

Fluorimetrische Pigmentanalyse im Obst

Einflussfaktoren auf das Fluoreszenzsignal

Optische Methoden der Reflexionsspektroskopie werden in portablen Geräten und modernen Sortieranlagen bereits zur Beurteilung der Fruchtreife und der Qualität eingesetzt. Die Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht durch ihre erhöhte Sensitivität zudem die Bestimmung einzelner Fruchtinhaltsstoffe, die in sehr geringen Gehalten vorkommen. Die Anwendung in der Praxis ist bislang noch nicht möglich, da im Fruchtgewebe auftretende Reabsorptions- und Löschungseffekte die qualitative und quantitative Auswertung der Fluoreszenzsignale beeinflussen.

In der gartenbaulichen Forschung gewinnen Verfahren für eine zerstörungsfreie Produktüberwachung im Hinblick auf ein verbessertes Prozessmanagement in der Praxis zunehmend an Bedeutung. Optische Methoden wie die Reflexionsspektroskopie haben sich in den letzten Jahren als geeignete Methoden für die Bewertung quantitativer Veränderungen von Inhaltsstoffen einzelner Obst oder Gemüseprodukte während der Entwicklung in der Produktion und in Nachernteprozessen erwiesen [1]. Da sie eine schnelle und zerstörungsfreie Messung der Früchte ermöglichen, werden diese Methoden bereits in mobilen Systemen und Sortieranlagen zur Messung an den Pflanzen und in der Aufbereitung eingesetzt.

Die fluorimetrische Bestimmung zeichnet sich im Vergleich zu der fotometrischen Bestimmung von Absorptions- und Reflexionseigenschaften durch eine erhöhte Selektivität aus, da nicht alle organischen und anorganischen Verbindungen die Fähigkeit besitzen, die absorbierte Lichtenergie durch Strahlung (Fluoreszenzemission) wieder abzugeben [2]. Zusätzlich hat die Fluoreszenzspektroskopie den Vorteil, dass aufgrund der erhöhten Sensitivität auch sehr geringe Mengen an fluoreszierenden Fruchtinhaltsstoffen erfasst werden. Native Fluorophore sind beispielsweise einige sekundäre Pflanzenstoffe, die durch klinische Studien belegte ernährungsphysiologisch günstige Eigen-

schaften aufweisen. Die stark ausgeprägte Chlorophyll-Fluoreszenz wird vor allem zur Bestimmung der fotosynthetischen Aktivität im Pflanzenbestand eingesetzt.

Die quantitative Bestimmung einzelner, in geringen Gehalten vorkommender Inhaltsstoffe auf der Basis der emittierten Fluoreszenzsignale im Fruchtgewebe ist jedoch erschwert durch exogene Einflüsse und inter- und intramolekulare Wechselwirkungen. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Beurteilung von Reabsorptions- und Fluoreszenzlöschungseffekten Untersuchungen der Einflussfaktoren in Lösungen und an geschnittenen Früchten durchgeführt. Die Fluoreszenzspektren wurden im front-face-Modus mit Hilfe eines Spektrofluorimeters (Prototyp, SAFAS S.A., Monaco) bestehend aus einem Beleuchtungsmodul mit Xenon-Blitzlampe und Photomultiplier in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 700 nm gemessen. Mit dem Ziel einer praxistauglichen Korrektur der Daten hinsichtlich der Einflussfaktoren wurden zusätzlich Reflexionsspektren aufgezeichnet.

Komplexität der Einflussfaktoren

Obst- und Gemüseprodukte enthalten verschiedene autofluoreszierende Moleküle, wie beispielsweise Pigmente (Chlorophyll), Vitamine (Riboflavin, Tocopherol), NADPH oder phenolische Substanzen (Zimtsäurede-

Dr. Janina S. Wulf und PD Dr. habil. Manuela Zude sind Mitarbeiter der Abteilung „Technik im Gartenbau“ am Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam; e-mail: jwulf@atb-potsdam.de

Schlüsselwörter

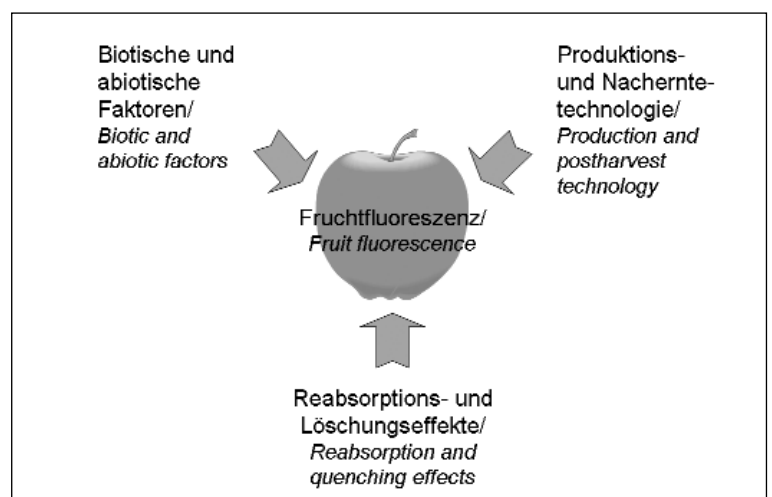
Fluoreszenz, Fruchtpigmente, Fluoreszenzlöschung, Reflexion

