

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**UNTERSUCHUNG DES CAROTINOIDGEHALTES VON
LEBENSMITTELN DURCH HPLC ANALYSE**

Verfasserin

Ingeborg Pühringer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Ernährungswissenschaften

Betreuer: PD Dr. Matthias Schreiner

“Success is not final, failure is not fatal, it is the courage to continue that counts.”

Winston Churchill

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz besonders bei PD Dr. Matthias Schreiner für die zur Verfügungstellung des Themas und die fachliche und freundliche Betreuung bei der Durchführung der Arbeit bedanken.

Weiters möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Labors des Departments für Lebensmittelchemie der Universität für Bodenkultur und ganz besonders bei Iris und Nicole für die freundliche Hilfe während meiner Arbeit bedanken.

Ebenfalls gilt mein Dank meinen Studienkolleginnen Eda, Monika, Yesim und Derya für ihre Zusammenarbeit mit mir und dass sie mir bei dieser Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und auch emotional eine große Hilfe waren.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern und Großeltern für die finanzielle und emotionale Unterstützung meines Studiums und all meinen Freunden und Bekannten die mir während dieser Zeit zur Seite gestanden haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	1
2. Literaturüberblick	2
2.1. Die Tomate.....	2
2.2. Carotinoide allgemein.....	3
2.3. Carotinoide in Nahrungsmitteln.....	8
2.4. Carotinoide im menschlichen Körper.....	15
2.5. Analyse von Carotinoiden.....	18
2.5.1 Probenentnahme, Probenvorbereitung und Extraktion.....	19
2.5.2 Verseifung und Neutralisation.....	20
2.5.3 Konzentrierung der Lösung.....	20
2.5.4 Chromatographische Trennung, Identifikation und Quantifikation.....	21
2.5.5. Aufbau eines HPLC-Systems.....	22
2.5.6. RP-HPLC.....	24
2.5.7 Do's und Don'ts bei der Carotinoid-Analyse.....	24
3. Material und Methoden	27
3.1. Verwendete Produkte (Proben).....	27
3.2. Bestimmung des Carotinoidgehaltes.....	28
3.2.1. Geräte.....	28
3.2.2. Labormaterialien.....	28
3.2.3. Reagenzien.....	29
3.2.4. HPLC-Untersuchungsmethode.....	30
3.2.5. Laufmitteloptimierung.....	31
3.2.6. Erstellung der β -Carotin Eichgeraden.....	36
3.3. Herstellung der verwendeten Lösungen und Laufmittel.....	39
3.3.1. Extraktionslösung für Tomaten.....	39
3.3.2. Laufmittel (mobile Phase) der HPLC.....	39
3.4. Probenaufbereitung.....	39
3.4.1. Extraktion des Fischöls und des Eieröls.....	39
3.4.2. Verseifung.....	40
3.5. Dünnschichtchromatographie.....	41
3.5.1. Herstellung des Tomatenextraktes und Laufmittel.....	41
3.5.2. Durchführung.....	42
3.5.3. Berechnung der R _f -Werte.....	42
3.6. Tomaten.....	43
3.6.1. Trockenmassebestimmung.....	43
3.6.1.1. Durchführung.....	43
3.6.1.2. Auswertung.....	43
3.6.2. Tomatenextrakte der frischen Tomaten.....	44
3.6.3. Tomatenextrakte der gekochten Tomaten.....	45
3.6.4. Tomatenextrakte der Tomatenprodukte.....	46
3.6.4.1. Durchführung geschälte Tomaten.....	47
3.6.4.2. Durchführung Tomatenmark.....	47
3.6.4.3. Durchführung Napoli Sauce und Tomatencremesuppe.....	48

