



Hochschule Anhalt

Anhalt University of Applied Sciences

Fachbereich Angewandte Biowissenschaften
und Prozesstechnik

Methodenentwicklung zur Bestimmung des Chlorophyllgehalts in
Ananassäften

Bachelorarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades
Bachelor of Science
(B.Sc.)

von: Katja Steffenhagen
geboren am 26.12.1992
Studiengang: Lebensmitteltechnologie
Gutachter: Prof. Dr. Richter
Dr. Fiedler

Köthen, den 25.08.2016

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Datum, Ort

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Bilderverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
2 Stand des Wissens und der Technik	2
2.1 Technologie	2
2.1.1 Allgemeine Informationen zur Ananas-Pflanze, Ananas-Frucht sowie zu Fruchtsaft und weiteren Produkten	2
2.1.2 Herstellung von Ananassaft aus der ganzen Frucht	3
2.1.3 Herstellung von Ananassaft aus Überresten der Konservenproduktion	6
2.2 Qualitätsparameter von Ananas	9
2.2.1 Parameter zum Nachweis der Authentizität.....	9
2.2.2 Chlorophyll zum Nachweis des Schalenanteils.....	11
2.2.2.1 Eigenschaften des Chlorophylls	11
2.2.2.2 Methoden zur Chlorophyllbestimmung	12
3 Material und Methoden	14
4 Experimenteller Teil	20
4.1 Überlegungen zur Probenaufbereitung.....	20
4.2 Durchgeführte Versuche	22
4.2.1 Auswahl eines geeigneten Trockenmittels.....	22
4.2.2 Identifikation des Chlorophylls.....	22
4.2.3 Stabilitätsverhalten des Chlorophylls	24
4.2.4 Standardaddition zur Überprüfung der Messergebnisse	25
4.2.5 Chlorophyllkonzentrationen der verschiedenen Fruchtpartien	27
5 Ergebnisse und Diskussion	30
5.1 Statistische Auswertung von Messreihen zur Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	30
5.2 Ergebnisse und Diskussion	34
6 Zusammenfassung	39
7 Literaturverzeichnis	40
A Anhang	A-1
B Anhang Messergebnisse	B-1

Abkürzungsverzeichnis

AIJN	Alt: Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Union Neu: European Fruit Juice Association
AOAC	Association of Analytical Communities
bidest.	bidestilliert
BLK	Basislinienkorrektur
CAM	Crassulacean Acid Metabolism
Chl	Chlorophyll
CoP	Code of Practice
DC	Dünnschichtchromatographie
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.
EU	Europäische Union
ges	gesamt
GfL	Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
MU	Erweiterte Messunsicherheit
QMH	Qualitätsmanagementhandbuch
RSD	Laborinterne Reproduzierbarkeit
RSK	Richtwert und Schwankungsbreite von Kennzahlen
SOP	Standard Operating Procedure
UV	Ultra-Violett

Bilderverzeichnis

Abbildung 1: Ananas als Zierpflanze	3
Abbildung 2: Ananas aus dem Supermarkt.....	3
Abbildung 3: Verarbeitung von Ananas	4
Abbildung 4: Schematische Darstellung einiger Hochdruckhomogenisatoren.....	5
Abbildung 5: Schematische Darstellung Rotor-Stator-Mühlen	5
Abbildung 6: Technische Zeichnung eines Eradikators	7
Abbildung 7: Nitratverteilung in der Frucht;.....	10
Abbildung 8: Strukturformel der Chlorophylle a und b mit den jeweiligen Substituenten	11
Abbildung 9: Schematischer Arbeitsablauf der Analysenmethode	14
Abbildung 10: Erklärung der Basislinienkorrektur	20
Abbildung 11: Fließdiagramm der Analysenmethode	21
Abbildung 12: DC-Platte nach der Entwicklung	23
Abbildung 13: Schema DC-Platte nach der Entwicklung.....	23
Abbildung 14: DC-Platte unter UV-Licht	23
Abbildung 15: Schema DC-Platte unter UV-Licht.....	23
Abbildung 16: Chlorophyllabbau in Aceton bei Tag und Nacht	25
Abbildung 17: Graphische Auswertung des Konzentrates	26
Abbildung 18: Graphische Auswertung des Konzentrates als Saft aufgearbeitet.....	26
Abbildung 19: Zerlegungsschema der Ananas	27
Abbildung 20: Ananas in verschiedene Fruchtportionen zerlegt	28
Abbildung 21: Bilder der Aufarbeitung von Ananas 2.....	A-5
Abbildung 22: Bilder der Aufarbeitung von Ananas 3.....	A-5

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verteilung der Inhaltsstoffe in der Frucht.....	10
Tabelle 2: Verwendete Geräte.....	19
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien	19
Tabelle 4: Erklärung der Fruchtpartien	28
Tabelle 5: Photometrische Ergebnisse der Fruchtpartien aus Ananas 1	28
Tabelle 6: Photometrische Ergebnisse der Fruchtpartien aus Ananas 2 und 3	29
Tabelle 7: Messreihe unter Wiederholbedingungen.....	30
Tabelle 8: Messreihe nach Bedingungen des QMH der GfL	32
Tabelle 9: Werte des vierfachen Rauschens	34
Tabelle 10: Messergebnisse zum Versuch Stabilitätsverhalten des Chlorophylls	B-1
Tabelle 11: Messergebnisse zum Versuch Standardaddition zur Überprüfung der Messergebnisse	B-2
Tabelle 12: Messergebnisse zum Versuch Chlorophyllkonzentrationen der verschiedenen Fruchtpartien Ananas 1	B-2
Tabelle 13: Messergebnisse zum Versuch Chlorophyllkonzentrationen der Verschieden Fruchtpartien Ananas 2 und Ananas 3	B-2
Tabelle 14: Messergebnisse der statistischen Auswertung Messreihe 1	B-2
Tabelle 15: Messergebnisse der statistischen Auswertung Messreihe 2	B-2

1 Einleitung

Obst und Gemüse sind wichtige Lieferanten für Vitamine, Mineralstoffe, Ballaststoffe und die vielfältig gesundheitsfördernden sekundären Pflanzenstoffe. Sie sind nicht nur wegen ihres ernährungsphysiologischen Wertes, sondern auch wegen ihres erfrischenden Geschmacks ein elementarer Bestandteil der Ernährung. Die Verfügbarkeit von frischem Obst war in der Vergangenheit aufgrund der Verderbsanfälligkeit von der Jahreszeit abhängig. Deshalb wurde Obst als Konserve oder Saft konserviert. Heutzutage kann der Bedarf aufgrund von globalem Handel ganzjährig gedeckt werden. Saft ist dennoch Teil der Ernährungskultur geblieben und hat sich zu einem eigenständigen Industriezweig als Teil der Getränkeindustrie entwickelt. In Deutschland gibt es ca. 375 Fruchtsaftproduzenten mit einem Gesamtumsatz von ungefähr 3,82 Mrd. € für das Geschäftsjahr 2015. Der Verbrauch im Jahr 2015 von Frucht- und Gemüsesäften beläuft sich auf 22,5 l/Kopf, von Frucht- und Gemüsenektaren auf 10,5 l/Kopf, von Fruchtsaftgetränken auf 9,3 l/Kopf und von Fruchtsaftschorlen auf 7,8 l/Kopf [1]. Durch die Globalisierung der Märkte ist die Produktvielfalt im Handel enorm gestiegen.

Ananas spielt mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von 0,5 l eine etwas untergeordnete Rolle, liegt aber immer noch auf Platz 5 der beliebtesten Fruchtsäfte [1]. Ananas kann als Direktsaft, Fruchtsaft aus Konzentrat oder Fruchtnektar angeboten werden. Direktsaft und Fruchtsaft aus Konzentrat müssen einen Fruchtsaftgehalt von 100 % aufweisen. Fruchtnektar muss laut Fruchtsaft- und Erfrischungsgetränkeverordnung einen Mindestfruchtsaftgehalt von 50 % aufweisen [2], da Ananas zu den Früchten zählt, deren Saft zum direkten Verzehr geeignet ist.

Der Verzehr von Fruchtsaft hat sich mit dem gestiegenen Gesundheitsbewusstsein entwickelt. Dies steht im Zusammenhang mit den positiven Eigenschaften einiger Inhaltsstoffe, wie z. B. Polyphenole oder Flavonoide als Antioxidantien. Die DGE empfiehlt seit längerem, fünf Portionen Obst und Gemüse am Tag zu verzehren [3], dabei entsprechen 150 - 200 ml Flüssigkeit einer Portion. Es soll das Risiko für Krankheiten, wie Bluthochdruck, koronare Herzkrankheiten und Schlaganfälle senken.

Wie im gesamten Lebensmittelbereich ist auch die Getränkeindustrie stark reglementiert, so gilt für Fruchtsaft auf Ebene der EU die „Richtlinie 2012/12/EU über Fruchtsäfte und bestimmte gleichartige Erzeugnisse für die menschliche Ernährung“ [4] und die ins deutsche Recht umgesetzte Fruchtsaft- und Erfrischungsgetränkeverordnung - FrSaftErfrischGetrV [2].

Zur Kontrolle der gesetzlichen Vorgaben wurden umfangreiche Analysemethoden explizit nur für die Untersuchung von Fruchtsäften entwickelt und angewendet. Die Fruchtsaftanalytik beschäftigt sich mit dem Nachweis der Authentizität von Frucht- und Gemüsesäften. Als Hilfestellung der Beurteilung wurde 1987 „RSK - Werte Die Gesamtdarstellung“ veröffentlicht. Diese wurde durch den „AIJN - Code of Practice“ erweitert. Beide Werke enthalten Richtwerte und Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen sowie Kommentare zu deren Erklärung.

Diese Bachelorarbeit ist in Zusammenarbeit mit der GfL - Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung mbH entstanden. Der Arbeitsbereich der GfL liegt in der Analyse von Frucht- und Gemüsesäften und deren qualitative und quantitative Bewertung. Ananas stellt aufgrund ihres besonderen Aromas, der Herkunft und der Herstellung des Saftes in den Anbauländern eine Besonderheit dar. Der Gesetzesgeber macht in den Produktdefinitionen eindeutige Vorgaben zu der Herstellung und Qualität der Produkte. Die Besonderheit des Fruchtkörpers und die daraus resultierenden Herstellungsverfahren, können die Qualität des Saftes durch Schalenanteile mindern. Aufgabenstellung dieser Bachelorarbeit war es den Nachweis zu erbringen, ob sich der Chlorophyllgehalt als Parameter für den Schalenanteil im Saft eignet. Daraufhin musste eine Methode zur Bestimmung des Chlorophyllgehaltes entwickelt und validiert werden.

2 Stand des Wissens und der Technik

2.1 Technologie

2.1.1 Allgemeine Informationen zur Ananas-Pflanze, Ananas-Frucht sowie zu Fruchtsaft und weiteren Produkten

Die Ananas zählt zu den tropischen Früchten, d. h. die Pflanzen wachsen in der tropischen Temperaturzone zwischen dem 25. Grad nördlicher Breite und dem 25. Grad südlicher Breite [5]. In der tropischen Zone herrschen das ganze Jahr gleichbleibende Temperaturen um die 27 °C. Die typischen Anbauländer sind Costa Rica, Thailand und die Philippinen sowie in kleineren Mengen Indonesien und Kenia [6]. Ananas ist eine Scheinfrucht und gehört in die Pflanzenfamilie der Bromeliaceae. Die Pflanzen haben sich mit dem CAM (Crassulacean Acid Metabolism) an die Umgebungsbedingungen angepasst [7]. Sie öffnen nachts ihre Spaltöffnungen und speichern das für die Photosynthese benötigte CO₂ in Form von Hydroxybernsteinsäure (Äpfelsäure, Malat). Tagsüber kann bei geschlossenen Spaltöffnungen mit dem gespeicherten CO₂ Photosynthese betrieben werden. Dieser Mechanismus hat den Vorteil, dass tagsüber kein Gasaustausch über die Spaltöffnungen erfolgen muss und somit kein Wasser verdunsten kann. Im Vergleich dazu ist nachts der Wasserverlust aufgrund der höheren Luftfeuchtigkeit geringer [8].

In Abbildung 1 ist eine Ananas als Zierpflanze zu erkennen. Sie ist lediglich in ihren Proportionen kleiner als eine normale Ananaspflanze. Auch eine normale Pflanze besteht aus einem kleinen Stamm auf dem sich eine Blattrosette aus länglichen, steifen Blättern mit einer Länge von 60 - 120 cm befindet. Aus der Mitte der Blattrosette entsteht ein ca. 30 cm langer Blütenstand. Dieser bildet aus etwa 100 Blüten, die an einer fleischigen Blütenachse sitzen, eine sogenannte Scheinfrucht. Scheinfrüchte werden aus mehreren Fruchtknoten gebildet, die durch ihre Fruchtwände zu einer Verbreitungseinheit verbunden sind [9]. Auch die Blüten der Ananas sind fleischig ummantelt und wachsen mit der Zeit zu dieser Scheinfrucht zusammen.

Die Schale der Ananas besteht daher aus den zusammengewachsenen, wabenförmig angeordneten Blütenüberbleibseln (siehe Abbildung 2). Sie umschließt das gelbliche, saftige, süßlich-säuerliche Fruchtfleisch, in dessen Mitte sich ein verholzter Strunk befindet. Die Ananasfrucht kann je nach Sorte und Anbaugebiet eine Masse von 0,5 – 5,0 kg erreichen [7].



Abbildung 1: Ananas als Zierpflanze



Abbildung 2: Ananas aus dem Supermarkt

Die in der EU verzehrten Ananasprodukte stammen hauptsächlich aus Thailand und Costa Rica, kleinere Mengen kommen aus Kenia und Indonesien [6]. Ananassaft fällt bei der Produktion von Ananasscheiben oder -stücken als Nebenprodukt an. Der Saft wird auch als Hauptprodukt gewonnen. Beide Verfahren werden im Zuge dieser Arbeit näher erläutert.

Für die Ananasscheiben und -stücke werden geeignete Sorten kultiviert. Zu den bekanntesten Sorten zählen Pernambuco, Perolera, Queen, Red Spanish und Smooth Cayenne [5].

2.1.2 Herstellung von Ananassaft aus der ganzen Frucht

Die Herstellung von Saft als Primärprodukt ist abhängig von der Größe der Frucht, da zu kleine Früchte nicht für die Konservenproduktion geeignet sind. Aus ihnen kann der benötigte Zylinder nicht herausgestanzt werden. Zu kleine Früchte werden aussortiert; sie werden entweder zur direkten Saffherstellung genutzt oder zu Stücken weiter verarbeitet. Eine Maschine der Firma ABL S.r.l. stellt aus ganzen Früchten Stücke her; bei dieser Methode fällt jedoch kein Saft als Nebenprodukt an. Sie entfernt den Strunk, hobelt die Schale ab, entfernt die Enden und nutzt den kompletten verbleibenden Fruchtkörper zur Produktion von Fruchtstücken.

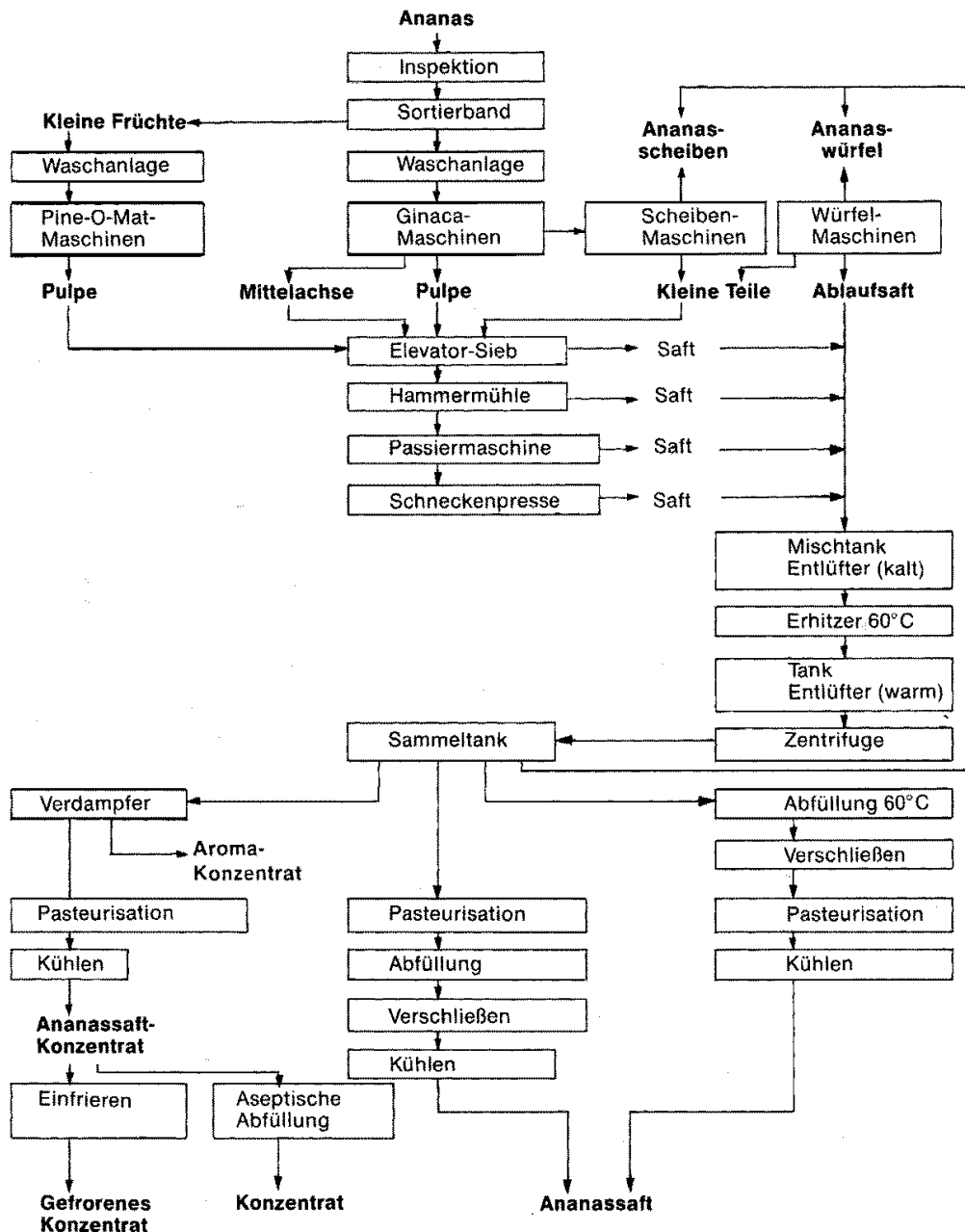


Abbildung 3: Verarbeitung von Ananas [5]

Nach einem Patent der Firma Wesergold Getränkeindustrie GmbH & Co. KG aus dem Jahr 2001 [10] ist es üblich, die kleinen, kompletten Früchte in einer Pine-o-Mat-Maschine zu zerschneiden und anschließend zu entsaften. Dies geschieht zwischen einer Entsaftungstrommel und einer perforierten Wand. Die Früchte werden dabei gegen die perforierte Wand gedrückt und der Saft tritt aus. Bei diesem Verfahren gelangen keine Teile der Fruchtschale mit in den Saft, jedoch tritt aus der Schale ein Pflanzensaft aus. Dieser Pflanzensaft führt ungewollte Inhaltsstoffe mit sich. Bei höherem Pressdruck, der die Saftausbeute zwar steigert, gelangt allerdings auch mehr Pflanzensaft in den Fruchtsaft. Dies hat eine negative Auswirkung auf Farbe und Geschmack. Die Saftausbeute ist daher abhängig vom Pressdruck und beträgt in etwa 50 %. Der Saft wird anschließend durch ein feines Sieb

passiert und pasteurisiert. Bei der Herstellung von Ananassaft gibt es des Weiteren das Problem der Trübungsstabilität. In Ananassaft gibt es kleinere Mengen an Feintrub, mit einem mittleren Partikeldurchmesser von $0,5 \mu\text{m}$, und größere Mengen Grobtrub, mit einem mittleren Partikeldurchmesser von $100 \mu\text{m}$. Aufgrund des größeren Partikeldurchmessers des Grobtrubes, dessen Wert um das Zehnfache höher ist als bei trüben Apfelsäften, sedimentieren die Partikel sehr schnell. Dieses Problem kann vom Hersteller auf zwei Arten gelöst werden. Die mechanische Lösung ist das Zerkleinern des Grobtrubes durch Hochdruckhomogenisation oder mittels Kolloidmühlen. Bei der Hochdruckhomogenisation trifft der Saft mit dem enthaltenen Trub mit hohem Druck auf einen Ventilstempel. Der Ventilstempel hat eine Änderung der Fließrichtung von bis zu 90° zur Folge (siehe Abbildung 4). Um den Homogenisationsdruck bei einem konstanten Volumenstrom zu ändern, ist der Ventilstempel im Abstand verstellbar. Die Produktbearbeitung erfolgt kontinuierlich und hat eine sehr hohe Produktbeanspruchung zur Folge.

