

Janina S. Wulf und Manuela Zude, Potsdam-Bornim, sowie Dieter Treutter und Susanne Rühmann, Freising

Messungenauigkeit bei der zerstörungsfreien Polyphenolbestimmung in Früchten

Die quantitative Bestimmung wertgebender Inhaltsstoffe in Früchten gewinnt aus Sicht der Verbraucher und Verarbeiter an Bedeutung. Die Fluoreszenzspektroskopie bietet potenziell die Möglichkeit beispielsweise Vitamine und Fruchtphenole auch in geringen Gehalten schnell und zerstörungsfrei zu erfassen. Für eine quantitative Bestimmung einzelner Fruchthaltstoffe auf der Basis der Fruchtfluoreszenzspektren eignen sich besonders multivariate Auswertungsmethoden für die Entwicklung von entsprechenden Kalibriermodellen. Dabei sind geeignete Datenvorverarbeitungsmethoden entscheidend, um auftretende Fluoreszenzlösungs- und Reabsorptionseffekte im Fruchtgewebe berücksichtigen zu können.

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
Dr. Susanne Rühmann und Prof. Dr. Dieter Treutter sind Mitarbeiter der Technischen Universität München, Fachgebiet Obstbau, Dürnast 2, 85350 Freising.

Schlüsselwörter

Fluoreszenz, Fruchtpigmente, Datenvorverarbeitung, Kalibrierung

Keywords

Fluorescence, fruit pigments, data pre-processing, calibration

Aufgrund des großen Verbraucherinteresses und aktueller Forschungsergebnisse zum engen Verhältnis zwischen Ernährung und Gesundheit, steigt die Nachfrage nach gesundheitsfördernden Nahrungsmitteln kontinuierlich an. Obst und Gemüse haben von Natur aus einen hohen Anteil an Vitaminen, Polyphenolen und weiteren Produkten des sekundären Pflanzenmetabolismus, die in klinischen Studien nachweislich zur gesunden Ernährung beitragen. Diese zumeist nur in geringen Gehalten auftretenden Inhaltsstoffe können zum derzeitigen Stand der Technik lediglich nach Extraktion mit Hilfe von optischen Methoden wie beispielsweise der Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden. Für eine quantitative Bestimmung sind hingegen sowohl exogen auf die Fruchtreifung einwirkende Faktoren und lagerungs- und verarbeitungsbedingte Veränderungen wie auch inter- und intramolekulare Einflüsse zu berücksichtigen.

Neben dem immer inhomogenen Probenmaterial, Lichtstreuungseffekten und Geräteungenauigkeiten führen auch durch weitere Inhaltsstoffe hervorgerufene Fluoreszenzlösungs- und Reabsorptionseffekte zu Varianzen in den Spektren und zu einer Veränderung des effektiven Fluoreszenzsignals [1]. Um Aussagen über ein bestimmtes Qualitätsmerkmal der Früchte aus dem spektralen Datensatz vornehmen zu können, werden in der Nahinfrarot-Spektroskopie bereits multivariate Auswerteverfahren eingesetzt, wobei in der Fluoreszenzspektroskopie aufgrund der hohen Sensitivität spezifischere Aussagen erwartet werden können [2]. Ziel ist es dabei, einen Zusammenhang zwischen unabhängigen (hier: spektralen) Mess-

größen und abhängigen Eigenschaften – beispielsweise der Inhaltsstoffgehalt in der Frucht – zu ermitteln. Die Kalibrierung soll es ermöglichen, anhand der gemessenen Fruchtspektren den Gehalt des untersuchten Fruchthaltstoffes vorherzusagen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fluoreszenzspektroskopie zur zerstörungsfreien Bestimmung von Fruchtphenolen am Beispiel der p-Cumaroyl-Glucose in Erdbeeren (*Fragaria x ananassa* 'Elsanta') eingesetzt. Ziel war die Prüfung geeigneter Signal- und Datenvorverarbeitungsmethoden, um das Fluoreszenzsignal des Fruchtgewebes für die quantitative Kalibrierung zu nutzen. Die Gehalte der einzelnen Phenole wurden mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie in den polaren Extrakten der Früchte ermittelt. Zur Identifizierung wurden die spezifischen Absorptionsspektren und Retentionszeiten mit denen von Phenolstandards verglichen. Die Erdbeer-Fluoreszenzspektren wurden zerstörungsfrei am Laserfluoroskop (LF 401, IOM GmbH, Berlin) bei einer Anregung mit 337 nm in einem Wellenlängenbereich von 400 bis 820 nm direkt an der Fruchtoberfläche aufgezeichnet.