3.6.4.3.1. Verseifung von Probe 6 und 7.....	48
3.6.4.3.2. Bearbeitung der unteren Verseifungsphase.....	49
3.7. Kalibration des Lycopins.....	51
3.7.1. Präperative Aufreinigung.....	51
3.7.2. Berechnung der Konzentration	53
3.7.3. Berechnung der Lycopin-Konzentration	54
3.7.3.1. Berechnung des Responsefaktors für Lycopin.....	54
4. Ergebnisse und Diskussion.....	57
4.1. Ergebnisse der Lachs- und Ei-Analyse.....	57
4.2. Dünnschichtchromatographie.....	59
4.2.1. Dünnschichtchromatographie Platte.....	59
4.3. Ergebnisse Tomaten.....	63
4.3.1. Ergebnisse Trockenmasse.....	63
4.3.2. Ergebnisse frische Tomaten.....	64
4.3.3. Ergebnisse gekochte Tomaten.....	68
4.3.4. Ergebnisse der Tomatenprodukte.....	71
4.4. Ergebnisse zusammengefasst.....	77
5. Schlussbetrachtung.....	78
6. Zusammenfassung.....	81
7. Summary.....	83
8. Literaturverzeichnis.....	85
9. Anhang.....	89
Lebenslauf.....	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Absorptionsmaxima einiger Carotinoide in Petrolether	5
Tabelle 2: Carotenoidgehalt von Glashaustomaten	14
Tabelle 3: Bezugsquellen der untersuchten Produkte.....	27
Tabelle 4: Reagentien für die Probenaufbereitung.....	29
Tabelle 5: Reagentien für die HPLC-Analyse.....	30
Tabelle 6: HPLC System für die Carotenoidanalyse.....	30
Tabelle 7: Verdünnungsreihe des β -Carotin-Standards.....	36
Tabelle 8: Herstellungsschritte von Lachs- und Eieröl.....	39
Tabelle 9: Behandlungsschritte von Lachs- und Eieröl.....	40
Tabelle 10: Verseifungsschritte	49
Tabelle 11: Bearbeitungsschritte der unteren Verseifungsphase.....	50
Tabelle 12: Retentionszeiten und Peakfläche von Lycopin und β -Carotin.....	55
Tabelle 13: Ergebnisse Dünnschichtchromatographie.....	60
Tabelle 14: Trockenmasse Tomaten in %.....	64
Tabelle 15: Carotenoidgehalte der Tomaten.....	67
Tabelle 16: Carotenoidgehalte der gekochten Tomaten.....	70
Tabelle 17: Carotenoidgehalte der Tomatenprodukte.....	74
Tabelle 18: Tomatenproben Peaks.....	77

Abkürzungsverzeichnis

HPLC...High Pressure Liquid Chromatography...Hochdruckflüssigchromatographie

RP...Reversed Phase...Umkehrphasen

AcN... Acetonitril

MeOH... Methanol

DC...Dünnschichtchromatographie

LM...Lösungsmittel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sichtbares Absorbtionsspektrum von Lycopin, γ -Carotin, β -Carotin und α -Carotin	4
Abbildung 2: HPLC-Chromatogramm der Tomaten-Carotinoide	6
Abbildung 3: Stufen der Carotinoid Biosynthese und mögliche Transformationen durch Reaktionen.....	7
Abbildung 4 : Strukturformel des β -Carotins	8
Abbildung 5: Absorbtionpektrum des β -Carotins.....	8
Abbildung 6: Strukturformel des Lycopins	9
Abbildung 7: Absorbtionsspektrum des Lycopins	9
Abbildung 8: Strukturformel des Luteins.....	10
Abbildung 9: Absorbtionpektrum des Luteins	10
Abbildung 10: Strukturformel des Zeaxanthins	11
Abbildung 11: Absorbtionpektrum des Zeaxanthins.....	11
Abbildung 12: Strukturformel des Astaxanthins.....	12
Abbildung 13: Absorbtionpektrum des Astaxanthins	12
Abbildung 14: Strukturformel von <i>all-trans</i> -Retinol	15
Abbildung 15: Strukturformel von α - und γ -Carotin	16
Abbildung 16: Lycopin-Aufnahme durch verschiedene Tomatenprodukte in Frankreich 2001	17
Abbildung 17: Beitrag verschiedener Carotinoide in % zur Gesamtcarotinoidaufnahme in Deutschland 2005.....	18
Abbildung 18: Schematischer Aufbau einer HPLC-Apperatur für isokratische Arbeitsweise	23
Abbildung 19: Verwendete HPLC-Anlage.....	30
Abbildung 20: HPLC-Chromatogramm: Karottenextrakt in Laufmittelmischungen von 50% Acetonitril mit 50% Mischungen aus Methanol/ Dichlormethan	33
Abbildung 21: HPLC-Chromatogramm: Karottenextrakt in Laufmittelmischungen von 70% Acetonitril mit 30% Mischungen aus Methanol/ Dichlormethan	34
Abbildung 22: HPLC-Chromatogramm: Karottenextrakt in Laufmittelmischungen von 70% Acetonitril mit 30% Mischungen aus Methanol/ Dichlormethan bzw. reines Methanol	35
Abbildung 23: HPLC-Chromatogramme des β -Carotin Standards.....	37
Abbildung 24: HPLC-Chromatogramme des β -Carotin Standards einzeln.....	38
Abbildung 25: β -Carotin Kalibrationsgerade.....	38
Abbildung 26: Verwendete Tomaten.....	44
Abbildung 27: Verwendete Tomatenprodukte.....	46
Abbildung 28: Phasentrennung nach Verseifung der Probe 6 und 7.....	49
Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm des Lycopins	52
Abbildung 30: Absorbtionsspektrum des Lycopins.....	52