Radialdiffusoren:

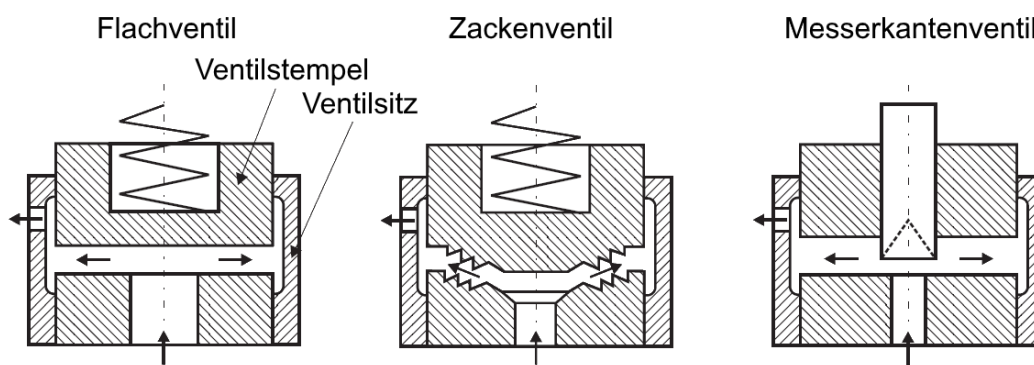


Abbildung 4: Schematische Darstellung einiger Hochdruckhomogenisatoren [11]

Bei Kolloidmühlen (Rotor-Stator-Mühle) fließt der Saft radial zwischen Rotor und Stator (siehe Abbildung 5). Der Rotor dreht sich und die Partikel werden durch Scher- und Trägheitskräfte zerkleinert. Ausschlaggebend für die Partikelgröße ist der Abstand zwischen Rotor und Stator. Kolloidmühlen arbeiten kontinuierlich bei einem hohen Produktdurchsatz, wobei die Produktbeanspruchung ebenfalls relativ hoch ist.

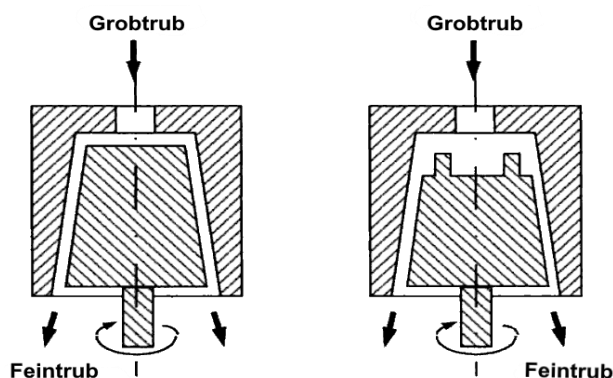


Abbildung 5: Schematische Darstellung Rotor-Stator-Mühlen [12]

Ein weiteres Verfahren hat sich die Wesergold Getränkeindustrie GmbH & Co. KG 2001 patentieren lassen. Bei diesem Verfahren werden bereits gesäuberte Ananasfrüchte ohne Blattkrone verwendet. Diese Früchte werden zur Abtrennung der Schale in der äußeren Partie gefrostet. Dies dient dazu, die Schale hart und spröde zu machen, um das Entfernen zu erleichtern. Dabei sollte die Schale auf einer Mindestdiefe von 2 cm gefroren sein, um sie gut entfernen zu können. Die Randschicht sollte idealerweise eine Gefrieretemperatur von - 18 °C bis - 10 °C aufweisen. Da sonst aufgrund der gefrierpunktserniedrigenden Eigenschaften der enthaltenen Stoffe keine ausreichenden Härte gegeben ist. Das Gefrieren kann durch unterschiedliche Verfahren realisiert werden. Zum einen kontinuierlich in einem Gefriertunnel, der durch kryogene Gase gekühlt wird. Aber auch batchweise, entweder in einem Batchfroster oder in einem Gefrierlager. Der Batchfroster wird ebenso wie der Gefriertunnel mit kryogenen Gasen gekühlt. Beide Verfahren weisen Temperaturen von - 90 °C bis - 30 °C auf. Das Gefrierlager wird von einem Kälteaggregat bei Temperaturen zwischen - 28 °C und - 18 °C gehalten. Anschließend werden 3 - 7 mm der gefrorenen Randschicht der Ananas entfernt, indem beispielsweise ein Korundschäler die Schale mechanisch abschmirgelt. Die restliche Frucht inklusive Strunk wird durch eine Reibe oder Obstmühle mechanisch zerkleinert. Die dabei entstehende Maische kann zur Steigerung der Trübungsstabilität in einem Homogenisator weiter zerkleinert werden. In einem Wärmetauscher wird die Maische auf eine Temperatur zwischen + 4 °C und + 15 °C erwärmt und anschließend durch einen Dekanter oder andere Press-Systeme entsaftet. Es entstehen Ananassaft und Trester. Durch die hohe Zerkleinerung der Maische ergeben sich kleinere Trubpartikel. Dies hat den Vorteil einer Saftausbeute von über 80 % sowie eine gute Trubstabilität. Die Verarbeitungstemperatur bei diesem Verfahren liegt deutlich niedriger als bei dem vorher erwähnten Verfahren, dessen Verarbeitungstemperatur der Umgebungstemperatur von ungefähr 30 °C oder mehr entspricht. Die geringe Verarbeitungstemperatur hat qualitative Vorteile in Bezug auf Geschmack und Produktbeanspruchung.

Der erzeugte Ananassaft wird direkt im Anschluss pasteurisiert. Er kann durch Eindampfen zu Ananassaftkonzentrat weiter verarbeitet werden oder als Direktsaft verkauft werden. Beide Endprodukte werden entweder in Fässern eingefroren oder aseptisch, also unter sterilen Bedingungen, verpackt und verschickt.

2.1.3 Herstellung von Ananassaft aus Überresten der Konservenproduktion

Ananassaft wird hauptsächlich als Nebenprodukt aus der Konservenproduktion gewonnen. Als Konservenprodukte sind in Europa Ananas als Scheiben oder Ananas in Stücken bekannt. Beides wird aus dem zylindrischen Mittelteil der Ananas hergestellt. Der zylindrische Mittelteil wird in Ginaca-Maschinen gewonnen. Die Ananas werden auf dem Feld von ihrer Blattkrone befreit und in die Produktionsstätte gebracht. Dort werden sie nach ihrer Größe sortiert. Die zu

kleinen Früchte werden der Vollfruchtverarbeitung zugeführt. Nach dem Waschen kommen die Früchte in die Ginaca-Maschine. In dieser wird zunächst der Zylinder ausgestanzt, wobei Schale mit anhaftendem Fruchtfleisch abfällt [13]. Anschließend werden oben ca. 1,9 cm und unten ca. 1,3 cm der Frucht abgeschnitten. Aus dem Zylinder wird danach der Strunk in der Mitte ausgestanzt [5]. Heraus kommt ein Ananas-Zylinder, der in weiteren Maschinen entweder zu Scheiben oder Stücken weiter verarbeitet wird.

An einigen Ginaca-Maschinen gibt es einen Eradikator, der als optionale Erweiterung angebaut werden kann. Dieser verarbeitet die anfallende Schale mit dem noch anhaftenden Fruchtfleisch, welches eine ungefähre Dicke von 2,5 cm hat, weiter. Hierbei wird das restliche Fruchtfleisch von der Schale getrennt. Die nach unten liegende Schale wird über eine Walze mit vereinzelt kleinen Spitzen (18) geführt. Eine Matrize drückt die Schale gegen die Walze, die die Schale dann an einem Messer (21) vorbeiführt. Dieses schneidet das Fruchtfleisch von der Schale ab. Das Messer kann durch eine Stellschraube (34) in der Höhe verstellt werden, was ausschlaggebend dafür ist, wie viel Schale noch am Fruchtfleisch oder umgekehrt anhaftet. Direkt hinter dem Messer (21) wird das abgeschnittene Fruchtfleisch durch weitere, kleinere Messer (nicht auf der Zeichnung zu sehen) in längliche Stücke geschnitten. Diese Stücke werden anschließend zu Saft weiter verarbeitet.

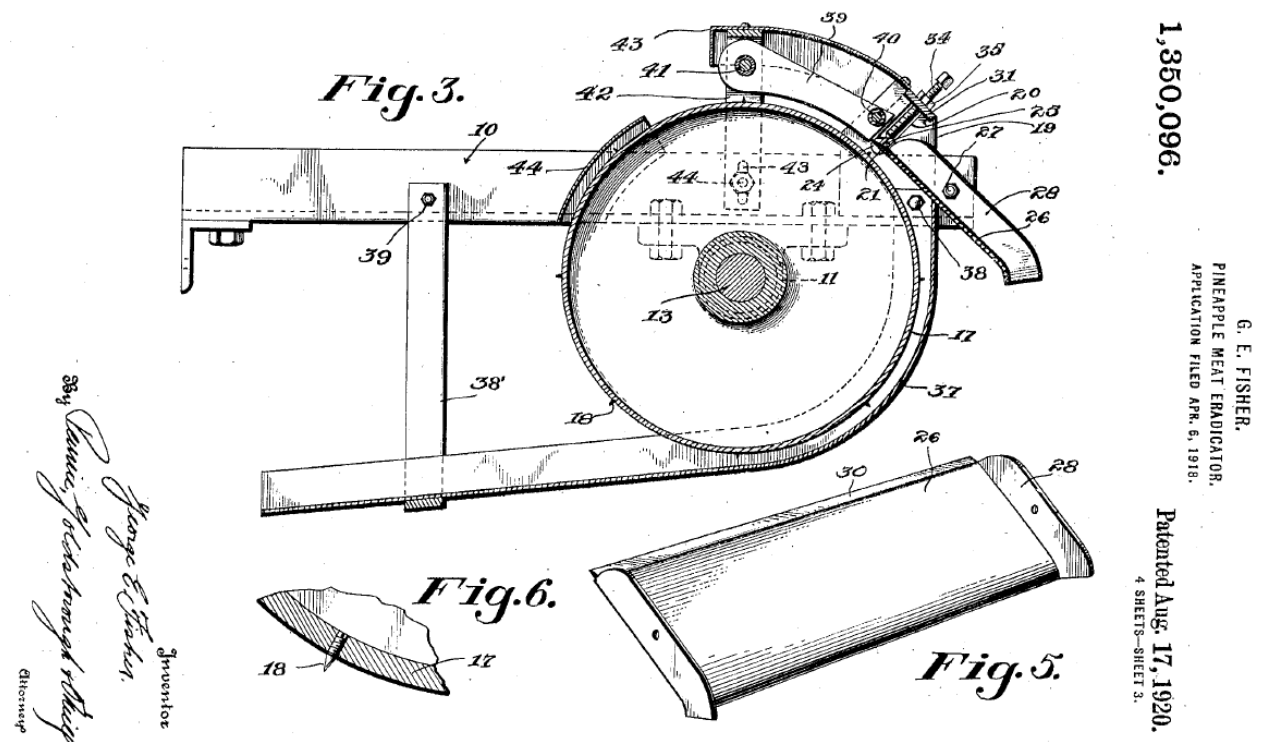


Abbildung 6: Technische Zeichnung eines Eradikators [14]

Die gesammelten Teile, die während der Produktion anfallen, durchlaufen eine Rätzmühle. In dieser werden der herausgestanzte Strunk sowie das im Eradikator abgetrennte Fruchtfleisch zerkleinert. Das zu Saft verarbeitete Rohmaterial wird in einem zylindrischen Mahlraum von einem mehrflügeligen Rotor gegen die Wand gepresst [5]. In der unteren Hälfte befinden sich entlang des Mantels axial eingelegte, gezähnte Messer. Durch sie wird das Fruchtfleisch zerkleinert und fällt durch kleine Schlitze aus der Rätzmühle. Da Ananas ein recht weiches Fruchtfleisch besitzt, wird es nur grob zerkleinert. Anschließend wird die Maische entweder mit Hilfe eines Dekanters oder einer Bucher-Horizontalpresse entsaftet.

Um die Saftausbeute zu erhöhen, kann die Maische vor dem Entsaften mit Enzymen bearbeitet werden. Diese Enzyme bestehen aus Pektinasen, Hemicellulasen und Cellulasen. Sie dienen dazu, das Zellgerüst im Fruchtfleisch aufzubrechen, um den Saft freizugeben. Alle gewonnenen Säfte werden in einem Tank, der gleichzeitig der Entlüftung dient, gesammelt. Die Entlüftung ist entscheidend, um Farb- und Aromaveränderungen zu vermeiden, die durch Oxidation mit dem Luftsauerstoff entstehen. In einigen Firmen wird daher der Entlüftungstank sowie die Produktionslinie mit Stickstoff überströmt. Der gesammelte Saft wird auf + 60°C bis + 63°C erwärmt und durchläuft einen Hochgeschwindigkeits-Separator, um noch vorhandene, größere Faserstoffe zu entfernen. Diese sind, wie bereits beschrieben, unerwünscht, da sie schneller sedimentieren als kleinere Faserstoffe. Kleinere Faserstoffe hingegen verleihen dem Saft sensorisch gesehen „Körper“. Nach dem Pasteurisieren und Runterkühlen wird der Saft unter aseptischen Bedingungen verpackt. Um die Transportkosten in Grenzen zu halten, wird Ananassaft meist für den Transport nach Übersee zu Ananassaftkonzentrat verarbeitet. Durch die Konzentrierung erfolgt auch eine chemische und mikrobiologische Stabilisierung durch Senkung der Wasseraktivität a_w auf 0,73 bis 0,94. Da die Aromen flüchtig sind, erfolgt die Konzentrierung in Verdampfern mit einer Aromarückgewinnungsanlage. Die Konzentrate werden getrennt vom Aromakonzentrat gelagert. Erst vor der Rückverdünnung im Verbraucherland wird das Aromakonzentrat dem Ananassaftkonzentrat zugegeben. Der Brix-Wert der Konzentrate liegt zwischen 60 und 72 °Brix [5]. Auch die Konzentrate werden aseptisch verpackt und verschickt.

2.2 Qualitätsparameter von Ananas

2.2.1 Parameter zum Nachweis der Authentizität

Die Inhaltsstoffe der Ananas sind wie bei allen pflanzlichen Produkten abhängig von den jeweiligen Wachstumsbedingungen der Frucht. Einige sind gleichmäßig in der kompletten Frucht vorhanden, andere wiederum sind in einigen Bereichen konzentriert. Mithilfe dieser Parameter und dem Wissen, welcher Stoff sich wo konzentriert, lassen sich mit der Analyse des Endproduktes Rückschlüsse auf die Herstellung ziehen. Für die Beurteilung von Fruchtsäften gibt es bestimmte Hilfen. Zum einen die RSK-Werte von 1987 und den darauf aufbauenden AIJN - Code of Practice, der alle zwei Jahre einer Überprüfung unterliegt. Beide enthalten für den jeweiligen Fruchtsaft Minimal-, Maximalwerte oder Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen. Zu einigen Kennzahlen gibt es Kommentare, die Aufschluss über abweichende Werte geben können. Beide Beurteilungshilfen sind nicht rechtsverbindlich, werden aber von der Fruchtsaftindustrie der EU anerkannt und umgesetzt.

Bei der Beurteilung von Ananassäften wird besonders auf die Mineralstoffe geachtet. Zur Analyse dient hier die Bestimmung des Aschegehaltes, was der Gesamtheit des nicht organischen Materials entspricht. Als Asche bezeichnet man das, was nach Verbrennung im Muffelofen noch überbleibt. Ist der Aschegehalt erhöht, so sollte auf andere Parameter geschaut werden. Bei Ananas macht der Kaliumgehalt ca. 35 - 50 % der Asche aus [15]. Liegt der Kaliumgehalt über dem Maximalwert der Schwankungsbreite, so ist dies ein Indiz für die Verarbeitung von Schale, da sich dieser Parameter dort konzentriert. Ein niedriger Kaliumwert kann jedoch ein Hinweis für die überproportionale Verwendung des Mittelstrunks zur Safterstellung sein. Calcium ist in der Frucht, ebenso wie Kalium, inhomogen verteilt. Die Calciumkonzentration in der Schale ist deutlich höher als im Fruchtfleisch oder im Mittelstrunk. Eine höhere Calciumkonzentration kann deshalb ebenfalls ein Hinweis auf Schalenanteil im Saft sein. Magnesium kann zur Beurteilung der Verarbeitungstechnologie nicht herangezogen werden, da es in der Frucht homogen verteilt ist. Hier können jedoch niedrige Werte auf eine zu starke Verdünnung des Konzentrates schließen lassen. Ein erhöhter Sulfatgehalt lässt auf eine unzulässige Behandlung mit Schwefeldioxid schließen. Nitrat ist in der Ananas ebenfalls sehr unterschiedlich verteilt. Die niedrigste Nitratkonzentration lässt sich im Fruchtfleisch finden. In der Randpartie der Frucht ist der Wert etwas höher. Im Mittelstruck gibt es jedoch sehr viel höhere Werte. Die Werte sind hier auch abhängig vom Bereich des Strunks (siehe Abbildung 7). Eine hohe Nitratkonzentration ist also ein eindeutiges Indiz für überproportionale Verwendung des Mittelstrunks. Auch eine niedrige Formolzahl kann ein Hinweis darauf sein.