Einsatz geeigneter Datenvorverarbeitungsmethoden

Die Kalibriermodelle wurden mit Hilfe der partial least squares (PLS) Regression erarbeitet. Signalvorverarbeitungsmethoden (etwa Glättung, Derivativbildung, Normierung) werden in der Fluoreszenzanalyse hauptsächlich zur Reduktion des Rauschens, zum Ausgleichen von Streu- und Basislinieneffekten oder zum Angleichen der Wer-

Tab. 1: Gehalte von p-Cumaroyl-Glucose und Anthocyanen gemessen in drei verschiedenen Reifestufen der Erdbeerfrüchte [mg/g Trockengewicht]

| Table 1: Contents of p-coumaroyl-glucose and anthocyanins measured in three ripeness stages of strawberry fruits [mg/g dry weight] | Phenole / phenols | unreif / unripe | reif / ripe | überreif / overripe |
|--|-------------------|-----------------|-------------|---------------------|
| p-Cumaroyl-Glucose / p-coumaroyl glucose | 0.211 | 0.212 | 0.346 | |
| Pelargonidin-glucosid / pelargonidin glucoside | 0.183 | 5.582 | 7.699 | |
| Pelargonidin-malonyl-glucosid / pelargonidin-malonyl glucoside | 0.203 | 0.574 | 0.855 | |

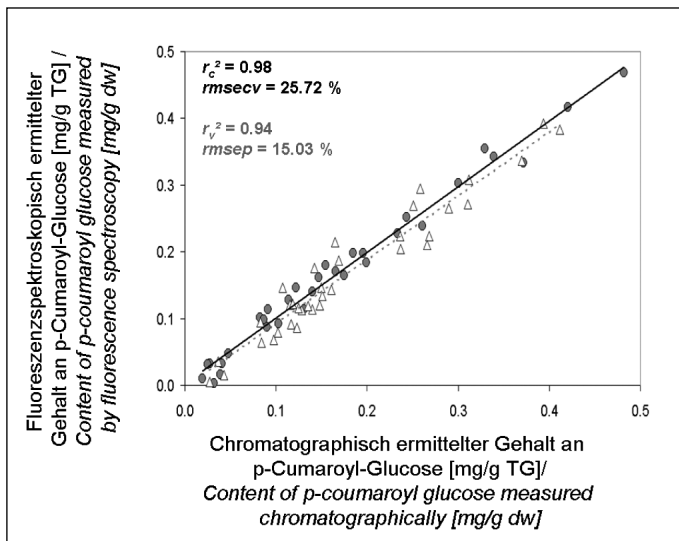


Fig. 1: Calibration model built on the spectral data of strawberry fluorescence and the fruit content of p-cumaroyl-glucose [mg/g dry weight] after pre-processing the fluorescence spectra by autoscaling and DOSC (o, gray) and validation on a independent dataset of fruit (Δ , white).

tigkeiten der Variablen eingesetzt. Die Informationen über den Phenolgehalt sind jedoch nicht in allen Wellenlängen der gemessenen Fruchtfluoreszenzspektren gleichermaßen enthalten und können zudem durch andere Signale überlagert werden. Der hier untersuchte Fruchtinhaltsstoff p-Cumaroyl-Glucose gehört zu den Hydroxyzimtsäuren, welche im blau-grünen Wellenlängenbereich fluoreszieren. In diesem Bereich absorbieren aber auch weitere Fruchtpigmente, beispielsweise die in den Erdbeeren enthaltenen Anthocyane, und üben somit einen maßgeblichen Einfluss auf das messbare Fluoreszenzsignal aus. Variationen in den Fluoreszenzspektren, die nicht mit den chromatographisch ermittelten Phenolgehalten korreliert waren, wurden versuchsweise herausgerechnet. Die Komplexität des Datensatzes wurde folglich reduziert, indem die unerwünschte Varianz minimiert wurde, um somit die inhaltsstoffbedingten Unterschiede der Probenfluoreszenz zu betonen.

Die Qualität eines Modells wird durch sein Bestimmtheitsmaß (r^2_c) für den Kalibrierdatensatz, die benötigte Anzahl latenter Variablen (LV) und den Kalibrierfehler (rmsec) bestimmt. Die optimale Anzahl an LV wurde mit dem Fehler in der Kreuzvalidierung (rmsecv) oder dem Fehler in der Validierung (rmsep) bestimmt. Der rmsep stellt dabei den zuverlässigeren Parameter für die Bestimmung des Vorhersagefehlers dar, da das erarbeitete Kalibriermodell auf einem unabhängigen Datensatz (Test-Set) getestet wird. Aus Kosten- und Zeitgründen oder aus Mangel an verfügbaren saisonalen Produkten wird jedoch in der gartenbaulichen Praxis meist zugunsten der Kreuzvalidierung darauf verzichtet.