Abbildung 31: HPLC-Chromatogramm der Lösung: Lycopin Peak (1) und β -Carotin Peak (2)	54
Abbildung 32: Lachsöl und Eieröl vor der Verseifung.....	57
Abbildung 33: Lachsöl und Eieröl nach der Verseifung.....	57
Abbildung 34: HPLC-Trennung der oberen Phase der Verseifung von Lachs- und Eieröl -Lösungsmittel Hexan.....	58
Abbildung 35: HPLC-Trennung der oberen und unteren Eieröl-Verseifungsphase - Lösungsmittel Hexan.....	59
Abbildung 36: Dünnschichtchromatographieplatte	59
Abbildung 37: HPLC-Trennung der DC-Bande T1.....	61
Abbildung 38: HPLC-Trennung der DC-Bande T2.....	61
Abbildung 39: HPLC-Trennung der DC-Bande T3.....	62
Abbildung 40: HPLC-Trennung der DC-Bande T4.....	62
Abbildung 41: Bande HPLC-Trennung der DC-T5.....	63
Abbildung 42: HPLC-Chromatogramm der Pannonischen Kirschtomaten	64
Abbildung 43: Peak Nr. 2 (Lycopin) vergrößert.....	65
Abbildung 44: HPLC-Chromatogramm der Pannonischen Kirschtomaten mit PDA-Detektor	65
Abbildung 45: HPLC-Chromatogramm der Pannonischen Tomaten	66
Abbildung 46: HPLC-Chromatogramm der Paradeiser	66
Abbildung 47 : Lycopingehalte der Tomaten.....	67
Abbildung 48: HPLC-Chromatogramm der Pannonischen Kirschtomaten gekocht.....	68
Abbildung 49: HPLC-Chromatogramm der Pannonischen Tomaten gekocht	69
Abbildung 50: HPLC-Chromatogramm der Paradeiser gekocht	69
Abbildung 51: Lycopingehalte der gekochten Tomaten.....	70
Abbildung 52: HPLC-Chromatogramm der geschälten Tomaten	71
Abbildung 53: HPLC-Chromatogramm des Tomatenmarks	72
Abbildung 54: HPLC-Chromatogramm der Napoli Sauce	72
Abbildung 55: Peak Nr. 2 (Lycopin) vergrößert.....	73
Abbildung 56: HPLC-Chromatogramm der Tomatencreme Suppe	73
Abbildung 57: Lycopingehalte der Tomatenprodukte.....	74
Abbildung 58 : Lycopingehalte der Tomatenprodukte ohne Tomatenmark.....	75
Abbildung 59: Lycopingehalte der Proben gesamt.....	76
Abbildung 60: β -Carotingehalte der Proben gesamt.....	76

1. Einleitung und Fragestellung

Carotinoide sind ernährungsphysiologisch bedeutende Bestandteile unserer Ernährung und haben darüberhinaus weitreichende Bedeutung bei der Haltbarkeit und beim Aussehen von Produkten sowie als Vorstufe von Aromastoffen. So bilden Carotinoide beispielsweise einen großen Teil der Farbstoffe in Pflanzen und auch als essentielle Stoffe spielen sie eine wichtige Rolle z.B. als Provitamin A oder als Antioxidantien. Carotinoide können nur von Pflanzen und wenigen anderen Organismen gebildet werden und müssen vom Mensch daher mit der Nahrung zugeführt werden [STAHL und SIES, 2005].