Keywords

Fluorescence, fruit pigments, fluorescence quenching, reflectance

Bild 1: Komplexität der Einflussfaktoren auf das in der Fruchtmatrix zu detektierende Fluoreszenzsignal

Fig. 1: Complexity of the factors influencing the fluorescence signal emitted from the fruit matrix



private) [3]. Die Zusammensetzung und der Gehalt der fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Fruchtinhaltsstoffe hängen sowohl von biotischen und abiotischen Faktoren in der Produktion als auch von den Bedingungen in den Nachernteprozessen ab (Bild 1).

Darüber hinaus kann es durch Wechselwirkung zwischen dem fluoreszierenden Molekül und weiteren Stoffen im Fruchtgewebe durch Filtereffekte oder Interaktion zwischen den Molekülen zu Veränderungen in der Fluoreszenzanregung und -emission kommen. Diese Effekte werden als Fluoreszenzlöschung oder Quenching bezeichnet. Die zu messende wellenlängenabhängige Fluoreszenzintensität entspricht in dem Fall dann nicht dem tatsächlichen Gehalt der Fluorophore, da die Anwesenheit der Quencher einen intensitätsmindernden Effekt auf das Fluoreszenzsignal ausübt.

Im einfachsten Fall, wenn nur ein einziger Inhaltsstoff vorliegt, kann auch die erhöhte Konzentration eines Fluorophors selbst in Lösung oder in der Frucht eine konzentrationsbedingte Fluoreszenzlöschung hervorrufen. In Vorversuchen wurden die relevanten Fruchtinhaltsstoffe (hier einzelne Phenole) in unterschiedlichen Konzentrationen in Lösung gemessen. Für die untersuchten Inhaltsstoffe lagen die in den Früchten vorkommenden Gehalte in einem Bereich, in dem die Intensität der Fluoreszenzemission linear mit der Konzentration anstieg. Somit eignet sich die Fluoreszenzspektroskopie in Hinblick auf die natürlich vorkommenden Gehalte sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe auch für die zerstörungsfreie Analyse bei Obst.

Darüber hinaus ist jedoch bei der Messung von Fluoreszenzspektren zu beachten, dass es bei komplexen Systemen wie Früchten zu den genannten konkurrierenden Filtereffekten der strahlungsabsorbierenden Moleküle kommen kann. Die Intensität der Fluoreszenzemission ist proportional zum Anregungslicht. Bei Absorption der eingestrahnten Lichtenergie durch andere Moleküle wird die Fluoreszenzintensität des untersuchten Inhaltsstoffes demnach reduziert. Des Weiteren kann auch emittierte Strahlung bereits im Fruchtgewebe reabsorbiert werden, bevor das Signal detektiert wird.

Der Einfluss von Reabsorptions- und Löschungseffekten tritt beispielsweise während der Verbräunungsreaktion von geschnittenem Apfelfruchtfleisch auf. Die Fluoreszenzemissionsspektren wurden am Fruchtfleisch direkt nach dem Schneiden und im Verlauf von 60 Minuten gemessen. Bild 2 zeigt eine Intensitätsabnahme der fluoreszierenden Inhaltsstoffe im blau-grünen Wellenlängenbereich (400 bis 550 nm) bedingt durch die Phenolabnahme. Gleichzeitig