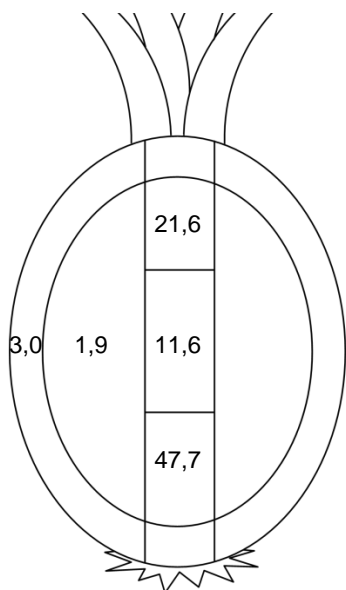


Abbildung 7: Nitratverteilung in der Frucht;
Werte in mg/l NO₃ [16]

Tabelle 1: Verteilung der Inhaltsstoffe in der Frucht [16]

	Saft aus		
	Fruchtfleisch	Schale mit Fruchtfleisch	Strunk
Relative Dichte (20°/20°)	1,0444	1,0333	1,0377
Glucose (g/l)	32,2	29,1	39,0
Fructose (g/l)	32,2	24,2	30,7
Glucose / Fructose	1,0	1,20	1,27
Saccharose (g/l)	31,3	10,7	14,0
Asche (g/l)	2,93	4,36	2,10
PO ₄ (mg/l)	110	243	143
Chlorid (mg/l)	194	485	223
NO ₃ (mg/l)	4,9	7,2	67,2
Kalium (mg/l)	1131	1684	768
Natrium (mg/l)	1	5	3
Magnesium (mg/l)	210	178	154
Calcium (mg/l)	171	227	63
Ges. Säure (7.0) WS (g/l)	8,0	6,4	4,5
Citronensäure (g/l)	7,5	5,9	3,4
L-Äpfelsäure (g/l)	2,02	1,92	1,69
Isocitronensäure (mg/l)	202	145	99
Formolzahl f. 100 ml	10,9	9,9	8,8
Ges. Carotin ber. als β-Carotin (mg/l)	0,18	2,06	n.b.

Ein hoher Chloridgehalt ist bei anderen Fruchtsäften meist ein Hinweis auf unzulässige Behandlung. Bei Ananas ist dies nicht der Fall, sie weist von Natur aus sehr hohe Konzentrationen auf. Fruchtsäfte, die aus Schalenbestandteilen hergestellt worden sind, weisen eine sehr hohe Chlorid-Konzentration auf. Der Natriumgehalt hingegen ist bei Ananas nicht besonders erhöht. Die Phosphatkonzentration steigt bei Schalenverwendung ebenfalls an, da es sich auch in der Schale konzentriert.

Nach Fruchtsaft- und Erfrischungsgetränkverordnung [2] und dem Pendant auf Europäischer Ebene darf kein Pektin zur Trubstabilisierung hinzugefügt werden. Dies lässt sich mit dem wasserlöslichen Pektin nachweisen. In Ananas konnte kein Hesperidin oder Naringin nachgewiesen werden. Diese beiden Stoffe gehören zu den Flavonoidglycosiden und kommen als Bitterstoffe in Citrusfrüchten vor. Können diese in Ananas nachgewiesen werden, ist das ein eindeutiger Hinweis auf den Verschnitt mit Citrusfrüchten. Auch mit dem Aminosäuren-Fingerprint kann sich ein Verschnitt nachweisen lassen. Hierbei wird auf einen erhöhten Wert der Aminosäure Prolin geachtet.

Säfte, bei denen Schale für die Herstellung verwendet wurde, sind also besonders reich an Kalium, Calcium, Phosphat und Chlorid. Wird für die Saffherstellung viel von den Mittelachsen verwendet, so ist dies am markant ansteigenden Nitratgehalt zu erkennen.

2.2.2 Chlorophyll zum Nachweis des Schalenanteils

2.2.2.1 Eigenschaften des Chlorophylls

Das Blattpigment Chlorophyll kommt in höheren Pflanzen und Grünalgen vor. In höheren Pflanzen, zu denen die Ananas zählt, kommen die Chlorophylle a und b vor. Dabei ist das Vorkommen an Chlorophyll a etwa dreimal so hoch wie das von Chlorophyll b. Diese Pigmente ermöglichen der Pflanze, Photosynthese zu betreiben. Man findet sie zusammen mit Carotinoiden in den Chloroplasten der Pflanze.

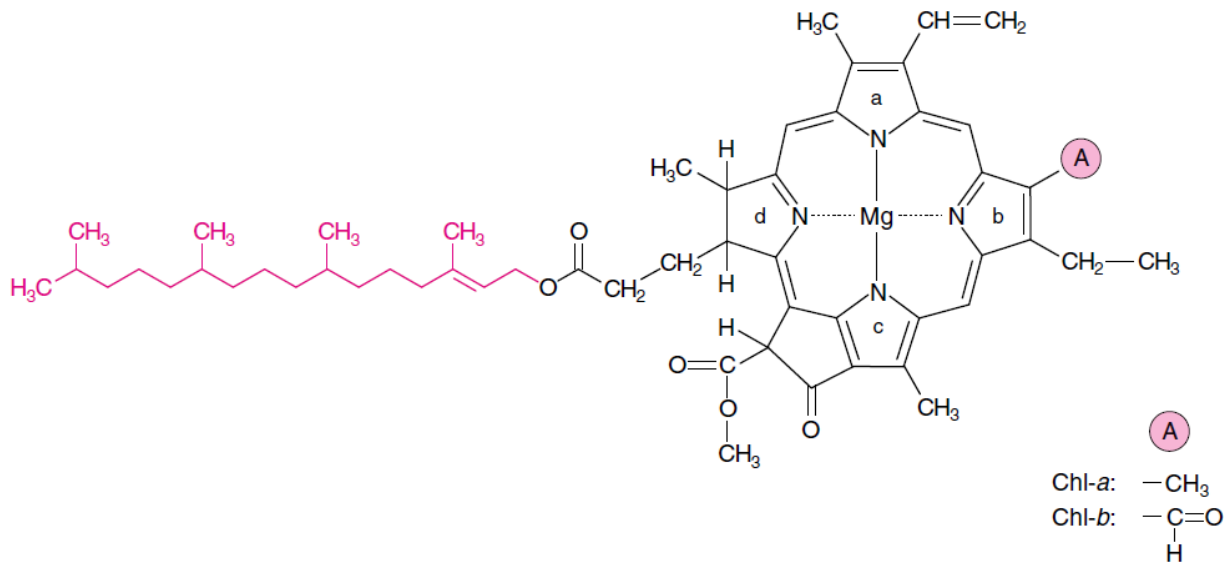


Abbildung 8: Strukturformel der Chlorophylle a und b mit den jeweiligen Substituenten am Ring b

Chlorophylle haben ein Tetrapyrrol-Ringsystem (Porphyrin) als Grundstruktur, in dessen Mitte sich ein Mg^{2+} -Ion als Zentralatom befindet. Dieses Zentralatom ist an zwei Stickstoffatome kovalent gebunden und geht mit zwei weiteren eine koordinative Bindung ein. Am Pyrrolring d des Porphyrins befindet sich ein Propionylrest, an den ein lipophiler Alkohol mit einer Esterbindung geknüpft ist. Dieser Alkohol ist bei Chlorophyll a und b Phytol (rosa gefärbt). Das Phytol ermöglicht mit seiner langen Kohlenwasserstoffkette eine hohe Lipidlöslichkeit. Chlorophyll a und b unterscheiden sich durch einen Substituenten am Ring b [17]. Chlorophyll a hat eine Methylgruppe ($-\text{CH}_3$) substituiert und Chlorophyll b eine Formylgruppe ($-\text{CHO}$). Das Chlorophyll ohne den Phytolrest wird als Chlorophyllid bezeichnet und ist gut wasserlöslich [18]. Entfernt man dem Chlorophyllid das Zentralatom ist es ein Phäophorbid. Durch milde Säuerung kann dem Chlorophyll das Zentralatom entfernt werden, es entsteht ein Phäophytin. Chlorophylle absorbieren Licht im Bereich von 400 bis 480 nm und 550 bis 700 nm. Chlorophylle absorbieren demnach blaues und gelbes bis rotes Licht. Die Chlorophylle erscheinen daher grün. Der Wellenlängenbereich dazwischen wird als Grünlücke bezeichnet, da die Absorption dort sehr gering ist. Chlorophyll b und Carotinoide können die Grünlücke von

Chlorophyll a teilweise schließen. Chlorophyll b kann die Lichtenergie an Chlorophyll a weiterleiten. Chlorophyll a ist Teil der Reaktionszentren, wohingegen Chlorophyll b mit den Carotinoiden Teil der Antennenpigmente, also der akzessorischen Photosynthesepigmenten, ist. Wird Chlorophyll mit UV-Licht bestrahlt, so fluoresziert es rot. Durch die Anregung des UV-Lichtes wird das Chlorophyll in den 2. Singulettzustand gehoben. Durch Wärmeabgabe wird es in den 1. Singulettzustand umgewandelt und beim Zurückkehren in den Normalzustand wird ein Rotlichtquant abgegeben, der fluoresziert. Farblose Kataboliten des Chlorophylls zeigen unter UV-Licht ebenfalls eine Fluoreszenz. Diese Fluoreszenz ist jedoch blau und wurde erstmals in beständiger Form bei reifen Bananen beobachtet [19].

Chlorophylle finden als Farbstoffe Anwendung in der Lebensmittelindustrie. Die fettlöslichen Chlorophylle und die wasserlöslichen Chlorophyllide werden unter der E-Nummer E140 als Chlorophylle zusammengefasst [20]. Da beide nicht besonders säure- und hitzestabil sind, wurde das zentrale Magnesiumatom durch ein Kupferatom ausgetauscht, welches die Stabilität steigert. Diese Stoffe werden als kupferhaltige Komplexe der Chlorophylle und Chlorophyllide unter der E-Nummer E141 zusammengefasst [21].

2.2.2.2 Methoden zur Chlorophyllbestimmung

Es gibt verschiedene Methoden, die Proben aufzuarbeiten, um mit der entsprechenden Messeinheit das Chlorophyll zu messen. Zwei Methoden, um Chlorophyll in Pflanzen zu messen sind in der Methodensammlung der AOAC aufgelistet. Beide Methoden basieren auf demselben Messprinzip und werden unterschiedlich aufgearbeitet. Die „AOAC Official Method 940.03 Chlorophyll in Plants“ ist eine Methode, die ausschließlich zur Messung des Gesamtchlorophylls dient. Die Messung erfolgt mittels photoelektrischem Kolorimeter mit einer Kombination zweier Lichtfilter, die ihre maximale Transmission nahe 660 nm besitzen. Um die Chlorophylle a und b zu bestimmen, gibt es die auf der vorher genannten Methode basierende „AOAC Official Method 942.04 Chlorophyll in Plants“. Sie erweitert die 940.03 um den Arbeitsschritt, das im Aceton gelöste Chlorophyll in Ether zu überführen und in einem Spektralphotometer zu messen. Mit den ermittelten Extinktionswerten lässt sich mit den aufgestellten Gleichungen das Gesamtchlorophyll, Chlorophyll a und Chlorophyll b im Lösungsmittel Ether berechnen. Die Gleichungen beruhen auf dem Lambert-Beerschen Gesetz [22]:

$$c = \frac{\lg \frac{I_0}{I}}{\varepsilon_\lambda \cdot d} = \left[\frac{E}{\varepsilon_\lambda \cdot d} \right] \quad (2.1)$$

c ... Konzentration g/l

I_0 ... Intensität des Lichtes vor dem Probendurchgang

I ... Intensität des Lichtes nach dem Probendurchgang

E ... Extinktion

ϵ_λ ... molarer dekadischer Absorptionskoeffizient bei der Wellenlänge λ

d ... Schichtdicke der Küvette

In den AOAC-Methoden wird das Chlorophyll zunächst mit Aceton ausgewaschen, in Ether überführt, gemessen und anschließend mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet.

Die photometrischen Berechnungen zur Chlorophyllkonzentrationen in anderen Lösungsmitteln wurden 1975 von Jeffrey und Humphrey beschrieben [23] (Angehängt im Anhang A Teil 1). Sie beschreiben die Absorptionsmaxima der verschiedenen Chlorophylle im Wellenlängenbereich von 600 nm bis 700 nm. In 90%igem Aceton hat Chlorophyll a sein Absorptionsmaxima bei einer Wellenlänge von 664 nm. Chlorophyll b absorbiert bei 647 nm maximal und Chlorophyll c_1 und c_2 um 630 nm. In höheren Pflanzen, wie Ananas, kommen nur Chlorophyll a und b vor. Für die Konzentrationsberechnung mit 90%igem Aceton als Lösungsmittel werden folgende Formeln beschrieben:

$$\text{Chlorophyll a} = 11,93 E_{664} - 1,93 E_{647} \quad (2.2)$$

$$\text{Chlorophyll b} = 20,36 E_{647} - 5,50 E_{664} \quad (2.3)$$

Die Form E_x steht hier für die Extinktion bei der Wellenlänge x . Das Ergebnis wird angegeben in $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Lösungsmittel. Bei Konzentrationen unter $0,2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ gibt es Ausreißer bei der Wiederholbarkeit, die mittlerweile als Wiederholgrenze bezeichnet wird. Die Ausreißerquote liegt bei bis zu über 60 % [23].

In einem Artikel im Journal of Agricultural and Food Chemistry [24] wird folgende Methode der Extraktion von Chlorophyll aus Zuckerrohrsaft beschrieben: Es werden 50 ml des Saftes mittels Büchner-Filter (Fiberglas, $0,45 \mu\text{m}$) unter Vakuum filtriert. Der Rückstand wird mit 15 ml gekühltem 99 %igem Aceton versetzt, geschüttelt und über Nacht an einen dunklen Ort gestellt. Nach 10 minütigem Zentrifugieren bei 4000 rpm (Beckman, Model J2-21 M/E) wird der Überstand in eine Quartzküvette überführt und die Extinktionen bei den Wellenlängen 664 nm, 647 nm und 630 nm gemessen. Kritisch zu betrachten ist hier, dass die Berechnung ebenfalls mit Formeln aus Jeffrey, et al., 1975 vorgenommen wurden, jedoch mit denen für gemischte Phytoplanktonpopulationen.

In der Amtlichen Sammlung, auf der Grundlage von § 64 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch, ist ein Untersuchungsverfahren über Chlorophyll a und b (Thermische Abbauprodukte) zu finden [25]. Diese Methode basiert auf einer Hochdruckflüssigkeits-Chromatografie (HPLC) und findet nur Anwendung in der Produktgruppe der pflanzlichen Fette und Öle. Die Trennung der Pigmente vom Hauptteil der Lipide wird durch eine Miniatur-Säulenchromatographie an einer Kieselgelsäule realisiert. Jedoch sind für dieses Verfahren Standards erforderlich, die für ein einfaches Verfahren zu teuer sind.

3 Material und Methoden

In der folgenden Abbildung wird der grobe Arbeitsablauf der entwickelten Methode schematisch dargestellt. Der hier dargestellte Ablauf hat sich in seinem schematischen Ablauf nicht geändert, wurde jedoch durch detailliertere Arbeitsschritte erweitert.

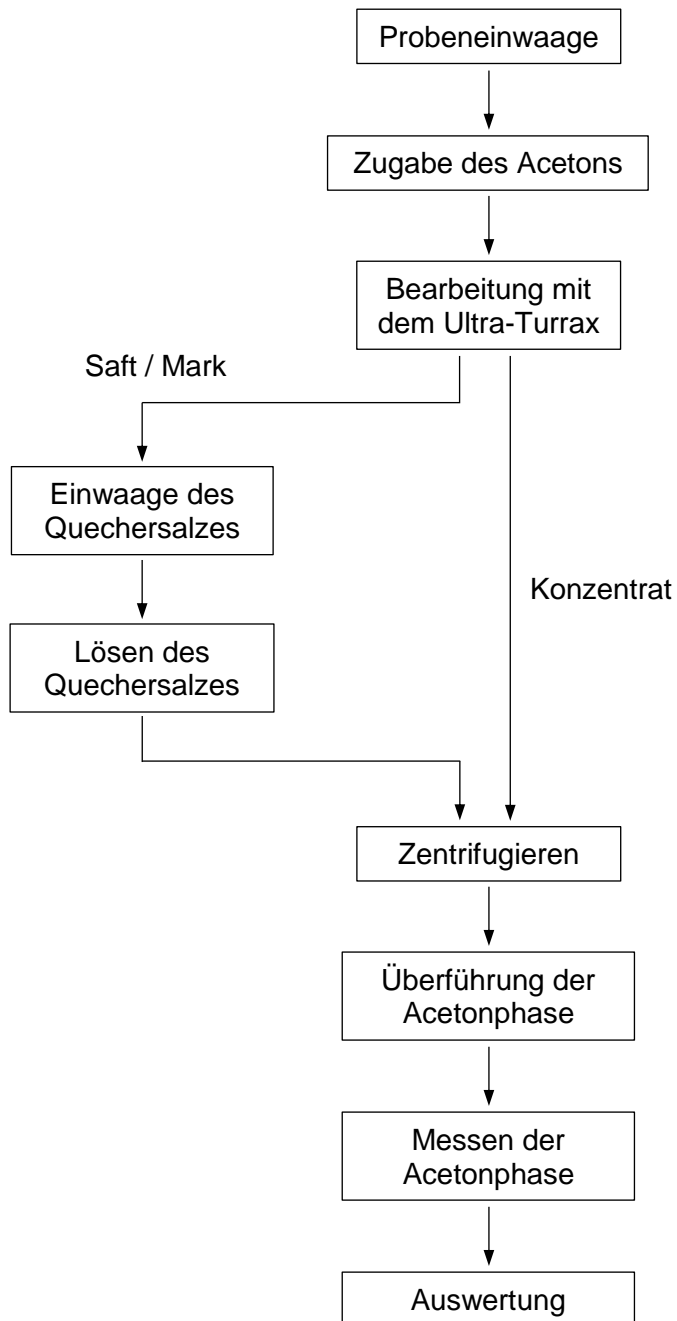


Abbildung 9: Schematischer Arbeitsablauf der Analysenmethode

Der erste Arbeitsablauf im Detail:

1. Probenvorbereitung

1.1. Herstellung Quechersalz

- 92 g feinpulveriges, wasserfreies Magnesiumsulfat, 23 g Natriumchlorid, 12 g Dinatriumhydrogencitrat-Sesquihydrat, 23 g Trinatriumcitrat-Dihydrat in ein Becherglas eingewogen und sorgfältig miteinander gemischt

1.2. Konzentrat als Matrix

- 5 g Probe in ein Greiner-Röhrchen (50 ml) einwiegen
- 5 ml Aceton (99 %) zur Probe hinzufügen
- Probe und Aceton mittels Ultra-Turrax T25 homogenisieren
- Probe zentrifugieren für 5 min bei 3850 *g*
- Phasentrennung deutlich ersichtlich: Acetonphase klar
- Acetonphase mittels Pasteurpipette vorsichtig in ein Greiner-Röhrchen (15 ml) abpipettieren

1.2 Saft / Mark als Matrix

- 25 g Probe in ein Greiner-Röhrchen (50 ml) einwiegen
- mit dem Ultra-Turrax T25 homogenisieren
- ca. 10 g Quechersalz hinzufügen
- Probe zentrifugieren für 5 min bei 3850 *g*
- Phasentrennung deutlich ersichtlich: Acetonphase klar
- Acetonphase mittels Pasteurpipette vorsichtig in ein Greiner-Röhrchen (15 ml) abpipettieren

2. Messung am Photometer

- Küvetten (OS; 10 mm) leer überprüfen, die Abweichungen dürfen nicht mehr als $E = \pm 0,002$ betragen
- mit Aceton (99 %) den Blindwert bestimmen
- Acetonphase der Probe messen, Extinktionen bei 600 nm – 700 nm, 2 nm Abstände

3. Auswertung

Jeffrey, S. W. and Humphrey, G. F. (1975), Biochem. Physiol. Pflanzen, Bd. 167, S. 191-194

Der Arbeitsablauf wurde angepasst, weshalb, wird im weiteren Verlauf der Arbeit näher erläutert.