Ihr Vorkommen in Art und Menge hängt von vielen verschiedenen Faktoren u.a. von der Verarbeitung des Produktes ab, da Carotinoide anfällig für Isomerisierung und Oxidation sind. Das wohl bekannteste Carotinoid ist β -Carotin, das sowohl in Karotten, Mangos und vielen anderen Früchten vorkommt. Auch in Tomaten stellt es neben Lycopin ein wichtiges Carotinoid dar [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]. Der empfohlene tägliche Bedarf von β -Carotin liegt bei 2-4 mg/Tag [ELMADFA, 2004].

Tomaten werden sowohl in Österreich als auch in vielen anderen Ländern roh verzehrt oder zu vielen verschiedenen Produkten wie z.B. Tomatenmark, Ketchup u.v.m. weiter verarbeitet. Obwohl es Tomaten in vielen verschiedenen Formen und Farben gibt sind die gängigsten immer noch die roten Tomaten, in denen Lycopin das farbgebende Carotinoid darstellt.

Bei dieser Arbeit wurden die Lycopin- und β -Carotingehalte von sowohl rohen als auch gekochten und verarbeiteten Tomaten gemessen und verglichen.

Da der Erwerb von Carotinoid-Standards sehr kostspielig ist, wurde zudem nach einer Methode gesucht, um verlässlich quantitativ von dem wesentlich preisgünstigeren β -Carotin Standard auf die Lycopin-Konzentration schließen zu können.

2. Literaturüberblick

2.1. Die Tomate

Die Tomate gehört zur Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceen). Ihr systematischer Name ist *Solanum lycopersicum* [LEHMANN, 1953].

Die Tomate ist eine aus Amerika in 16. Jahrhundert eingeführte Pflanze, die zuerst als giftig angesehen wurde. Auch als „Liebesapfel“ bezeichnet wurde sie hauptsächlich als Kuriosum und Zierpflanze gehalten [LEHMANN, 1953].

Der Name Tomate wurde erst später gebräuchlich und leitet sich vom mexikanischen Wort „tomana“ (= wachsen) ab während der Name Paradeiser auf den früher ebenfalls gebräuchlichen Namen „Paradiesapfel“ zurückzuführen ist.

Erst Ende des 18. Jahrhunderts wurde die Tomate als Nahrungsmittel bekannt und fand eine schnelle Verbreitung [LEHMANN, 1953].

Heute gibt es Tomaten in vielen verschiedenen Formen und Farbgebungen wie z.B. gelbe oder weiße Tomaten bei uns wobei jedoch hauptsächlich die rote Tomate große Verbreitung findet. Diese wird sowohl kleingärtnerisch als auch im industriellen Rahmen für viele Produkte verwendet [LEHMANN, 1953].

In Europa und Amerika wird ein großer Teil des aufgenommenen Carotinoids Lycopin durch Tomaten und Tomatenprodukte zugeführt. In diesen Produkten kommt Lycopin in Form von *all-trans* und *cis*-Isomeren in roten Tomaten vor. Diese enthalten für gewöhnlich 94-96% *all-trans* Lycopin, das die thermodynamisch stabilste Form darstellt. Daher ist Lycopin in Tomaten und deren Produkten sehr stabil gegen die Hitzebehandlung bei der Verarbeitung [ROCKENDRA et al., 2010]. Zudem stellen Carotinoide gute Antioxidantien dar [MAIANI et al., 2009].