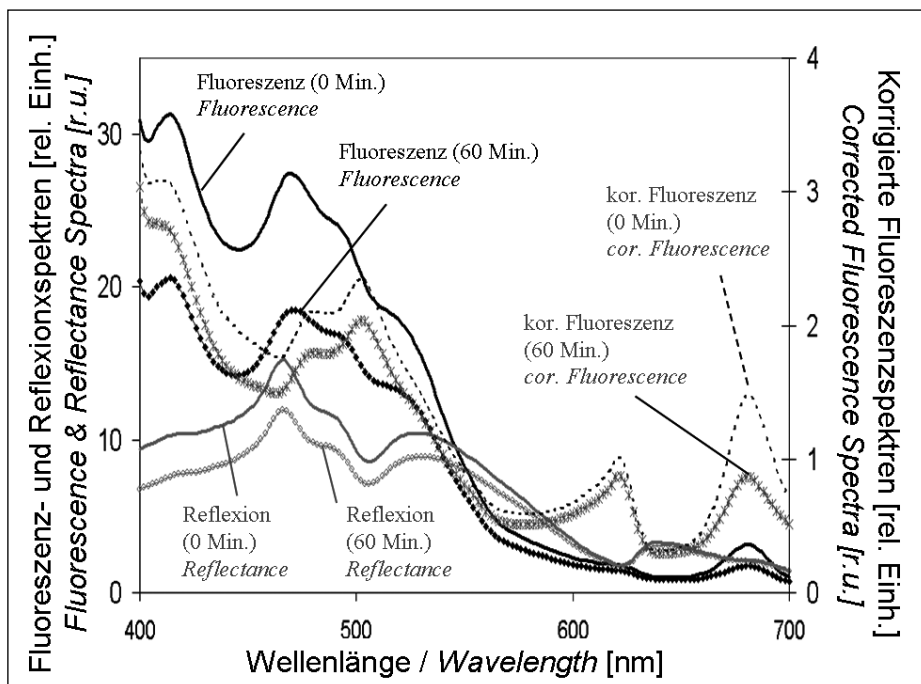


Bild 2: Fruchtspektren der Fluoreszenzemission, der diffusen Reflexion und der relativen Fluoreszenzemission gemessen am Fruchtgewebe direkt nach dem Schneiden des Apfels (0 Minuten) und 60 Minuten später

Fig. 2: Fruit fluorescence spectra, diffuse reflectance spectra, and relative fluorescence spectra measured on the fruit tissue, directly after cutting the apple (0 minutes) and 60 minutes later

sieht man eine in diesem Bereich abnehmende Reflexion durch die Absorption der neugebildeten braun gefärbten Polyphenole. Diese reabsorbieren die Fluoreszenzemission der ernährungsphysiologisch interessanten Phenole. Bildet man das Verhältnis zwischen der Fluoreszenz und der Reflexion, ergibt sich näherungsweise die tatsächliche Fluoreszenzemission. Diese zeigt nur eine verringerte Abnahme der Phenole im Vergleich zur scheinbaren Fluoreszenzintensität.

Im roten Wellenlängenbereich (um 680 nm) zeigt das Chlorophyll eine Fluoreszenzemission. Diese nimmt nach dem Schneiden bedingt durch oxidative Reaktionen ab. Nach der Korrektur mit der Reflexion wird deutlich, dass die tatsächliche Abnahme des Chlorophyllgehalts unterschätzt wird. Ursache dafür ist die Absorption der neugebildeten Polyphenole, die um das Anregungslicht mit den Chlorophyllen konkurrieren. Die scheinbare Fluoreszenzemission ist somit proportional verringert. Eine Unterscheidung beider Phänomene mit Hilfe von zusätzlich gemessenen Fruchtreflexionsspektren ist durch die relative Betrachtung der Fluoreszenzemission bezogen auf die Gewebereflexionswerte somit möglich.

Die bei der Verbräunung beschleunigt messbaren Effekte treten grundsätzlich auch in den komplex zusammengesetzten Früchten auf und erschweren die Analyse des scheinbaren Fluoreszenzsignals.

Ausblick

Die Bestimmung von sekundären, ernährungsphysiologisch wertvollen Inhaltsstoffen in Gartenbauprodukten mit der zerstörungsfreien Fluoreszenzanalyse ist durch die Komplexität der Fruchtmatrix erschwert, obwohl die Gehalte im Sensitivitätsbereich der Methode liegen. Mit parallel aufgezeichneten Reflexionsspektren so wie alternativ multivariaten numerischen Auswertungsmodellen könnte es zukünftig jedoch möglich sein, die Reabsorptions- und Löschungseffekte in der qualitativen und quantitativen Auswertung der Fluoreszenzsignale zu berücksichtigen. Die Fluoreszenzspektroskopie könnte somit im Hinblick auf einen höheren Gesundheitswert zur Prozessoptimierung von Obst und Gemüse eingesetzt werden.

Literatur

Bücher sind mit • gezeichnet

- [1] Zude, M.: Innovation: Mit optischer Sensorik zerstörungsfrei die Fruchtreife und -qualität entlang der Versorgungskette bestimmen. Fruchthandelsmagazin 6 (2005), S. 44-45
- [2] • Guilbault, G. G.: General Aspects of luminescence spectroscopy. In: Guilbault, G. G. (Hrsg.): Practical Fluorescence. 2. Auflage. Dekker-Verlag, New York, 1990, pp. 1-40
- [3] Buschmann, C., G. Langsdorf und H.K. Lichtenthaler: Imaging of the blue, green and red fluorescence emission of plants: An overview. Photosynthetica 38 (2000), no. 4, pp. 483-491