Die Fluoreszenzspektren und Polyphenolgehalte wurden an Erdbeeren drei verschiedener Reifestufen ($n = 32$) bestimmt. Die grünlich-weißen Beeren wurden der Gruppe „unreif“ zugeordnet, in die Gruppe der „reifen“ Beeren wurden die hellroten Früchte mit weißer Spitze und zu den „überreifen“ die dunkelroten Früchte sortiert. Ein Einfluss der Fruchthanthocyane, der bereits visuell sichtbar war, auf die gemessenen Fluoreszenzintensitäten durch Löschungseffekte kann daher angenommen werden. In der chromatographischen Analyse wurde festgestellt, dass die Früchte der ersten Reifestufe im Vergleich zu den anderen beiden einen geringeren Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose aufweisen (Tab. 1). Die Früchte der zweiten und dritten Reifestufe unterschieden sich nicht signifikant. Hingegen nahm der Gehalt an Anthocyanen (hier beispielhaft dargestellt als Pelargonidin-glucosid und Pelargonidin-malonyl-glucosid) mit zunehmender Reife zu.

Die verschiedenen Signalvorverarbeitungsmethoden führten bei der Kalibrierung auf p-Cumaroyl-Glucose zu hohen Fehlern in der Kreuzvalidierung und zu geringen Bestimmtheitsmaßen, da sie nur bedingt die variierenden inter- und intramolekularen Wechselwirkungen auf das zu messende Fluoreszenzsignal berücksichtigen können. Um die Fluoreszenzlöschungs- und Reabsorptionseffekte, die die fluorimetrische Detektion des Gehalts an p-Cumaroyl-Glucose beeinflussen können, aus den spektralen Daten zu entfernen, wurde als Datenvorverarbeitungsmethode die direkte orthogonale Signalkorrektur (DOSC) angewandt.

DOSC wird als Filter gegen stark strukturierte Variationen in der spektralen Datenmatrix eingesetzt, um insbesondere hinsicht-

lich probenmaterialbezogenen Eigenschaften zu korrigieren [3]. Die für den Phenolgehalt nicht relevanten Informationen wurden dabei mit Hilfe errechneter DOSC-Faktoren von der spektralen Datenmatrix abgezogen.

Die lineare PLS Regression auf normierten Fruchtfluoreszenzspektren und dem Gehalt an p-Cumaroyl-Glucose führte nach Abzug von zwei DOSC-Faktoren aus der spektralen Datenmatrix zu einem weniger komplexen und robusteren Kalibriermodell ($r^2_c = 0,98$, $rmsecv = 25,72\%$) (Bild 1). Für die Validierung des Modells wurde ein unabhängiger Datensatz von Erdbeerfrüchten ($n = 35$), die zu einem späteren Zeitpunkt im selben Gewächshaus geerntet wurden, mit den gleichen Signal- und Datenverarbeitungsmethoden korrigiert. Hierbei konnte ein verringerter Fehler ($rmsep = 15,03\%$) für die zerstörungsfreie Bestimmung des Gehalts an p-Cumaroyl-Glucose in Erdbeeren erreicht werden.

In der Fluoreszenzspektroskopie werden die Spektren zumeist mit Hilfe von zeitgleich aufgezeichneten Reflexionsspektren hinsichtlich variierender Absorptionseigenschaften des Gewebes korrigiert. Eine zusätzliche Korrektur mit Hilfe der Intensitäten der Reflexionsspektren führte jedoch zu weniger robusten Kalibriermodellen, da nicht ausschließlich Reabsorptionen, sondern auch andere Quenching-Effekte auftreten.

Schlussfolgerung

Die Fluoreszenzspektroskopie bietet die Möglichkeit, wertgebende Fruchtinhaltsstoffe zerstörungsfrei quantitativ zu erfassen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass geeignete Datenverarbeitungsmethoden ausgewählt werden müssen, um neben gerätebedingten Einflüssen auf die Detektion des Fluoreszenzsignals auch Fluoreszenzlöschungs- und Reabsorptionseffekte berücksichtigen zu können. Insbesondere DOSC eignet sich dafür, die für die Vorhersage der Fruchtinhaltsstoffe nicht relevanten Daten aus der spektralen Matrix zu entfernen.

Literatur

- [1] Wulf, J. S., und M. Zude: Fluorimetrische Pigmentanalyse im Obst – Einflussfaktoren auf das Fluoreszenzsignal. Landtechnik 63 (2008), H. 1, S. 24-25
- [2] Geladi, P.: Some recent trends in the calibration literature. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 60 (2002), p. 211-224
- [3] Westerhuis, J. A., S. De Jong and A. K. Smilde: Direct Orthogonal Signal Correction. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 56 (2001), p. 13-25