Der angepasste Arbeitsablauf im Detail:

1. Probenvorbereitung

1.1. Herstellung Quechersalz

- 92 g feinpulveriges, wasserfreies Magnesiumsulfat, 23 g Natriumchlorid, 12 g Dinatriumhydrogencitrat-Sesquihydrat, 23 g Trinatriumcitrat-Dihydrat in ein Becherglas einwiegen und sorgfältig miteinander mischen

1.2. Konzentrat

- 2,5 g Probe in ein Greiner-Röhrchen 50 ml einwiegen
- 5 ml Aceton (99 %) zur Probe hinzufügen
- Probe und Aceton mittels Ultra-Turrax T25 für 60 s homogenisieren
 - Leerlaufdrehzahl: 9500 min⁻¹
 - auf gute Durchmischung achten
- Probe zentrifugieren
 - 5 min bei 3850 *g*
 - Phasentrennung deutlich ersichtlich: Acetonphase klar
- Acetonphase mittels Pasteurpipette vorsichtig in ein Greiner-Röhrchen 15 ml abpipettieren

1.2. Saft / Mark

- 12,5 g Probe in ein Greiner-Röhrchen 50 ml einwiegen
- 5 ml Aceton (99 %) zur Probe hinzufügen
- Probe und Aceton mittels Ultra-Turrax T25 für 60 s homogenisieren
 - Leerlaufdrehzahl: 9500 min⁻¹
 - auf gute Durchmischung achten
- ca. 5 g Quechersalze einwiegen
 - ca. 3 min schütteln bis sich der Großteil gelöst hat
- Probe zentrifugieren
 - 5 min bei 3850 *g*
 - Phasentrennung deutlich ersichtlich: Acetonphase klar
- Acetonphase mittels Pasteurpipette vorsichtig in ein Greiner-Röhrchen 15 ml abpipettieren

2. Messung am Photometer:

- Küvetten (OS ; 10 mm) leer überprüfen, die Abweichungen dürfen nicht mehr als $E = \pm 0,002$ betragen
 - wenn Abweichungen, dann reinigen
- mit Aceton den Blindwert bestimmen
- von der Acetonphase der Probe die Extinktionen mit dem Photometer messen (600 nm – 700 nm, 2 nm Abstände)

3. Auswertung

Jeffrey, S. W. and Humphrey, G. F. (1975), Biochem. Physiol. Pflanzen, Bd. 167, S. 191-194

Um die Ergebnisse der beiden Aufarbeitungen für Konzentrat und Saft/Markt vergleichen zu können, sind die Konzentrate zu Saft verdünnt worden. Dabei wurde ein Mischungsverhältnis von 1:5 angewandt.

Konzentrat auf Saft verdünnt (1:5; laut Konventionen)

- 2,5 g Probe in ein Greiner-Röhrchen 50 ml einwiegen
- mit 10,0 g bidest. H₂O verdünnen
- 5 ml Aceton zur Probe hinzufügen
- mit dem Ultra-Turrax für 60s homogenisieren
 - Leerlaufdrehzahl: 9500 min⁻¹
 - auf gute Durchmischung achten
- ca. 5 g Quechersalze einwiegen
 - ca. 3 min schütteln bis sich der Großteil gelöst hat
- Probe zentrifugieren
 - 5 min bei 3850 g
 - Phasentrennung deutlich ersichtlich: Acetonphase klar
- Acetonphase mittels Pasteurpipette vorsichtig in ein Greiner-Röhrchen 15 ml abpipettieren

Der Dünnschichtchromatographie-Versuch wurde nach folgendem Arbeitsablauf durchgeführt.

1. Probenvorbereitung

1.1 Extrahieren der Farbstoffe aus den Konzentraten

- 5 g Probe in ein Greiner-Röhrchen (50 ml) einwiegen
- 2,5 ml Aceton (99 %) zur Probe hinzufügen
- Probe und Aceton mittels Ultra Turrax T25 homogenisieren
- Probe zentrifugieren für 5 min bei 3850 *g*
- Phasentrennung ersichtlich: Acetonphase klar
- Acetonphase mittels Pasteurpipette vorsichtig in ein Greiner-Röhrchen (15 ml) abpipettieren
- In Vial überführen

1.2 Extrahieren der Farbstoffe aus Gras

- Grashalm möglichst klein mit einer Schere zerschneiden und in ein Greiner-Röhrchen (50 ml) geben
- 5 ml Aceton (99 %) zur Probe hinzufügen
- ca. 1,5 h im Kühlschrank ruhen lassen
- mit einem Glasstab am Boden die Stückchen zerdrücken bis sie sich entfärbt haben
- Abfiltrieren mit einem Faltenfilter in ein Becherglas
- Überführen in ein kleines Gefäß

2. Trennen der Farbstoffe mittels Dünnschichtchromatographie (DC)

2.1 Dünnschichtchromatografie

2.1.1 Herstellen des Laufmittels (Cyclohexan / Aceton) (unter dem Abzug)

- 35 ml Cyclohexan und 15 ml Aceton in ein Erlenmeyerkolben füllen und verschließen

2.1.2 Vorbereiten der DC-Kammer (unter dem Abzug)

- Einfüllen des Laufmittels bis ca. 0,5 cm Höhe
- Sofort verschließen
- 30 min Gasraum sättigen lassen

2.1.3 Vorbereiten der DC-Platte (Kieselgur)

- Vorsichtiges Einzeichnen der Startlinie mit einem Bleistift (1,5 cm vom unteren Rand) sowie der einzelnen Spots

- Auftragen der Spots 2 - 3 Kapillaren (2 µl pro Kapillare)
 - Möglichst kleine Spots, schrittweises Entleeren
 - Lösemittel zwischen dem Auftragen verdampfen lassen
- Anschließend evtl. nochmals mit dem Fön trocknen
- Einstellen der DC-Platte in die DC-Kammer und sofort wieder verschließen (Spots müssen oberhalb der Laufmitteloberfläche liegen, da sonst die Gefahr von Auswaschung besteht)
- Entwicklungszeit ca. 25 - 30 min
- Entnahme der DC-Platte, wenn das Laufmittel ca. 1 cm vom oberen Rand entfernt ist
- Markieren der Lauflänge der einzelnen Phasen mit einem Bleistift
- Identifizieren der Substanzen

Die Probenvorbereitung für den Versuch zum Chlorophyllabbau wurde wie unter dem Punkt 1.2 des Dünnschichtchromatographie-Versuchs realisiert.

Folgende Geräte und Chemikalien sind verwendet worden:

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerätebeschreibung	Modell	Herstellerfirma
Dispergiergerät	Ultra-Turrax T25 (analog)	IKA
Photometer	CADAS 200	Dr. Lange
Zentrifuge	Labofuge 400 R	Heraeus

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Zusatzinformation	CAS-Nummer	Hersteller
Aceton	mind. 99 %	67-64-1	Cemsolute
Cyclohexan	ACS (mind. 99,5 %)	110-82-7	Cemsolute
Dinatriumhydrogencitrat-Sesquihydrat	ReagentPlus; 99 %	6132-05-4	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat	puriss. p.a., dryagent, anhydrous, ≥ 98.0 % (KT), powder (very fine)	7487-88-9	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Free-flowing, anhydrous, ACS reagent, ≥ 99 %	7647-14-5	Sigma-Aldrich
Trinatriumcitrat-Dihydrat	ACS reagent, ≥ 99.0 %	6132-04-3	Sigma-Aldrich

4 Experimenteller Teil

4.1 Überlegungen zur Probenaufbereitung

Die Methode beruht auf der Veröffentlichung von S. W. Jeffrey und G. F. Humphrey über „New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c₁, and c₂ in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton“ von 1975. In dieser Abhandlung wird die Auswertung der photometrischen Messung beschrieben. Bei der Berechnung der Konzentrationen wird für höhere Pflanzen 90 %iges Aceton als Extraktionsmittel verwendet. Die unterschiedliche Matrix der Produktgruppen erfordert unterschiedliche Aufarbeitungen. Die einfachste Aufarbeitung erfolgt mit Ananassaftkonzentrat, da durch die Konzentrierung das störende Wasser weitgehend entfernt wurde. Bei Ananassäften und -marks ist es noch enthalten. Wasser ist mit Aceton unendlich mischbar und verursacht einen milchigen Schleier in der Acetonphase. Daher muss es gebunden werden, damit es die photometrische Messung nicht behindert. Die Wahl des geeigneten Trockenmittels wird später genauer erläutert. Um eine gute Durchmischung des Produkts mit dem Extraktionsmittel zu erzielen, wird die Probe mit einem Ultra-Turrax bearbeitet. Den Säften und Marks wird anschließend das Trockenmittel hinzugefügt und durch Schütteln gelöst. Anschließend wird die Probe bei 3850 g zentrifugiert, um eine saubere Phasentrennung zu erzielen. Die obere Phase wird dann vorsichtig mit einer Pasteurpipette in ein anderes Gefäß überführt. Anschließend werden im Photometer die Extinktionen bei 630 nm, 647 nm, 664 nm und 700 nm gemessen. Im Rahmen der Versuche wurde immer das Spektrum zwischen 600 nm und 700 nm aufgenommen. Dieses Spektrum zeigt ein Untergrundrauschen, das durch eine Basislinienkorrektur (BLK) herausgerechnet wird.

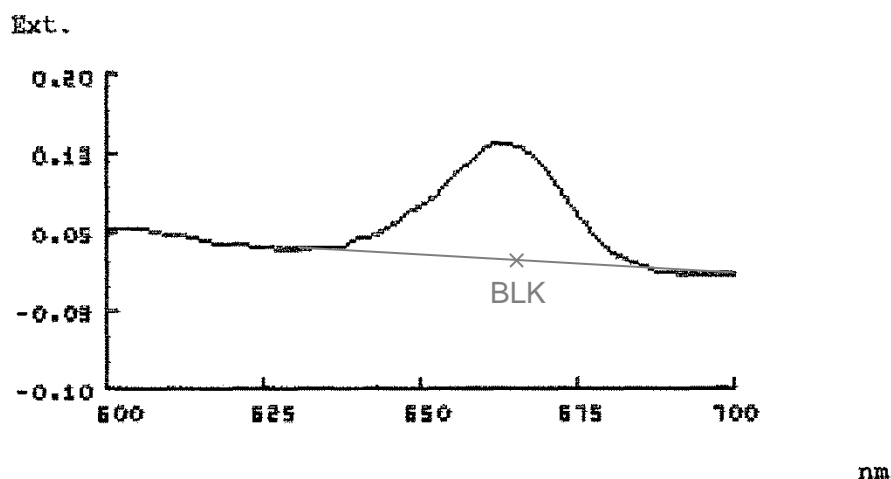


Abbildung 10: Erklärung der Basislinienkorrektur

Die Gleichungen 2.2 und 2.3 ändern sich mit Gleichung 3.1 zu folgenden Gleichungen:

$$BLK = \frac{E_{630} + E_{700}}{2} \quad (4.1)$$

$$\text{Chlorophyll } a = 11,93 (E_{664} - \text{BLK}) - 1,93 (E_{647} - \text{BLK}) \quad (4.2)$$

$$\text{Chlorophyll } b = 20,36 (E_{647} - \text{BLK}) - 5,50 (E_{664} - \text{BLK}) \quad (4.3)$$

Da in höheren Pflanzen nur Chlorophyll a und b vorkommen, ist das Gesamtchlorophyll die Summe aus Chlorophyll a und Chlorophyll b.

$$\text{Gesamtchlorophyll} = \text{Chlorophyll } a + \text{Chlorophyll } b \quad (4.4)$$

Das erhaltene Ergebnis wird von $\mu\text{g/ml}$ noch in mg/kg umgerechnet.

Im ersten Versuchsansatz ist mit einer Einwaage von 5 g für Konzentrate, 25 g für Säfte / Marks und einem Extraktionsvolumen von 5 ml Aceton begonnen worden. Vor dem Zentrifugieren der Säfte / Marks wurden 10 g des Trockenmittels gelöst. Jedoch zeigten die als Saft aufgearbeiteten Konzentrate abweichende Werte zu denen, die als Konzentrat aufgearbeitet wurden. Demzufolge sind die Aufarbeitungen nicht geeignet.

Im zweiten Versuchsansatz wurde nun die Einwaage um die Hälfte reduziert. Die Einwaagen für Konzentrate betragen 2,5 g und für Säfte / Marks 12,5 g. Auch das Trockenmittel wurde auf 5 g reduziert. Das Extraktionsvolumen von 5 ml blieb bestehen, da sonst nicht genügend Extrakt für die photometrische Messung vorhanden ist. Bei diesen Einwaagen sind die Werte im selben Konzentrationsbereich angesiedelt.

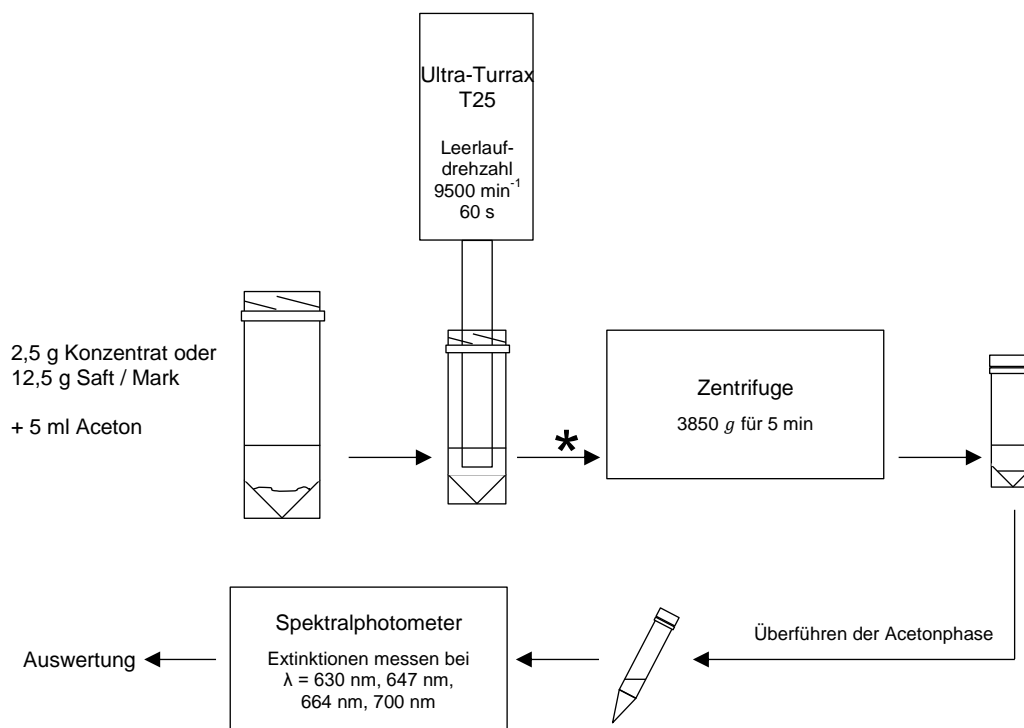


Abbildung 11: Fließdiagramm der Analysenmethode

Die Proben werden, wie im Fließbild gezeigt, aufgearbeitet. An der Stelle des Sternchens muss das Wasser in den Säften / Marks gebunden werden, dafür werden bei 3 min Schütteln 5 g Trockenmittel gelöst.

4.2 Durchgeführte Versuche

4.2.1 Auswahl eines geeigneten Trockenmittels

Bei den verschiedenen Produktformen gibt es unterschiedliche Wassergehalte. Das Wasser in den Proben stört die photometrische Messung, da das Aceton milchig wird. Um dies zu verhindern und die Messungen nicht zu verfälschen, muss ein Trockenmittel eingesetzt werden, welches das Wasser bindet. Es muss auch eine ausreichende Phasentrennung erreicht werden, damit die Acetonphase abgetrennt werden kann. Es wurden vier Trockenmittel getestet. Bei allen Trockenmitteln wurde ein Ananassaft mit 5 ml Aceton versetzt und so viel Trockenmittel hinzugegeben bis es nicht mehr in Lösung gegangen ist.

Folgende Trockenmittel wurden getestet:

- 1) Natriumchlorid
- 2) Saccharose
- 3) Natriumsulfit
- 4) Quechersalz (ASU Nr. 00.00 115)

Alle Proben wurden bei 3850 *g* zentrifugiert und anschließend angeschaut.

Bei Natriumchlorid und Saccharose war keine Phasentrennung zu erkennen, weshalb beide ungeeignet sind. Das oft als Trockenmittel eingesetzte Natriumsulfit zeigte eine leichte Phasentrennung, die jedoch nicht ausreichend gewesen ist. Bei der Pestizidanalyse wird ein Salzgemisch aus wasserfreiem Magnesiumsulfat, Natriumchlorid, Dinatriumhydrogencitrat-Sesquihydrat und Trinatriumcitrat-Dihydrat zur Phasentrennung eingesetzt, welches als Quechersalz bezeichnet wird. Dies zeigte auch bei dieser Anwendung eine sehr gute Phasentrennung, bei der das Aceton gut überführt werden kann.

4.2.2 Identifikation des Chlorophylls

Im Rahmen der ersten Versuche ist eine Probe (4645/1) gemessen worden, die nach den üblichen Parametern authentisch sein soll. Es war anzunehmen, dass die Probe keinerlei Chlorophyll enthält. Nach der ersten Messung wies die Probe eine Gesamtchlorophyll-Konzentration von 1,59 mg/kg Produkt auf. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob eventuell andere Stoffe gemessen werden. Um abzuklären, welche farbigen Stoffe im Aceton-Extrakt enthalten sind, wurden sie mittels Dünnschichtchromatographie getrennt und sichtbar gemacht. Für den Versuch wurden folgende sechs Proben ausgewählt:

- 1) Spirulina
- 2) Ananas-Stücken aus der Dose
- 3) β -Carotin Standard
- 4) Gras (Chlorophyll-Standard)
- 5) 4645/1
- 6) 2504/1

Von den Proben 2) bis 6) wurde jeweils der Aceton-Extrakt auf die Kieselgur-Platte aufgetragen. Die Probe 1) ist ein natürlicher Farbstoff für Lebensmittel. Es handelt sich hierbei um Algen, die ursprünglich als Chlorophyllstandard gedacht waren. Aufgrund der sehr schlechten Löslichkeit in Aceton wurde dies jedoch verworfen. Auf die DC-Platte wurde das Spirulina in Methanol gelöst aufgebracht. Probe 2) ist die Negativ-Probe, da keine Schale in Ananasstücken enthalten ist. Proben 3) und 4) sind die jeweiligen Standards für β -Carotin und Chlorophylle. Probe 5) ist die widersprüchliche Probe und Probe 6) eine Probe, die nach photometrischer Messung Chlorophyll enthält. Die genauen photometrischen Werte von Probe 5) und 6) sind nicht repräsentativ, da die Werte mit einer nicht ausgereiften Methode erzeugt worden sind.