Der Verzehr von Tomaten und Tomatenprodukten hat somit in der Ernährung auch einen wesentlichen Anteil an der Carotinoidaufnahme. Carotinoide stehen auch im Ruf das Risiko verschiedener Krebsarten, Arteriosklerose und kardiovaskulärer Erkrankungen zu senken [SVELANDER et al., 2010].

In unzerstörten Tomatenzellen kommt Lycopin in kristalliner Form innerhalb der Thylakoidmembran in den Chromoplasten, eingekapselt in den Zellenkompartimenten, vor. Daher ist die Aufnahme von Lycopin in den Körper aus rohen Tomaten niedrig. Die Bioverfügbarkeit wird durch die Zerstörung der Zellmatrix durch mechanische oder thermische Prozesse deutlich erhöht [SVELANDER et al., 2010].

Die Aufnahme von Lycopin und β -Carotin wird auch durch den hohen Pektinanteil der Tomatenzellwände beeinflusst, der bis zu einem Drittel der Zellwand beträgt und die Verfügbarkeit senkt [SVELANDER et al., 2010].

2.2. Carotinoide allgemein

Carotinoide sind eine Substanzklasse von Stoffen, die sehr häufig in pflanzlichen Lebensmitteln aber auch in anderen Naturstoffen vorkommen. Bisher sind etwa 750 natürlich vorkommende Carotinoide bekannt [BRITTON et al., 2004].

Sie sind normalerweise Tetraterpenoide (C₄₀), die aus acht Isoprenideinheiten (C₅) aufgebaut sind und an einem oder an beiden Enden eine Ringbildung aufweisen können. Außer der Ringbildung kann das lineare Basisskelett auch noch durch Hydrierung, Wanderung der Doppelbindung oder einer Kombination dieser Prozesse verändert werden. Dies resultiert in einer Vielzahl möglicher Strukturen [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Charakteristisch für Carotinoide ist das ausgedehnte konjugierte Doppelbindungssystem, das die Absorption im sichtbaren Bereich bewirkt und somit für die gelbe, orange oder rote Farbe verantwortlich ist, die viele Nahrungsmittel aufweisen, die Carotinoide enthalten [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Carotinoide besitzen ein charakteristisches Absorptionsspektrum anhand dessen sie identifiziert werden können. Das Absorptionsspektrum der Carotinoide ist meist durch 3 Maxima im Bereich 400-350 nm charakterisiert. Chemische Veränderungen wie z.B. Oxidation führen zu einer messbaren Veränderung der UV-Spektren [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Je mehr konjugierte Doppelbindungen das Carotinoid dabei aufweist, desto höher liegt das Absorptionsmaximum. Ab 7 konjugierten Doppelbindungen kommt es zu einer

Absorption im Bereich des sichtbaren Lichtes. Lycopin weist 11 konjugierte Doppelbindungen auf, ist daher rot gefärbt und absorbiert bei den Wellenlängen 444 nm, 470 nm und 502 nm [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Die Absorptionsmaxima sind auch wesentlich vom Lösungsmittel abhängig. Dies ist besonders in der HPLC mit Diodenarray Detektor wichtig, da dort Lösungsmittelgemische zum Einsatz kommen und sich die Maxima dadurch verändern z.B. eine Verschiebung von 10-20nm in Dichlormethan während die Maxima für Methanol und Acetonitril mit denen in Petrolether übereinstimmen [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Der molare Extinktionskoeffizient von Lycopin in Petrolether beträgt bei 470 nm: 3450 [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]

