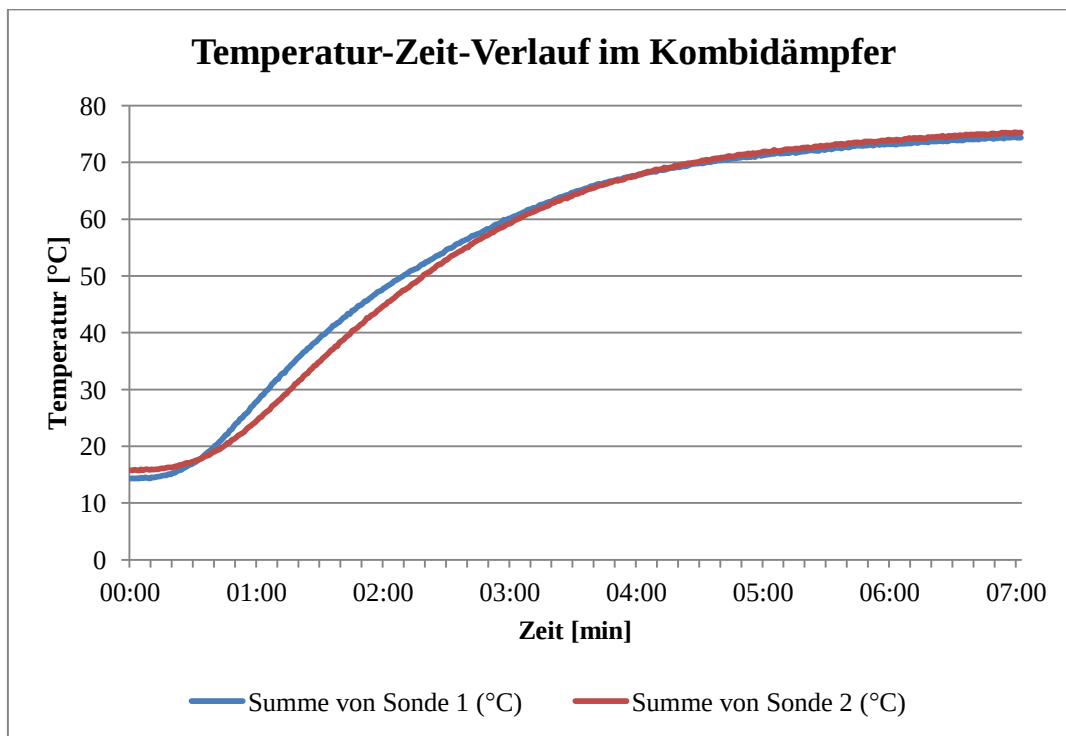


Abbildung 29: Temperaturverlauf im Brokkoli während des Garens im Kombidämpfer. Sonde 1 und Sonde 2 wurden in ausgewählte Brokkoli-Röschen, zur Temperaturoaufzeichnung im Inneren des Gargutes, gesteckt.

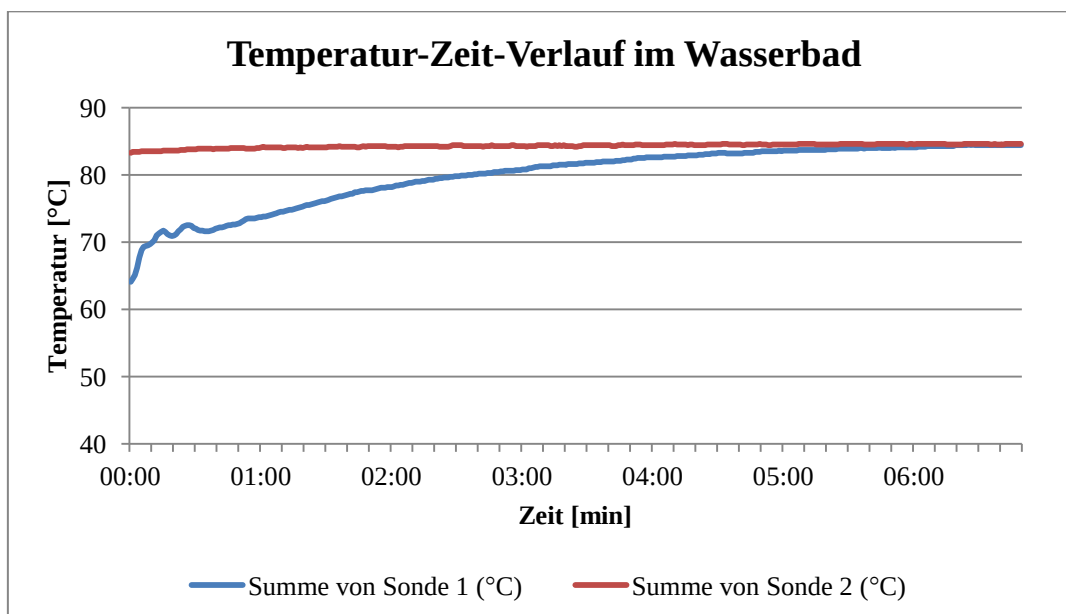


Abbildung 30: Temperaturverlauf während der thermischen Behandlung im Wasserbad. Sonde 1 zeichnete die Temperatur im Inneren des Gargutes, einem Brokkoli-Röschen, auf. Sonde 2 zeichnete die Temperatur des Wasserbades auf.