Es wurden kleine Spots der Extrakte auf eine Kieselgur-Platte aufgetragen und in die Entwicklungskammer gestellt. Als Laufmittel wurde eine Mischung aus 70 % Cyclohexan und 30 % Aceton gewählt. Der genaue Arbeitsablauf kann im Gliederungspunkt 3 Material und Methoden nachgelesen werden.

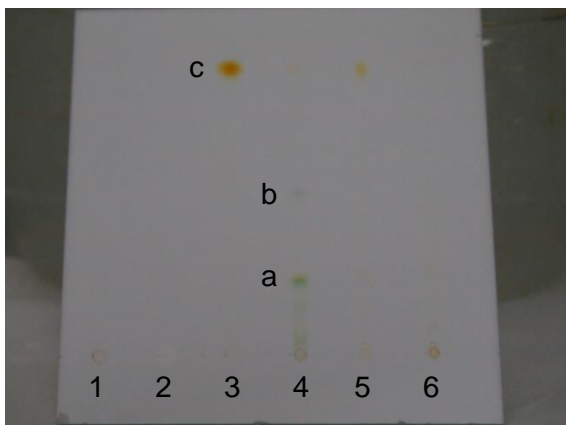


Abbildung 12: DC-Platte nach der Entwicklung

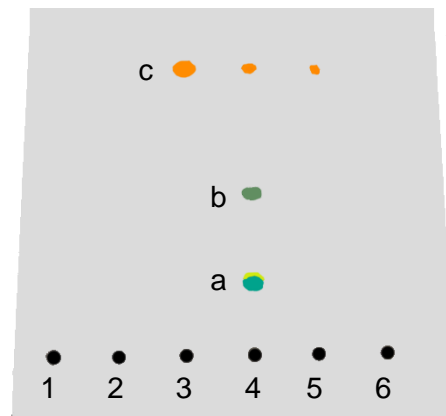


Abbildung 13: Schema DC-Platte nach der Entwicklung

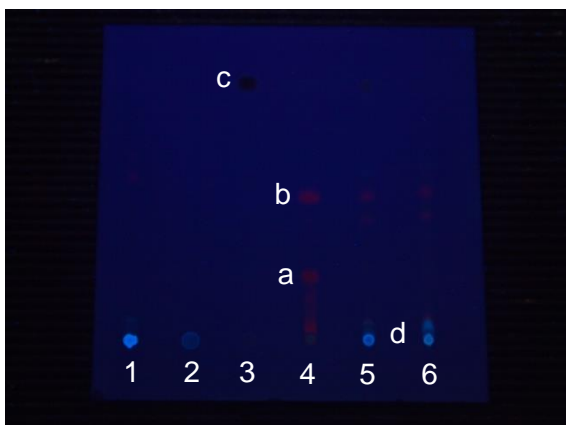


Abbildung 14: DC-Platte unter UV-Licht

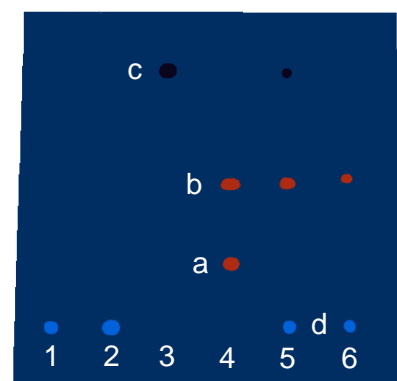


Abbildung 15: Schema DC-Platte unter UV-Licht

In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass Probe 2) keine sichtbaren Farbstoffe enthält. Der orangene β -Carotin Standard (Probe 3) zeigt den größeren Rf-Wert (c). In Probe 4) und 5) ist

demzufolge β -Carotin enthalten, da sie bei derselben Lauflänge eine Färbung zeigen. Bei Probe 3), dem Chlorophyll-Standard, sieht man die grau-grünlichen Phäophytine (b). Das blaugrüne Chlorophyll a und das gelbgrüne Chlorophyll b überlappen sich in ihren Lauflängen, wobei das Chlorophyll b einen etwas größeren Rf-Wert zeigt. Unsauberes Auftragen der Spots ist der Grund für die Schleier dahinter. Um das Chlorophyll in Proben 5) und 6) sichtbar zu machen, wurde es mit UV-Licht bestrahlt. Chlorophyll wird bei UV-Licht angeregt und leuchtet rot [26]. In Abbildung 14 ist die DC-Platte unter UV-Licht zu sehen. Das Phäophytin und die Chlorophylle a und b leuchten bei Probe 4) rot. Da bei demselben Rf-Wert von Phäophytin bei Probe 5) ein rotes Leuchten zu erkennen ist, kann man Phäophytin in der Probe identifizieren. Jedoch ist keine Färbung bei den Lauflängen der beiden Chlorophylle zu erkennen. Sie sind aber bei der photometrischen Messung positiv. Phäophytin absorbiert laut Literatur [27] bei derselben Wellenlänge wie Chlorophyll. Daraus ist zu schließen, dass das Abbauprodukt Phäophytin ebenfalls photometrisch erfasst wird. Diese Schlussfolgerung gilt ebenso für Probe 6). Das bläuliche Leuchten, welches unter UV-Licht zu erkennen ist, wurde auch bei reifen Bananen beobachtet [19]. Dieses Leuchten geht von fluoreszierenden Chlorophyll-Kataboliten aus. Sie sind weiter abgebaut als das Phäophytin und die Chlorophyllide.

Bei der photometrischen Messung werden auch Phäophytine gemessen.

4.2.3 Stabilitätsverhalten des Chlorophylls

Laut Literatur [28] sind Chlorophylle weder licht-, hitze-, alkali- oder säurestabil.

Es wurde ein qualitativer Abbauersuch durchgeführt. Als Probenmaterial ist ein Acetonextrakt aus Gras verwendet worden. Dafür wurden Grashalme in kleine Stücke geschnitten, in ein 50 ml Greiner-Röhrchen gefüllt und mit 12 ml Aceton (99 %) versetzt. Anschließend wurde das Gras mit einem Glasstab am Boden zerdrückt bis es seine Farbe verlor. Die Stücke wurden abfiltriert und das Filtrat in ein 15 ml Greiner-Röhrchen gefüllt. Da die Extinktion dieses Extraktes über 1,0 lag, wurde eine 1:5 Verdünnung angefertigt. Mit der Verdünnung wurden alle Messungen durchgeführt. Die Probe stand an 5 Tagen (100 h) auf dem Fensterbrett und ist mehrmals am Tag photometrisch gemessen worden. Allerdings aufgrund der Belegung des Messgerätes in teilweise unterschiedlichen Abständen.

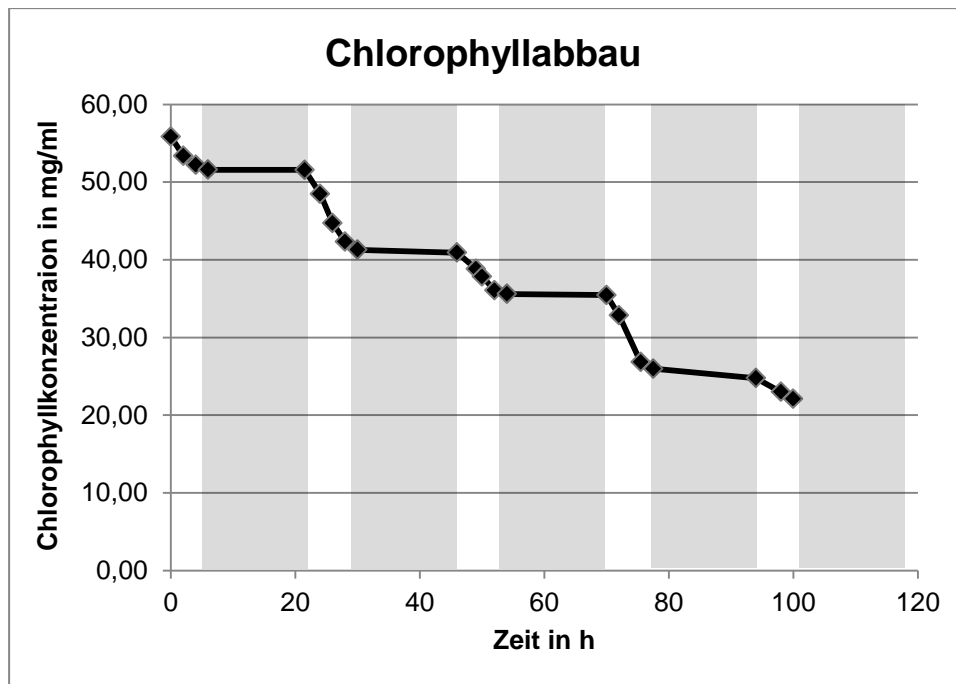


Abbildung 16: Chlorophyllabbau in Aceton bei Tag und Nacht (grau hinterlegt: Nacht)

Die Messungen zeigen einen Abbau des Chlorophylls. Dieser Abbau fand jedoch nur statt, wenn es draußen hell war. Bei Dunkelheit wurde kaum Chlorophyll abgebaut. Die Kinetik des Abbaus ist daher von der Lichtintensität abhängig, da an helleren Tagen (Tag 2 und 3) das Chlorophyll schneller abgebaut wurde. Nach ca. 74 h ist das Chlorophyll zu 50 % abgebaut gewesen. Der Versuch zeigt den Abbau nur qualitativ auf. Um den Versuch quantitativ durchzuführen, fehlten die notwendigen Mittel. Die Hitze-, Alkali- und Säureinstabilität wurde nicht getestet. Des Weiteren ist zu bemerken, dass die Stabilität im Aceton-Extrakt getestet wurde und nicht in der normalen Probenmatrix. Die Proben an sich haben aufgrund von enthaltenen Partikeln eine andere Lichtdurchlässigkeit als der Aceton-Extrakt. Dennoch sollte grundsätzlich beim Probenumgang auf möglichst wenig Lichtkontakt geachtet werden und zügiges Arbeiten wird daher empfohlen. Die Lichtinstabilität könnte ansonsten eine mögliche Ursache für falsch negative Ergebnisse sein.

4.2.4 Standardaddition zur Überprüfung der Messergebnisse

Standardaddition wird verwendet, um Konzentrationen zu messen, die unterhalb der Bestimmungsgrenze liegen. Hier wurde das Verfahren dazu verwendet, um die Ergebnisse zu überprüfen. Dafür wurde ein Ananassaftkonzentrat (3585/5) mit einem Chlorophyllextrakt, das mittels Aceton aus Gras extrahiert wurde, dotiert. Die Konzentration des Chlorophyllextraktes wurde zuvor gemessen und hatte eine Konzentration von 0,66 mg/100 µl Extrakt. Es wurden viermal 2,5 g Konzentrat abgewogen und mit 100 µl, 200 µl, 300 µl, und 400 µl des Chlorophyllextraktes dotiert. Die Proben wurden auf ein Gesamtacetonvolumen von 5 ml aufgefüllt, mit dem Ultra-Turrax bearbeitet, zentrifugiert und gemessen. Der gleiche Versuch ist

mit demselben Konzentrat auf Saftstärke verdünnt durchgeführt worden. Dafür wurden den jeweils 2,5 g Konzentrat, 10 g bidest. H₂O und nach der Bearbeitung mit dem Ultra-Turrax 5 g Quechersalz hinzugefügt, um das Wasser zu binden. Dies wurde durchgeführt, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

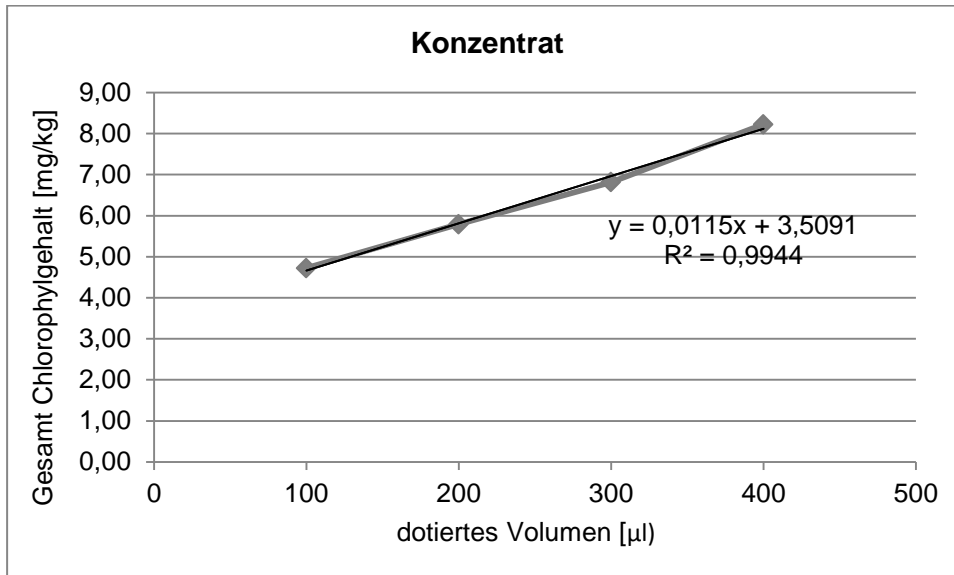


Abbildung 17: Graphische Auswertung des Konzentrates

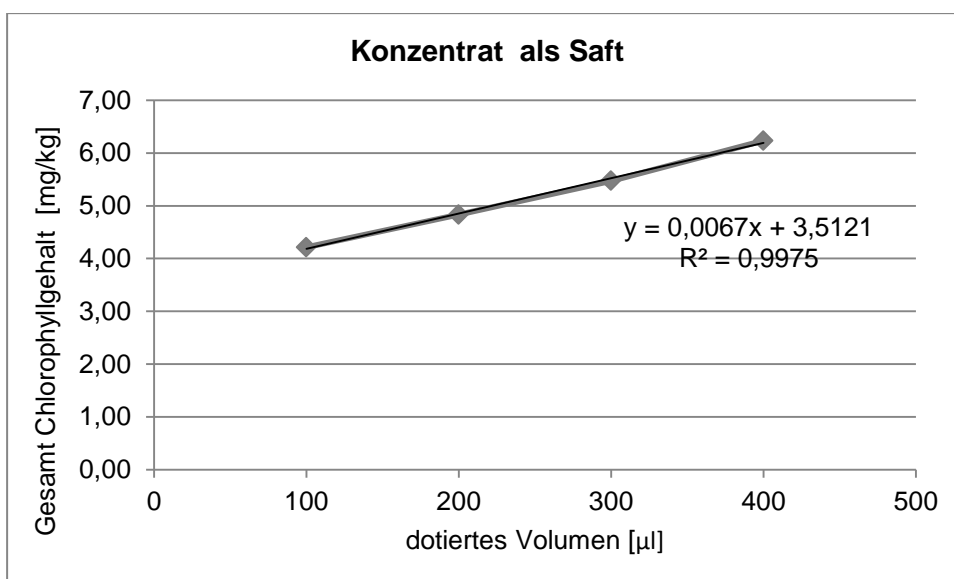


Abbildung 18: Graphische Auswertung des Konzentrates als Saft aufgearbeitet

Die graphische Auswertung zeigt die oben zusehenden Geraden, durch die eine Regressionsgerade mit der entsprechenden Gleichung gelegt ist. Um den Schnittpunkt mit der y-Achse zu erhalten, und damit auch die Konzentration ohne dotiertes Chlorophyll, wird $x = 0$ gesetzt. Dies ergibt einen Gesamtchlorophyllgehalt beim Konzentrat von 3,51 mg/kg und bei dem auf Saftstärke verdünnten Konzentrat ebenfalls von 3,51 mg/kg. Dies stimmt mit den zuvor gemessenen Werten überein. Jedoch ist zu beachten, dass das Chlorophyll bereits mit Aceton

extrahiert hinzugefügt wurde. Somit kann keine Aussage über den Extraktionserfolg der Methode getroffen werden.

4.2.5 Chlorophyllkonzentrationen der verschiedenen Fruchtpartien

Der Nachweis von Schale im Produkt beruht auf der Annahme, dass Chlorophyll nur dort vorkommt. Um diese Annahme zu testen, wurde eine Ananas (Simba; Costa Rica) in verschiedene Parteien zerlegt. Aus der Mitte einer reifen Ananas wurden drei gleich breite Scheiben herausgeschnitten. Diese Scheiben wurden geviertelt und der Strunk entfernt. Aus jeder Scheibe wurden alle 7 Parteien herausgearbeitet. Mit einem scharfen Messer erfolgte vorsichtig die Entfernung der Schale. Die Parteien sind anschließend zu Mark zerkleinert und entsprechend aufgearbeitet worden. Dafür wurden 12,5 g abgewogen und mit 5 ml Aceton versetzt. Anschließend wurde das Gemisch mit dem Ultra-Turrax bearbeitet. Um das Wasser zu binden und eine gute Phasentrennung nach dem Zentrifugieren zu erzielen, wurden 7 g Quechersalzgemisch hinzugefügt und gelöst. Nach dem Zentrifugieren wurde die Acetonphase vorsichtig mit einer Pasteurpipette in ein kleineres Gefäß überführt und anschließend photometrisch gemessen.

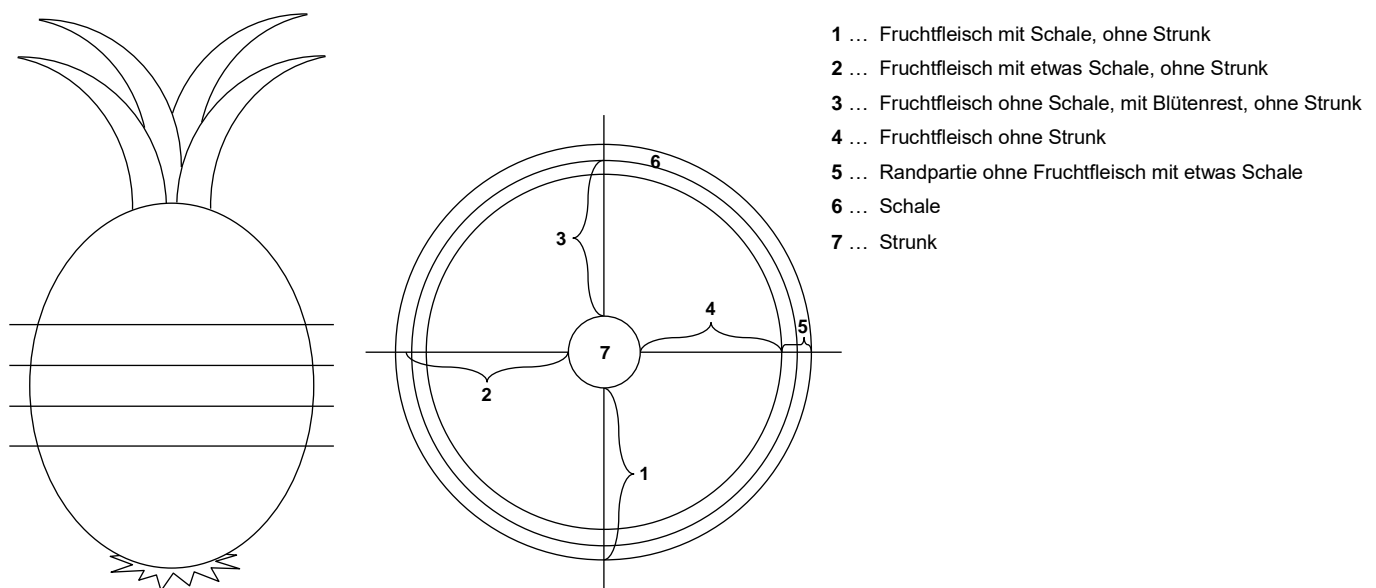


Abbildung 19: Zerlegungsschema der Ananas

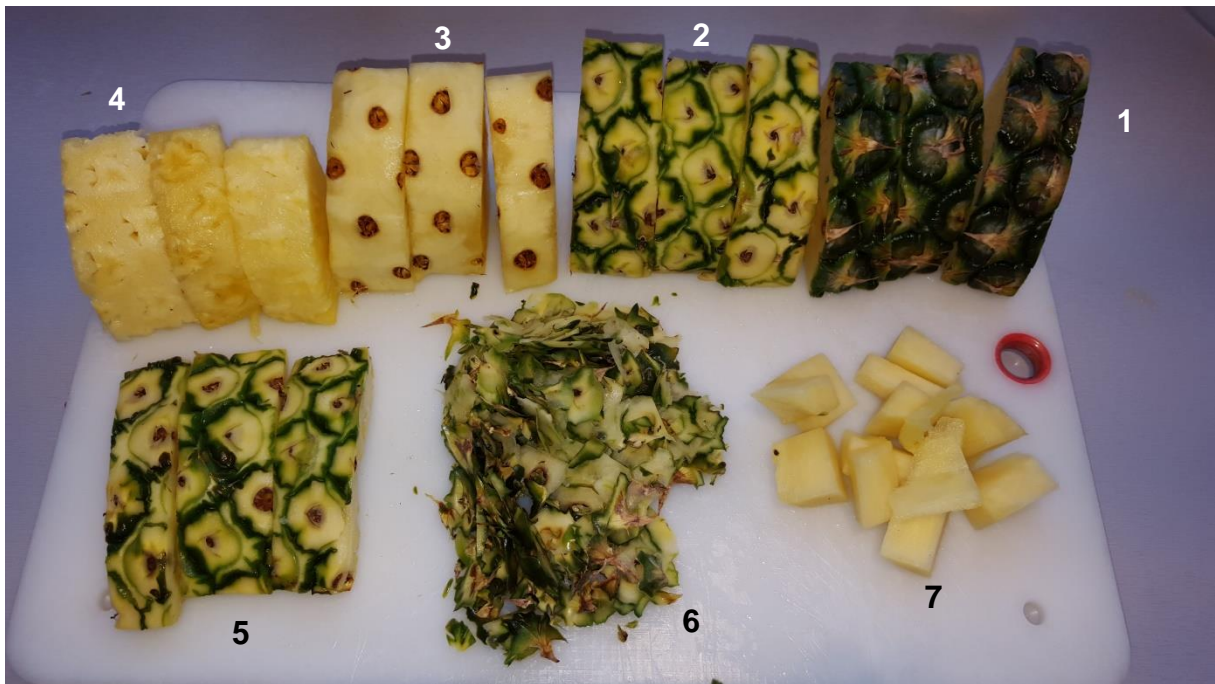


Abbildung 20: Ananas in verschiedene Fruchtportionen zerlegt

Tabelle 4: Erklärung der Fruchtportionen

Fruchtportion	Erklärung
1	Fruchtfleisch mit Schale, ohne Strunk
2	Fruchtfleisch mit noch etwas Schale, ohne Strunk
3	Fruchtfleisch ohne Schale, aber mit Blütenrest, ohne Strunk
4	Fruchtfleisch ohne Strunk
5	Randportion ohne Fruchtfleisch mit etwas Schale
6	Schale
7	Strunk

Tabelle 5: Photometrische Ergebnisse der Fruchtportionen aus Ananas 1

Probe	mg/kg Produkt		
	Chl a	Chl b	Chl ges
Fruchtportion 1	2,45	1,28	3,72
Fruchtportion 2	0,87	0,45	1,33
Fruchtportion 3	n.n.	n.n.	n.n.
Fruchtportion 4	n.n.	n.n.	n.n.
Fruchtportion 5	1,14	0,84	1,98
Fruchtportion 6	2,56	63,29	18,45
Fruchtportion 7	n.n.	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass in den Fruchtportionen 1, 2, 5 und 6 mit anhaftender Schale Chlorophyll enthalten ist. Jedoch ist zu bedenken, dass die Messwerte Einzelwerte sind und es keine Sicherung der Ergebnisse gibt.

Aus diesem Grund sind Wiederholungsmessungen mit zwei neuen Ananas vorgenommen worden. Sie wurden wie die erste Ananas zerlegt und aufgearbeitet. Ananas 2 ist eine Ananas der Sorte Super Sweet aus Costa Rica von Natura Farms und Ananas 3 ebenfalls eine Ananas der Sorte Super Sweet aus Costa Rica jedoch von Fyffes Gold. Bilder der Ananas sind im Anhang A Teil 2 zu finden.

Tabelle 6: Photometrische Ergebnisse der Fruchtportionen aus Ananas 2 und 3

	Ananas 2	Ananas 3
	Gesamtchlorophyll in mg/kg Produkt	
Fruchtportion 1	0,32	0,51
	0,25	0,50
Fruchtportion 2	0,15	0,16
	0,15	0,13
Fruchtportion 3	n.n.	n.n.
	n.n.	n.n.
Fruchtportion 4	n.n.	n.n.
	n.n.	n.n.

Die Fruchtportionen 5 bis 7 wurden aufgrund ihrer geringeren Aussagekraft weggelassen. In Fruchtportion 7 ist kein Chlorophyll nachweisbar, wenn in Fruchtportion 4 auch keines nachgewiesen werden kann, da Chlorophyll das Photosynthesepigment ist und an Fruchtportion 7 kein Licht zur Photosynthese herankommt. Der Nachweis in Fruchtportion 6 wird mit Fruchtportion 1 gebracht. Und Fruchtportion 5 müsste höhere Konzentrationen als Fruchtportion 2 zeigen, weshalb Fruchtportion 2 als Nachweis ausreicht.

Die neuen Messungen zeigen niedrigere Chlorophyllkonzentrationen als bei Ananas 1. Jedoch zeigen auch sie nachweisbare Konzentrationen in den ersten beiden Fruchtportionen. Die Werte der Fruchtportionen 3 und 4 gehen gegen Null. Die geringeren Werte können auf eine schlechtere Zerkleinerung und der daraus folgenden schlechteren Extraktion zurückzuführen sein. Die Ergebnisse zeigen, dass in Fruchtfleisch und Strunk kein Chlorophyll enthalten ist.

Mark ist das Ananasprodukt, welches potenziell das meiste Chlorophyll enthält. Die Frucht wird nur zerkleinert, dies bedeutet, aus der gesamten Masse kann das Chlorophyll extrahiert werden. Beim Pressen von Saft bleiben möglicherweise Faserstoffe mit Chlorophyll im Trester zurück. Daraus kann, bei einer hohen Chlorophyllkonzentration im Saft oder Konzentrat, geschlossen werden, dass ein höherer Schalenanteil mitverarbeitet worden sein muss. Je höher die Konzentration im Produkt, desto mehr Schale wurde mitverarbeitet.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Statistische Auswertung von Messreihen zur Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Für die statistische Auswertung werden Ergebnisse aus verschiedenen Messreihen herangezogen. Bestimmte statistische Kennzahlen sind nur dann repräsentativ, wenn Kriterien zur Erzeugung der Messwerte beachtet werden. In der Amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB über die „Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen zur Methodvalidierung“ werden die Wiederholbedingungen wie folgt definiert:

„Bedingungen bei der Gewinnung von voneinander unabhängigen Ermittlungsergebnissen, bestehend in der Anwendung desselben Verfahrens am identischen Untersuchungsobjekt im selben Labor durch denselben Bearbeiter mit derselben Geräteausrüstung in kurzen Zeitabständen.“ [29]

Nach diesen Bedingungen ist die folgende Messreihe erzeugt worden.

Tabelle 7: Messreihe unter Wiederholbedingungen

i	Probe	Matrix	Einwaage [g]	mg/kg Produkt		
				Chl a	Chl b	Chl ges
1	2538/1-1	K-An	2,49	2,24	0,34	2,57
2	2538/1-2	K-An	2,51	2,23	0,41	2,64
3	2538/1-3	K-An	2,51	2,31	0,35	2,66
4	2538/1-4	K-An	2,52	2,23	0,40	2,63
5	2538/1-5	K-An	2,52	2,22	0,37	2,59
6	2538/1-6	K-An	2,51	2,27	0,39	2,66
7	2538/1-7	K-An	2,51	2,25	0,28	2,53
8	2538/1-8	K-An	2,51	2,24	0,23	2,47
9	2538/1-9	K-An	2,51	2,22	0,31	2,53
10	2538/1-10	K-An	2,51	2,25	0,34	2,59

Zur Ermittlung der statistischen Kennwerte wird zunächst der Mittelwert \bar{x} mit folgender Gleichung berechnet:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (5.1)$$

$$\bar{x} = \frac{1}{10} \cdot 25,87 \frac{mg}{kg} = 2,587 \frac{mg}{kg} \approx 2,59 \frac{mg}{kg} \quad (5.2)$$

Mit dem Mittelwert kann die Wiederholvarianz s_r^2 berechnet werden:

$$s_r^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (5.3)$$

$$s_r^2 = \frac{1}{9} \cdot 0,0359 \left(\frac{mg}{kg} \right)^2 = 0,00398 \left(\frac{mg}{kg} \right)^2 \quad (5.4)$$

Aus der Wiederholvarianz leitet sich die Wiederholstandardabweichung s_r ab:

$$s_r = \sqrt{s_r^2} \quad (5.5)$$

$$s_r = \sqrt{0,00398 \left(\frac{mg}{kg} \right)^2} = 0,0631 \frac{mg}{kg} \approx 0,06 \frac{mg}{kg} \quad (5.6)$$

Die Kennzahlen aus dieser Messreihe werden als Wiederholvarianz und Wiederholstandardabweichung bezeichnet, da sie unter Wiederholbedingungen erzeugt worden sind. Die Wiederholstandardabweichung gibt die Streuung oder Verteilung der Messergebnisse unter Wiederholbedingungen an.

Um festzustellen, ob der erwartete Wert zwischen zwei unter Wiederholbedingungen erzeugten Werten liegt, wird die Wiederholgrenze berechnet. Sie ist der Betrag der Differenz zwischen den beiden Werten, in der der erwartete Wert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % liegt. Das bedeutet: Für zwei unter Wiederholbedingungen erzeugte Werte, darf die Differenz nicht größer sein als die Wiederholgrenze. Ist sie größer kann kein Mittelwert der Untersuchungsergebnisse gebildet werden.

Die Wiederholgrenze r wird nach Amtl. Sammlung § 64 LFGB-Statistik [29] wie folgt berechnet:

$$r = 2,8 \cdot s_r \quad (5.7)$$

$$r = 2,8 \cdot 0,06 \frac{mg}{kg} = 0,18 \frac{mg}{kg} \quad (5.8)$$

Die Wiederholgrenze liegt damit bei 7 % des Mittelwertes.

Für die Ermittlung der laborinternen Reproduzierbarkeit und der erweiterten Messunsicherheit muss eine andere Messreihe als Grundlage der Berechnungen genommen werden. Dies ist auf das Qualitätsmanagementhandbuch der GfL - Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung mbH zurückzuführen. Dieses fordert, dass für diese beiden Kennzahlen eine Messreihe zugrunde gelegt werden muss, die aus mindestens 10 ausreißerfreien Werten, die zu verschiedenen

Zeiten ermittelt wurden, bestehen muss. Die folgende Messreihe wurde nach diesen Bedingungen erzeugt:

Tabelle 8: Messreihe nach Bedingungen des QMH der GfL

i	Probe	Matrix	Einwaage [g]	mg/kg Produkt		
				Chl a	Chl b	Chl ges
1	Clara I	K-An	2,51	1,84	0,28	2,12
2	Clara II	K-An	2,50	1,77	0,26	2,02
3	Clara III	K-An	2,50	1,86	0,31	2,17
4	Clara IV	K-An	2,50	1,85	0,29	2,15
5	Clara V	K-An	2,51	1,87	0,32	2,19
6	Clara VI	K-An	2,49	1,82	0,28	2,09
7	Clara VII	K-An	2,50	1,82	0,29	2,11
8	Clara VIII	K-An	2,51	1,78	0,42	2,20
9	Clara IX	K-An	2,51	1,83	0,22	2,05
10	Clara	K-An	2,51	1,83	0,32	2,15

Zunächst muss auch hier der Mittelwert nach Gleichung 5.1 ermittelt werden:

$$\bar{x} = \frac{1}{10} \cdot 21,25 \frac{mg}{kg} = 2,125 \frac{mg}{kg} \approx 2,13 \frac{mg}{kg} \quad (5.9)$$

Die Standardabweichung s dieser Messreihe wird ebenfalls benötigt:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (5.10)$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{9} \cdot 0,0315 \left(\frac{mg}{kg}\right)^2} = 0,059 \frac{mg}{kg} \approx 0,06 \frac{mg}{kg} \quad (5.11)$$

Mit den Ergebnissen aus den Gleichungen 5.9 und 5.11 lässt sich die laborinterne Reproduzierbarkeit RSD berechnen:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \quad (5.12)$$

$$RSD = \frac{0,06 \frac{mg}{kg}}{2,13 \frac{mg}{kg}} = 0,0282 \approx 0,03 \quad (5.13)$$

Die Messunsicherheit wird unter Zuhilfenahme des Studentfaktors t berechnet. Der Studentfaktor wird bestimmt von der Anzahl der Messwerte n sowie des gewählten Vertrauensniveaus γ . Das üblicherweise gewählte Vertrauensniveau liegt bei $\gamma = 95 \%$, daraus folgt für $n = 10$ ein Studentfaktor von $t = 2,26$ [30].

$$\Delta x = t \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (5.14)$$

$$\Delta x = 2,26 \frac{0,06 \frac{mg}{kg}}{3,16} = 0,0429 \frac{mg}{kg} \approx 0,04 \frac{mg}{kg} \quad (5.15)$$

Nach QMH der GfL soll die erweiterte Messunsicherheit berechnet werden, das k wird für alle Messreihen als $k = 2$ festgelegt und ist auf den Studentfaktor zurückzuführen. Mit c ist die Konzentration des Analyten gemeint:

$$MU = RSD \cdot k \cdot c \quad (5.16)$$

$$MU = 0,03 \cdot 2 \cdot 2,13 \frac{mg}{kg} = 0,1278 \frac{mg}{kg} \approx 0,13 \frac{mg}{kg} \quad (5.17)$$

Die Messunsicherheit charakterisiert die nachvollziehbare Streuung der Resultate. Die Streuung ist auf Bedingungen im Labor zurückzuführen und gibt den laborinternen zufälligen Fehler an. Die GfL hat die Messunsicherheit erweitert und Bedingungen für die Erzeugung des Wertes festgelegt, um ihn genauer bestimmen zu können.

Das Ergebnis wird mit der Messunsicherheit ($\gamma = 95 \%$) angegeben.

Jeffrey und Humphrey [23] schreiben 1975 von der Wiederholbarkeit, die heutzutage als Wiederholgrenze bezeichnet wird. In ihren Messreihen zeigt die Anwendung der Wiederholbarkeit bei Gesamtchlorophyllkonzentrationen, die kleiner als $0,2 \mu\text{g/ml}$ im Acetonextrakt sind, große Ausfälle. Mehr als 60% der Messwerte waren unbrauchbar. Eine Konzentration von $0,2 \mu\text{g/ml}$ im Acetonextrakt entspricht einer Konzentration von $0,5 \text{ mg/kg}$ im Produkt Konzentrat und einer Konzentration von $0,1 \text{ mg/kg}$ im Produkt Saft / Mark. Diese Werte entsprechen der Nachweisgrenze dieser Messmethode.

Da das photometrische Ergebnis grafisch dargestellt werden kann, wurde sich am Signal-Rausch-Verhältnis aus der Chromatographie orientiert [31]. Dieses hilft, festzustellen, ob ein Rauschen, also eine Abweichung im Messsignal, oder ein Signal des Analyten vorliegt. Bei dieser Methode wird die Bestimmungsgrenze beim vierfachen Rauschen festgelegt. Das Rauschen wird zwischen den Wellenlängen $620 - 630 \text{ nm}$ und $690 - 700 \text{ nm}$ einer sehr niedrig und einer hoch konzentrierten Probe der Messergebnisse ermittelt. Dabei wurde ein Rauschen

von $E = 0,003$ festgestellt. Da Chlorophyll a und b der Literatur nach in einem Verhältnis von 3:1 vorkommen, sind folgende Ergebnisse ermittelt worden:

Tabelle 9: Werte des vierfachen Rauschens

Matrix	Einwaage [g]	mg/kg Produkt			mg/l Extrakt			Korrigierte Extinktionen	
		Chl a	Chl b	Chl ges	Chl a	Chl b	Chl ges	$\lambda = 647 \text{ nm}$	$\lambda = 664 \text{ nm}$
Konzentrat	2,50	0,81	0,09	0,91	0,41	0,05	0,45	0,012	0,036
Saft / Mark	12,50	0,16	0,02	0,18	0,41	0,05	0,45	0,012	0,036

Die Bestimmungsgrenze für Konzentrate liegt damit bei 1,00 mg/kg und für Säfte / Marks bei 0,20 mg/kg.


Die Proben aus der Messreihe 2 sind als Methodenreferenzmaterial hergestellt worden um bei Messungen mit aufgearbeitet zu werden. Mithilfe dieses Referenzmaterials lässt sich nachvollziehen, ob Methodische Fehler in einer Aufarbeitungsserie passiert sind. Dafür werden die Messergebnisse des Referenzmaterials in eine Regelkarte eingetragen. Diese Regelkarte besteht aus einer Vorperiode die zwölf Werte umfassen soll. Und einer Kontrollperiode, die neu erzeugte Werte prüft. Diese Regelkarte wird nun so lange geführt, bis genügend Werte erzeugt wurden. Anschließend erfolgt eine neue statistische Auswertung der Methode, deren Ergebnisse in der Arbeitsanweisung einzutragen sind.

Alle originalen Messergebnisse sind in Anhang B nachzuvollziehen.

5.2 Ergebnisse und Diskussion

Im Laufe der Versuche sind unterschiedliche Veränderungen des genauen Arbeitsablaufes vorgenommen worden. In den ersten Versuchsreihen sind bestimmte Arbeitsschritte nicht genau genug festgelegt gewesen. Die Bearbeitung mit dem Ultra-Turrax wurde daraufhin zeitlich festgelegt, was eine Verbesserung der Ergebnisse zeigte. Auch die zeitliche Festlegung für das Lösen des Quechersalzgemisches erwies sich als sinnvoll.

Das Ergebnis dieser Arbeit findet ihren Niederschlag in einer SOP, einer sogenannten Standardarbeitsanweisung, für eine Hausmethode der GfL - Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung mbH zur Chlorophyllbestimmung in Ananassäften, -marks und -konzentraten.

 Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung mbH	Methode:				Ausgabe:
	Chlorophyll Bestimmung				1 / 2016
photometrisch				gültig ab: 12.01.2016	
erstellt: (Datum)	geprüft LM:	geprüft QS:	geprüft SB:	freigegeben:	
Methode basiert auf: Jeffrey, S. W. and Humphrey, G. F. (1975), Biochem. Physiol. Pflanzen, Bd. 167, S191-194)					
Dialims Methode: MEV		Anita-Kürzel: MEV		Methoden-Nr.: MEV	

1 Zweck und Anwendungsgebiet

Diese Methode beschreibt ein photometrisches Verfahren zur Messung von Chlorophyll a und b sowie des daraus resultierenden Gesamtchlorophyllgehaltes in Ananassaft/ -mark/ -konzentrat.

2 Begriff

Unter dem Gehalt an Chlorophyll der in Abschnitt 1 genannten Erzeugnisse wird der nach dem hier beschriebenen Verfahren ermittelte Gehalt an Chlorophyll als Summe aus Chlorophyll a und Chlorophyll b verstanden. Mit erfasst wird auch die erste Abbaustufe der Chlorophylle, die Phäophytine. Der Gehalt wird in mg/kg angegeben.

3 Kurzbeschreibung

Das Chlorophyll wird mittels Aceton aus der Probe extrahiert und der Extrakt photometrisch gemessen.

4 Chemikalien und Lösungen

(Hergestellte Lösungen müssen in die entsprechenden Reagenziendatenblätter eingetragen werden.)

Soweit nicht anders angegeben, sind analysenreine Chemikalien zu verwenden. Das Wasser muss destilliert oder von entsprechender Reinheit sein.

4.1 Aceton, 99%ig

4.2 Quechersalz

4.3 Herstellung

4.3.1 Quechersalz

Zur Herstellung des Quechersalzes werden 92 g feinpulveriges, wasserfreies Magnesiumsulfat, 23 g Natriumchlorid, 12 g Dinatriumhydrogencitrat-Sesquihydrat und 23 g Trinatriumcitrat-Dihydrat in ein Gefäß eingewogen und sorgfältig miteinander gemischt. Es entsteht ein Salzgemisch von 150 g, das für ca. 30 Aufarbeitungen reicht. Das Salzgemisch ist verschlossen ein Jahr lang haltbar (ASU Nr. 00.00 115).

5 Geräte

5.1 Laborzentrifuge

5.2 Greiner-Röhrchen, 50 ml

5.3 Greiner-Röhrchen, 15 ml

5.4 Pasteurpipette

5.5 Ultra-Turrax

5.6 Pipette, 5 ml

6 Durchführung

6.1 Konzentrat

Es werden $2,5 \pm 0,1$ g Probe in ein Greiner-Röhrchen (50 ml) eingewogen, die Einwaage wird für die spätere Berechnung notiert. Anschließend wird die Probe mit 5 ml Aceton versetzt und bei einer Leerlaufdrehzahl von 9500 min^{-1} für 60 s mit dem Ultra-Turrax homogenisiert.

6.2 Saft / Mark

Es werden $12,5 \pm 0,1$ g Probe in ein Greiner-Röhrchen (50 ml) eingewogen, die Einwaage wird für die spätere Berechnung notiert. Anschließend wird die Probe mit 5 ml Aceton versetzt und bei einer Leerlaufdrehzahl von 9500 min^{-1} für 60 s mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Nach der Zugabe von 5 g Salzgemisch wird das verschlossene Röhrchen für 3 min geschüttelt.

Die Proben werden bei 3850 g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wird vorsichtig mittels Pasteurpipette die obere Phase (Acetonphase) in ein Greiner-Röhrchen (15 ml) überführt.

Anschließend werden die Extinktionen, gegen Aceton als Blindwert, bei den Wellenlängen 630 nm, 647 nm, 664 nm und 700 nm photometrisch gemessen.

7 Auswertung

7.1 Berechnung

$$\text{BLK} = \frac{E_{630} + E_{700}}{2}$$

$$\text{Chlorophyll a [mg/kg]} = \frac{[11,93 * (E_{664} - \text{BLK}) - 1,93 * (E_{647} - \text{BLK})] * 5}{\text{Einwaage}}$$

$$\text{Chlorophyll b [mg/kg]} = \frac{[20,36 * (E_{647} - \text{BLK}) - 5,50 * (E_{664} - \text{BLK})] * 5}{\text{Einwaage}}$$

$$\text{Chlorophyll gesamt [mg/kg]} = \text{Chlorophyll a} + \text{Chlorophyll b}$$

BLK... Basislinienkorrektur

Einwaage in g

7.2 Angabe der Ergebnisse

Das Ergebnis wird mit zwei Nachkommastellen gerundet in mg/kg angegeben.

8 Zuverlässigkeit der Methode

8.1 Verifizierungsdaten

Die Verifizierung erfolgte im: Dez. 2015 / Jan. 2016

Sie wurde im Bereich von 2,00 mg/kg bis 2,7 mg/kg mit einem Ananassaftkonzentrat durchgeführt und umfasste 20 Einzelmessungen.

- Bestimmungsgrenze 0,20 mg/kg für Saft / Mark, 1,00 mg/kg für Konzentrate
- Wiederholgrenze r 0,18 mg/kg (7 %)
- Vergleichbarkeit R

8.2 Überprüfung der Methode

Zur Überprüfung der Methode zählen Qualitätssicherungsmaßnahmen, vorbeugende Maßnahmen des QMH sowie ein Review, welches alle 5 Jahre durchgeführt wird.

Standards/Dotierungen:

Siehe Dokumentation Projekt Chlorophyll

Referenzmaterial:

Nicht vorhanden.

Ringversuche / Laborabgleiche:

Ja, wird durchgeführt mit IGV.

Führen einer Regelkarte:

Ja.

9 Literatur

9.1 Jeffrey, S. W. and Humphrey, G. F. (1975), Biochem. Physiol. Pflanzen, Bd. 167, S191-194)

9.2 ASU Nr. 00.00 115

10 Anhang

10.1 Jeffrey, S. W. and Humphrey, G. F. (1975), Biochem. Physiol. Pflanzen, Bd. 167, S191-194)

11 Sicherheitshinweise

Zu beachten sind die allgemeinen Vorschriften der Sicherheitsbelehrung sowie der Gefährdungsbeurteilung. Darüber hinaus weist die Methode keine besonderen, spezifischen Aspekte auf oder ggf. etwas zu sehr giftigen Substanzen etc.

6 Zusammenfassung

Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, kann bei der Herstellung von Ananassaft, in Abhängigkeit vom Verfahren, Schale in das Endprodukt gelangen. Auf der Grundlage einer Veröffentlichung von Jeffrey und Humphrey aus dem Jahr 1975, in der die Konzentrationsberechnung des Chlorophylls in verschiedenen Lösungsmitteln durch eine photometrische Messung beschrieben wird, wurde hiermit eine Methode entwickelt, um dies nachzuweisen. Mit dieser Methode lässt sich die Schalenverwertung durch die Bestimmung des Pigments Chlorophyll nachweisen. In den Vorversuchen hat sich herausgestellt, dass Chlorophyll sich als Parameter für die Schalenverarbeitung eignet, da nachgewiesen wurde, dass Chlorophyll ausschließlich in der Schale der Frucht vorkommt. Dieser Nachweis wurde durch die Zerlegung mehrerer Ananas in unterschiedliche Partien und anschließender Messung erbracht. Bei der Auftrennung der extrahierten Farbstoffe durch eine Dünnschichtchromatographie stellte sich heraus, dass auch das vermutlich je nach Reifegrad anfallende Abbauprodukt Phäophytin bei der Messung mit erfasst wird. Aus diesem Grund wird das jemals vorhandene Gesamtchlorophyll erfasst.

Während der gesamten Probenaufarbeitung muss darauf geachtet werden, dass möglichst wenig Lichteinfluss besteht und zügig gearbeitet wird. Chlorophyll ist nicht lichtstabil und kann sonst abgebaut werden. Die statistische Auswertung von Messreihen lässt auf die Funktionalität der Methode schließen. Es wurden sowohl eine Nachweisgrenze für Konzentrate bei 0,50 mg/kg und für Säfte / Marks bei 0,10 mg/kg, als auch eine Bestimmungsgrenze für Konzentrate bei 1,00 mg/kg und für Säfte / Marks bei 0,20 mg/kg für diese Methode festgelegt. Die Bestimmung des Chlorophylls in Ananassäften ist daher zur qualitativen und quantitativen Aussage über die Schalenverarbeitung geeignet. Das Ergebnis ist eine Standardarbeitsanweisung die mithilfe der gewonnen Ergebnisse erarbeitet wurde.

7 Literaturverzeichnis

- [1] VdF, „Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e.V. (VdF),“ WPR COMMUNICATION Berlin, Sankt Augustin, [Online]. Available: <http://www.fruchtsaft.de/medien/wirtschaft/>. [Zugriff am 05. 07. 2016].
- [2] *Fruchtsaft- und Erfrischungsgetränkeverordnung vom 24. Mai 2004 (BGBl. I S. 1016), die zuletzt durch Artikel 3 der Verordnung vom 30. Juni 2015 (BGBl. I S. 1090) geändert worden ist.*
- [3] Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., „Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.,“ 08. 2011. [Online]. Available: <https://www.dge.de/wissenschaft/weitererpublikationen/fachinformationen/bedeutung-von-obst-und-gemuese-in-der-ernaehrung-des-menschen/>. [Zugriff am 21. 08. 2016].
- [4] *Richtlinie 2012/12/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 19. April 2012 zur Änderung der Richtlinie 2001/112/EG des Rates über Fruchtsäfte und bestimmte gleichartige Erzeugnisse für die menschliche Ernährung, ABl. Nr. 115/1 vom 27.04.2012., 2012.*
- [5] Schobinger, U., *Frucht- und Gemüsesäfte*, Stuttgart: Eugen Ulmer GmbH & Co., 2001.
- [6] VdF, „Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e.V. (VdF),“ 2013. [Online]. Available: <http://www.fruchtsaft.de/saftwissen/herstellung/rohware>. [Zugriff am 04. 07. 2016].
- [7] Menzel, M. und Stintzing, F.C., „Römpf Thieme,“ 11. 2008. [Online]. Available: <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-01-02340>. [Zugriff am 04. 07. 2016].
- [8] Sultemeyer, D., „Römpf Thieme,“ 07. 2009. [Online]. Available: <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-03-00255>. [Zugriff am 04. 07. 2016].
- [9] Teufel, A., Ternes, W., Tugner, L. und Zobel, M., *Lebensmittellexikon L-Z*, Hamburg: B. Behr's Verlag GmbH & Co., 1993.
- [10] Hartinger, R., „Verfahren zur Herstellung von Ananassaft und Ananassaftkonzentrat“. Deutschland Patent EP 1 112 007 B1, 04. 07. 2001.
- [11] Schultz, S., Wagener, G. und Ulrich, J., „Hochdruckhomogenisation als ein Verfahren zur Emulsionsherstellung,“ *Chemie Ingenieur Technik*, Bd. 74, Nr. 7/2002, 2002.
- [12] Schubert, H., *Emulgiertechnik*, 1. Auflage Hrsg., H. Schubert, Hrsg., Hamburg: Behr, 2005.
- [13] „Pineapple Processing Line : part 1 of 2,“ 01. 06. 2011. [Online]. Available: <https://www.youtube.com/watch?v=HQg4kT5zMxU>. [Zugriff am 21. 07. 2016].
- [14] Fischer, G.E., „Pineapple-Meat Eradicator“. Honolulu, Territory of Hawaii Patent 1 350 096, 17. 08. 1920.
- [15] AIJN, *Reference Guide Pineapple - Revision 2015*, 2015.

- [16] Wallrauch, S., „Beitrag über die Zusammensetzung und Beurteilung von Ananassäften,“ *Flüssiges Obst*, pp. 20 - 26, 1992.
- [17] Kadereit, J.W., Körner, C., Kost, B. und Sonnewald, U., Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014.
- [18] Römpf Redaktion, „Römpf -Thieme,“ 03. 2002. [Online]. Available: <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-03-01523>. [Zugriff am 16. 08. 2016].
- [19] Moser, S., „Die blaue Lumineszenz reifer Bananen,“ *Angewandte Chemie*, 2008.
- [20] „zusatzstoffe-online.de,“ Die Verbraucher Initiative e.V., 18. 11. 2010. [Online]. Available: http://www.zusatzstoffe-online.de/zusatzstoffe/21.e140_chlorophylle.html. [Zugriff am 16. 08. 2016].
- [21] „zusatzstoffe-online.de,“ Die Verbraucher Initiative e.V., 18. 11. 2010. [Online]. Available: http://www.zusatzstoffe-online.de/zusatzstoffe/22.e141_kupferkomplexe_chlorophylle.html. [Zugriff am 16 08 2016].
- [22] Matissek, R., Fischer, M. und Steiner, G., Lebensmittelanalytik, 5. Auflage Hrsg., Köln, Hamburg, Stuttgart: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013.
- [23] Jeffrey, S.W. und Humphrey, G.F., „New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c1 and c2 in Higher Plants, Algae an Natural Phytoplankton,“ *Biochem. Physiol. Pflanzen*, Bd. 167, pp. 191-194, 1975.
- [24] Qudseih, H.Y.M., Yusof, S., Osman, A. und Rahman, R.A., „Effect of Maturity n Chlorophyll, Tannin, Color, and Polyphenol Oxidase (PPO) Activity of Sugarcrane Juice (Saccharum oofficinatum Var. Yellow Crane),“ *J.Agric. Food Chem.*, pp. 1615-1618, 2002.
- [25] Amtl. Sammlung § 64 LFGB, *Untersuchung von Lebensmitteln - Betsimmung thermischer Abbauprodukte des Chlorophylls a und à in pflanlichen Fetten und Ölen*, 2015.
- [26] „link-bergstasse.de,“ 18. 01. 2010. [Online]. Available: <http://link-bergstrasse.de/unterrichtsmaterial/Photosynthese/fluoreszenz.htm>. [Zugriff am 17. 08. 2016].
- [27] Karcz, D., Boron, B., Matwijczuk, A., Furso, J., Staron, J., Ratuszna, A. und Fiedor, L., „Lessons from Chlorophylls: Modifications of Porphyrinoids Towards Optimized Solar Energy Conversion,“ 2014.
- [28] Schwab, E., „Chlorophylle,“ 03. 2006. [Online]. Available: <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-03-01522>. [Zugriff am 04. 08. 2016].
- [29] Amtl. Sammlung § 64 LFGB, *Statistik - Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen zur Methodvalidierung*, 2006.

- [30] Papula, L., „Auswertung einer Messreihe,“ in *Mathematik für Ingenieure und Naturwissenschaftler*, Bd. 3, Wiesbaden, Springer Fachmedien, 2016, pp. 662 - 678.
- [31] Dr. Kromidas, S., „kromidas.de,“ [Online]. Available: <http://www.kromidas.de/Uploads/Dokumente/ValidierunginderAnalytik.pdf>. [Zugriff am 17. 08. 2016].
- [32] „Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e.V. (VdF),“ WPR Communication Berlin, 2016. [Online]. Available: <http://www.fruchtsaft.de/medien/wirtschaft/>. [Zugriff am 05 07 2016].

A Anhang

Teil 1

no time
kind regards
Simon Wright

PC 319

Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP), Bd. 167, S. 191–194 (1975)

Short Communication

New Spectrophotometric Equations
for Determining Chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂
in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton

S. W. JEFFREY and G. F. HUMPHREY

CSIRO Marine Biochemistry Unit, Botany Building (A 12), Sydney University
Sydney, Australia

Key Term Index: chlorophylls, spectrophotometry, determination, equations.

Summary

New equations are presented for spectrophotometric determination of chlorophylls, based on revised extinction coefficients of chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂. These equations may be used for determining chlorophylls *a* and *b* in higher plants and green algae, chlorophylls *a* and *c*₁ + *c*₂ in brown algae, diatoms and chrysomonads, chlorophylls *a* and *c*₂ in dinoflagellates and cryptomonads, and chlorophylls *a*, *b*, and *c*₁ + *c*₂ in natural phytoplankton.

Spectrophotometric equations currently used for determining chlorophylls *a* and *b* in higher plants (ARNON 1949; VERNON 1960), chlorophylls *a* and *c* in algae (HUMPHREY and JEFFREY in JEFFREY and HAXO 1968) and chlorophylls *a*, *b* and *c* in phytoplankton (PARSONS and STRICKLAND 1963; SCOR-UNESCO 1966) are based on extinction coefficients of MACKINNEY (1941) and SMITH and BENITEZ (1955) for chlorophylls *a* and *b*, and that of JEFFREY (1963) for chlorophyll *c* (Table 1). JEFFREY (1968, 1969) subsequently found that chlorophyll *c* was a mixture of two components (*c*₁ and *c*₂), which polymerize when purified (JEFFREY and SHIBATA 1969) to give lowered intensities of absorption bands and therefore lowered extinction coefficients. Each component of chlorophyll *c* has now been carefully crystallized to prevent polymerization, and extinction coefficients determined (JEFFREY 1972). The new extinction coefficients for chlorophylls *c*₁ and *c*₂ are approximately twice the former value for unresolved chlorophyll *c*.

Table 1 Extinction coefficients of chlorophylls used to derive spectrophotometric equations in current use

Chlorophyll	Extinction Coefficients in diethyl ether at red maximum (l · gm ⁻¹ cm ⁻¹)			
	MACKINNEY (1941)	SMITH and BENITEZ (1955)	STRAIN et al. (1963)	JEFFREY (1963)
chlorophyll <i>a</i>	90.1	102.0	96.0	
chlorophyll <i>b</i>	54.9	59.0	59.0	
chlorophyll <i>c</i>				15.8

Table 2 *Extinction coefficients of chlorophylls used to derive the new equations*

Chlorophyll	Extinction Coefficients at the red maximum (l · gm ⁻¹ cm ⁻¹)		
	Diethyl ether	100% acetone	90% acetone
chlorophyll <i>a</i> *	98.07 (660.7 nm)	88.15 (662.7 nm)	87.67 (664.3 nm)
chlorophyll <i>b</i> *	62.00 (643.3 nm)		51.36 (646.8 nm)
chlorophyll <i>c</i> ₁ ⁺		39.2 (629.1 nm)	44.8 (630.6 nm)
chlorophyll <i>c</i> ₂ ⁺		37.2 (629.6 nm)	40.4 (630.9 nm)

* JEFFREY unpublished

+ JEFFREY (1972)

Thus determinations of chlorophyll *c* using the old equations give results approximately twice as high as those indicated by the present work. Extinction coefficients for crystalline chlorophylls *a* and *b* have been also redetermined for a variety of solvents most frequently used for making pigment assays (JEFFREY in preparation). Extinction coefficients of these highly purified preparations of chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ at their red maxima, are given in Table 2. These new values for *a* and *b* are almost identical to the most careful recently determined coefficients of STRAIN and co-workers (1963), (Table 1). The early MACKINNEY values used in the original ARNON (1949) higher plant equations are some 8% lower than the new values of both STRAIN and JEFFREY. The VERNON values, based on the SMITH and BENITEZ coefficients, which were also used in the algal *a* + *c* and phytoplankton *a* + *b* + *c* equations, are about 5% higher than the STRAIN and JEFFREY values. There are independent reasons for believing that these values are a few percent too high (JEFFREY, in preparation).

The new sets of equations have therefore been written using the revised extinction coefficients of JEFFREY for chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ (Table 2). Since the extinction coefficients of chlorophylls *c*₁ and *c*₂ differ only by 5% and 10% in 100% and 90% acetone respectively, and because of the smallness of the errors involved, equations utilizing chlorophylls *c*₁ and *c*₂ were derived for 1:1 mixtures of these two pigments. In the many algal species which have been examined which contain both chlorophylls *c*₁ and *c*₂, the most common proportions of chlorophylls *c*₁ and *c*₂ are *c*₂:*c*₁ = 1:0.7 and *c*₂:*c*₁ = 1:1 (JEFFREY, unpublished). The equations may be employed to assay a variety of mixtures of chlorophylls which are typically found in higher plants, green algae, brown algae, diatoms, chrysomonads, dinoflagellates and cryptomonads (JEFFREY 1968, 1969, 1972), and natural mixtures of these algae. We present here equations derived for chlorophyll estimation in 90% and 100% acetone. Results are expressed in μg · ml⁻¹ (using 1 cm cell path-length). The symbol E_x denotes the extinction at wavelength x.

1. Higher plants and green algae containing chlorophylls *a* and *b*
(solvent 90% acetone)
Chlorophyll *a* = $11.93 E_{664} - 1.93 E_{647}$
Chlorophyll *b* = $20.36 E_{647} - 5.50 E_{664}$
2. Diatoms, chrysoomonads and brown algae containing chlorophylls *a*, and *c*₁ and *c*₂ in equal proportions (solvent 90% acetone)
Chlorophyll *a* = $11.47 E_{664} - 0.40 E_{630}$
Chlorophylls *c*₁ + *c*₂ = $24.36 E_{630} - 3.73 E_{664}$
3. Dinoflagellates and cryptomonads containing chlorophylls *a* and *c*₂
(solvent 100% acetone)
Chlorophyll *a* = $11.43 E_{663} - 0.64 E_{630}$
Chlorophyll *c*₂ = $27.09 E_{630} - 3.63 E_{663}$
4. Mixed phytoplankton populations containing chlorophylls *a* and *b* and equal amounts of chlorophylls *c*₁ and *c*₂ (solvent 90% acetone)
Chlorophyll *a* = $11.85 E_{664} - 1.54 E_{647} - 0.08 E_{630}$
Chlorophyll *b* = $-5.43 E_{664} + 21.03 E_{647} - 2.66 E_{630}$
Chlorophylls *c*₁ + *c*₂ = $-1.67 E_{664} - 7.60 E_{647} + 24.52 E_{630}$

The recovery of chlorophyll *a* from known mixtures using all four equations was usually in the range of 98–102%. The recovery of chlorophyll *b* from mixtures of *a* + *b*, using the *a* + *b* equations, was from 98–106%. The recovery of chlorophyll *c* from mixtures of *a* + *c*, using both sets of *a* + *c* equations, averaged 95–104% when chlorophyll *c* was present in amounts greater than one-fifth the chlorophyll *a* concentration. Decreasing proportions of chlorophyll *c* with respect to chlorophyll *a* gave increasing errors in recovery, due to the swamping of the small absorption band of chlorophyll *c* by the relatively large absorption band of chlorophyll *a* at the wavelength of estimation (630 nm). Likewise in mixtures of *a* + *b* + *c*₁ + *c*₂ the recovery of *b* and *c* using the fourth set of equations, were in the range 95–110%, where *b* and *c* were each greater than one quarter the *a* concentration. However, in mixtures increasingly overloaded with chlorophyll *a* recoveries of *b* and *c* were significantly over estimated. Very low concentrations of all pigments in mixtures (less than $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) also gave large errors in recovery (up to 60%).

The preparative methods used for obtaining the revised extinction coefficients of chlorophylls *a* and *b*, the sensitive tests for purity of the chlorophylls, and data on the accuracy and precision of the equations will be presented in detail elsewhere. Also the effects on accuracy of common degradation products of chlorophyll *a* (chlorophyllide *a*, pheophytin *a* and pheophorbide *a*) which occur in natural phytoplankton populations (JEFFREY 1974) will be discussed.

References

- ANNON, D. I., Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. **24**, 1–15 (1949).

- JEFFREY, S. W., Purification and properties of chlorophyll *c* from *Sargassum flavicans*. *Biochem. J.* **86**, 313–318 (1963).
- Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochim. biophys. Acta* **162**, 271–285 (1968).
- Properties of two spectrally different components in chlorophyll *c* preparations. *Biochim. biophys. Acta.* **177**, 456–467 (1969).
- Preparation and some properties of crystalline chlorophyll c_1 and c_2 from marine algae. *Biochim. biophys. Acta* **279**, 15–33 (1972).
- Profiles of photosynthetic pigments in the ocean, using thin-layer chromatography. *Marine Biol.* **26**, 101–110 (1974).
- HAXO, F. T., Photosynthetic pigments of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) from corals and clams. *Biol. Bull.* **135**, 149–165 (1968).
- JEFFREY, S. W., SHIBATA, K., Some spectral characteristics of chlorophyll *c* from *Tridacna crocea* zooxanthellae. *Biol. Bull.* **136**, 54–62 (1969).
- MACKINNEY, G., Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. biol. Chem.* **140**, 315–322 (1941).
- PARSONS, T. R., STRICKLAND, J. D. H., Discussion of spectrophotometric determination of marine plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J. mar. Res.* **21**, 155–163 (1963).
- SCOR-UNESCO, Determination of photosynthetic pigments in seawater. *Monographs on Oceanographic Methodology* **1**, 11–18. UNESCO, Paris, 1966.
- SMITH, J. H. C., BENITEZ, A., Chlorophylls: Analysis in plant materials. In: *Modern Methods of Plant Analysis*, **4**, 142–196, PAECH, K., and TRACEY, M., (eds.) Springer, Heidelberg 1955.
- STRAIN, H. H., THOMAS, M. R., KATZ, J. J., Spectral absorption properties of ordinary and fully deuterated chlorophylls *a* and *b*. *Biochim. biophys. Acta* **75**, 306–311 (1963).
- VERNON, L. P., Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. *Anal. Chem.* **32**, 1144–1150 (1960).

Received October 10, 1974.

Authors' address: Dr. S. W. JEFFREY and G. F. HUMPHREY, CSIRO Marine Biochemistry Unit, Botany Building (A 12), Sydney University, Sydney, N.S.W., 2006 (Australia).

Teil 2



Abbildung 21: Bilder der Aufarbeitung von Ananas 2



Abbildung 22: Bilder der Aufarbeitung von Ananas 3

B Anhang Messergebnisse

Tabelle 10: Messergebnisse zum Versuch Stabilitätsverhalten des Chlorophylls

Probe	Zeit t in h	Chl a	Chl b	Chl ges	$\lambda = 630 \text{ nm}$	$\lambda = 647 \text{ nm}$	$\lambda = 664 \text{ nm}$	$\lambda = 700 \text{ nm}$	Korr.
Grasextrakt	0	43,68	12,18	55,86	0,186	0,432	0,886	0,014	0,100
Grasextrakt	2	42,17	11,22	53,40	0,181	0,413	0,856	0,015	0,098
Grasextrakt	4	40,47	11,77	52,23	0,177	0,409	0,825	0,015	0,096
Grasextrakt	6	40,10	11,50	51,59	0,174	0,400	0,814	0,010	0,092
Grasextrakt	21,5	40,07	11,51	51,58	0,177	0,404	0,817	0,014	0,096
Grasextrakt	24	37,40	11,09	48,48	0,167	0,381	0,764	0,013	0,090
Grasextrakt	26	34,64	10,07	44,71	0,162	0,356	0,712	0,014	0,088
Grasextrakt	28	32,09	10,23	42,31	0,157	0,344	0,666	0,016	0,087
Grasextrakt	30	31,28	10,01	41,29	0,154	0,336	0,650	0,016	0,085
Grasextrakt	46	30,94	9,98	40,92	0,150	0,329	0,639	0,010	0,080
Grasextrakt	49	29,24	9,59	38,83	0,147	0,317	0,608	0,012	0,080
Grasextrakt	50	28,40	9,45	37,84	0,146	0,311	0,593	0,013	0,080
Grasextrakt	52	26,94	9,14	36,08	0,144	0,301	0,567	0,015	0,080
Grasextrakt	54	26,49	9,11	35,60	0,141	0,297	0,557	0,014	0,078
Grasextrakt	70	26,25	9,22	35,47	0,139	0,296	0,552	0,014	0,077
Grasextrakt	72	24,13	8,74	32,86	0,135	0,279	0,512	0,014	0,075
Grasextrakt	75,5	19,06	7,76	26,82	0,122	0,240	0,417	0,018	0,070
Grasextrakt	77,5	18,23	7,76	25,99	0,112	0,233	0,399	0,021	0,067
Grasextrakt	94	17,48	7,27	24,75	0,115	0,224	0,385	0,018	0,067
Grasextrakt	98	16,18	6,80	22,98	0,109	0,210	0,358	0,017	0,063
Grasextrakt	100	15,55	6,56	22,11	0,107	0,202	0,344	0,014	0,061

Tabelle 11: Messergebnisse zum Versuch Standardaddition zur Überprüfung der Messergebnisse

Probe	Probenart	Aufgearbeitet als	Einwaage [g]	mg/kg Produkt			mg/l			Extinktionen bei				
				Chl a	Chl b	Chl ges	Chl a	Chl b	Chl ges	$\lambda = 630$ nm	$\lambda = 647$ nm	$\lambda = 664$ nm	$\lambda = 700$ nm	BLK
5389/5-100µl	K-An	K	2,51	4,12	0,60	4,72	2,07	0,30	2,37	0,037	0,086	0,205	0,005	0,021
5389/5-200µl	K-An	K	2,51	4,99	0,80	5,79	2,51	0,40	2,91	0,047	0,106	0,249	0,005	0,026
5389/5-300µl	K-An	K	2,51	5,81	1,00	6,82	2,92	0,50	3,42	0,058	0,127	0,292	0,006	0,032
5389/5-400µl	K-An	K	2,51	6,98	1,24	8,22	3,51	0,62	4,13	0,070	0,154	0,351	0,007	0,039
5389/5-100µl	K-An	S	2,51	3,50	0,71	4,21	1,76	0,36	2,12	0,046	0,088	0,185	0,010	0,028
5389/5-200µl	K-An	S	2,51	3,96	0,87	4,83	1,99	0,44	2,43	0,055	0,103	0,211	0,011	0,033
5389/5-300µl	K-An	S	2,51	4,44	1,04	5,47	2,23	0,52	2,75	0,056	0,113	0,233	0,011	0,034
5389/5-400µl	K-An	S	2,51	4,98	1,25	6,23	2,50	0,63	3,13	0,064	0,130	0,263	0,013	0,039

Tabelle 12: Messergebnisse zum Versuch Chlorophyllkonzentrationen der verschiedenen Fruchtportionen Ananas 1

Probe	Probenart	Aufgearbeitet als	Einwaage [g]	mg/kg Produkt			mg/l			Extinktionen bei				
				Chl a	Chl b	Chl ges	Chl a	Chl b	Chl ges	$\lambda = 630$ nm	$\lambda = 647$ nm	$\lambda = 664$ nm	$\lambda = 700$ nm	BLK
A 1.1	M-An		12,49	2,45	1,28	3,72	6,12	3,19	9,30	0,238	0,474	0,728	0,093	0,166
A 1.2	M-An		12,53	0,87	0,45	1,33	2,19	1,13	3,32	0,120	0,199	0,290	0,057	0,089
A 1.3	M-An		12,48	0,00	0,07	0,07	0,00	0,17	0,18	0,088	0,087	0,079	0,067	0,078
A 1.4	M-An		12,48	-0,01	0,07	0,07	-0,02	0,19	0,16	0,106	0,106	0,096	0,087	0,097
A 1.5	M-An		12,55	1,14	0,84	1,98	2,86	2,12	4,98	0,185	0,314	0,406	0,090	0,138
A 1.6 verdünnt		K	2,56	21,10	6,15	27,25	10,80	3,15	13,95	0,211	0,532	1,087	0,017	0,114
A 1.6 Verdünnung rausgerechnet			2,56	63,29	18,45	81,74	32,41	9,45	41,85					
A 1.7	M-An		12,54	0,02	0,03	0,05	0,05	0,07	0,12	0,042	0,042	0,042	0,032	0,037

Tabelle 13: Messergebnisse zum Versuch Chlorophyllkonzentrationen der Verschieden Fruchtportionen Ananas 2 und Ananas 3

Probe	Probenart	Aufgearbeitet als	Einwaage [g]	mg/kg Produkt			mg/l			Extinktionen bei				
				Chl a	Chl b	Chl ges	Chl a	Chl b	Chl ges	$\lambda = 630$ nm	$\lambda = 647$ nm	$\lambda = 664$ nm	$\lambda = 700$ nm	BLIK
A 2.1.1	M-An	M	12,53	0,21	0,11	0,32	0,52	0,28	0,79	0,060	0,074	0,095	0,035	0,048
A 2.1.2	M-An	M	12,53	0,16	0,08	0,25	0,41	0,21	0,62	0,058	0,067	0,084	0,035	0,047
A 2.2.1	M-An	M	12,48	0,09	0,06	0,15	0,23	0,15	0,37	0,046	0,051	0,059	0,030	0,038
A 2.2.2	M-An	M	12,52	0,09	0,06	0,15	0,23	0,15	0,37	0,047	0,051	0,059	0,029	0,038
A 2.3.1	M-An	M	12,51	-0,01	0,03	0,03	-0,02	0,09	0,07	0,036	0,034	0,029	0,024	0,030
A 2.3.2	M-An	M	12,51	0,00	0,03	0,03	-0,01	0,08	0,07	0,038	0,036	0,032	0,026	0,032
A 2.4.1	M-An	M	12,52	0,00	0,05	0,04	-0,01	0,12	0,11	0,044	0,044	0,038	0,032	0,038
A 2.4.2	M-An	M	12,50	-0,01	0,04	0,03	-0,01	0,09	0,08	0,046	0,045	0,040	0,035	0,041
A 2.1.1	M-An	M	12,51	0,36	0,15	0,51	0,89	0,38	1,27	0,079	0,099	0,140	0,038	0,059
A 3.1.2	M-An	M	12,53	0,36	0,14	0,50	0,90	0,34	1,25	0,087	0,106	0,149	0,047	0,067
A 3.2.1	M-An	M	12,53	0,09	0,08	0,16	0,22	0,19	0,41	0,042	0,048	0,054	0,024	0,033
A 3.2.2	M-An	M	12,52	0,08	0,05	0,13	0,19	0,12	0,32	0,039	0,042	0,049	0,023	0,031
A 3.3.1	M-An	M	12,50	-0,01	0,03	0,03	-0,02	0,09	0,07	0,028	0,026	0,021	0,016	0,022
A 3.3.2	M-An	M	12,49	-0,01	0,03	0,03	-0,02	0,09	0,07	0,034	0,031	0,026	0,020	0,027
A 3.4.1	M-An	M	12,51	-0,01	0,05	0,04	-0,02	0,13	0,10	0,037	0,036	0,029	0,023	0,030
A 3.4.2	M-An	M	12,52	0,00	0,03	0,03	-0,01	0,08	0,07	0,034	0,033	0,029	0,024	0,029

Tabelle 14: Messergebnisse der statistischen Auswertung Messreihe 1

Probe	Probenart	Aufgearbeitet als	Einwaage [g]	mg/kg Produkt			mg/l			Extinktionen bei				
				Chl a	Chl b	Chl ges	Chl a	Chl b	Chl ges	$\lambda = 630$ nm	$\lambda = 647$ nm	$\lambda = 664$ nm	$\lambda = 700$ nm	BLK
2538/1-1	K-An	K	2,49	2,24	0,34	2,57	1,11	0,17	1,28	0,020	0,047	0,111	0,004	0,012
2538/1-2	K-An	K	2,51	2,23	0,41	2,64	1,12	0,20	1,32	0,019	0,048	0,111	0,003	0,011
2538/1-3	K-An	K	2,51	2,31	0,35	2,66	1,16	0,18	1,33	0,020	0,048	0,114	0,002	0,011
2538/1-4	K-An	K	2,52	2,23	0,40	2,63	1,12	0,20	1,32	0,021	0,049	0,112	0,003	0,012
2538/1-5	K-An	K	2,52	2,22	0,37	2,59	1,12	0,19	1,30	0,020	0,048	0,111	0,003	0,012
2538/1-6	K-An	K	2,51	2,27	0,39	2,66	1,14	0,20	1,33	0,018	0,049	0,113	0,005	0,012
2538/1-7	K-An	K	2,51	2,25	0,28	2,53	1,13	0,14	1,27	0,020	0,046	0,112	0,004	0,012
2538/1-8	K-An	K	2,51	2,24	0,23	2,47	1,12	0,11	1,24	0,022	0,046	0,113	0,005	0,014
2538/1-9	K-An	K	2,51	2,22	0,31	2,53	1,11	0,16	1,27	0,020	0,047	0,111	0,004	0,012
2538/1-10	K-An	K	2,51	2,25	0,34	2,59	1,13	0,17	1,30	0,021	0,048	0,113	0,004	0,013

Tabelle 15: Messergebnisse der statistischen Auswertung Messreihe 2

Probe	Probenart	Aufgearbeitet als	Einwaage [g]	mg/kg Produkt			mg/l			Extinktionen bei				
				Chl a	Chl b	Chl ges	Chl a	Chl b	Chl ges	$\lambda = 630$ nm	$\lambda = 647$ nm	$\lambda = 664$ nm	$\lambda = 700$ nm	BLK
Clara	K-An	K	2,51	1,83	0,32	2,15	0,92	0,16	1,08	0,039	0,061	0,113	0,023	0,031
Clara I	K-An	K	2,51	1,84	0,28	2,12	0,92	0,14	1,06	0,022	0,043	0,096	0,006	0,014
Clara II	K-An	K	2,50	1,77	0,26	2,02	0,88	0,13	1,01	0,019	0,039	0,090	0,004	0,012
Clara III	K-An	K	2,50	1,86	0,31	2,17	0,93	0,15	1,09	0,018	0,041	0,094	0,004	0,011
Clara IV	K-An	K	2,50	1,85	0,29	2,15	0,93	0,15	1,07	0,020	0,042	0,095	0,005	0,013
Clara V	K-An	K	2,51	1,87	0,32	2,19	0,94	0,16	1,10	0,020	0,043	0,096	0,005	0,013
Clara VI	K-An	K	2,49	1,82	0,28	2,09	0,91	0,14	1,04	0,021	0,042	0,094	0,006	0,014
Clara VII	K-An	K	2,50	1,82	0,29	2,11	0,91	0,14	1,06	0,019	0,040	0,092	0,003	0,011
Clara VIII	K-An	K	2,51	1,78	0,42	2,20	0,89	0,21	1,10	0,025	0,050	0,098	0,011	0,018
Clara IIX	K-An	K	2,51	1,83	0,22	2,05	0,92	0,11	1,03	0,026	0,046	0,100	0,011	0,019