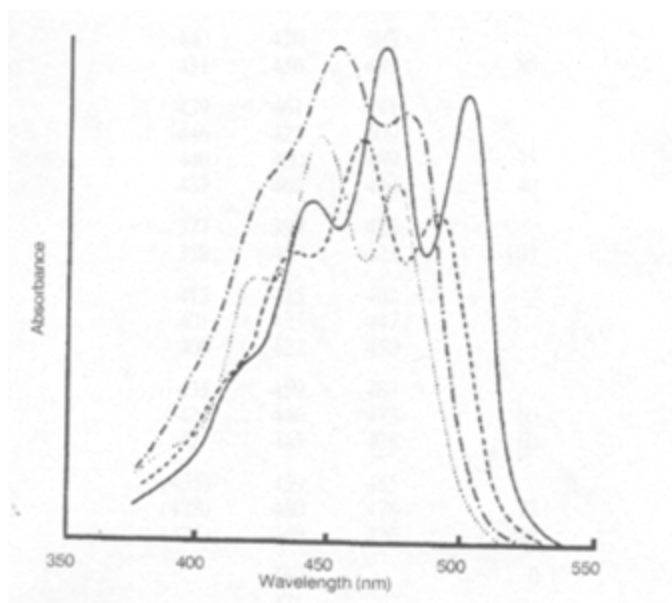


Abbildung 1: Sichtbares Absorptionsspektrum von Lycopin (___), γ -Carotin (---), β -Carotin (-.-.-) und α -Carotin (...) in Petroleumether [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]

Tabelle 1: Absorptionsmaxima einiger Carotinoide in Petrolether [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]

Carotinoid	Absorptionsmaxima in nm		
β -Carotin	(425)	450	477
Astaxanthin		468	
Lutein	421	445	474
Lycopin	444	470	502

Carotinoide, welche nur aus Kohlenstoff und Wasserstoff bestehen, werden als Carotine bezeichnet, jene, die zusätzlich Sauerstoff enthalten, als Xanthophylle.

Die meisten Carotinoide kommen in der stabileren *all-trans* Form vor. Es gibt jedoch auch *cis*-Isomere [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

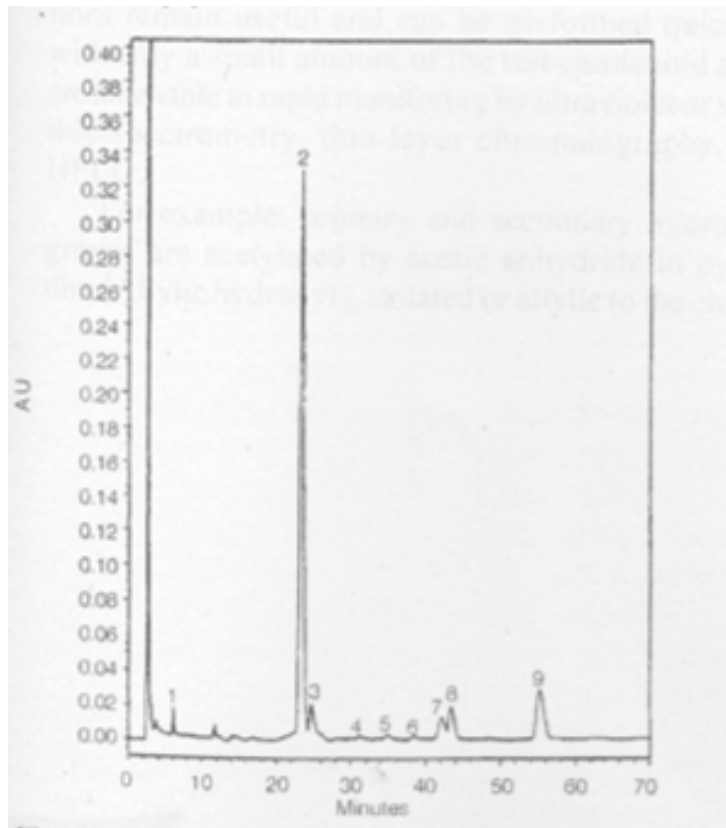


Abbildung 2: HPLC-Chromatogramm der Tomaten-Carotinoide im Laufmittel Acetonitril-Methanol-Ethylacetat (73:20:7); 2) Lycopin, 7) β -Carotin [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]

Mit wenigen Ausnahmen sind Carotinoide vor allem fettlöslich. Das bedeutet, dass sie sich in Wasser nicht lösen, jedoch in organischen Lösungsmitteln wie z.B. Aceton oder Chloroform. Carotine lösen sich leicht in Petrolether und Hexan, während Xanthophylle sich leichter in Methanol lösen [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Carotinoide können in der Regel nur von Pflanzen und anderen zur Photosynthese fähigen Organismen synthetisiert werden [STAHL und SIES, 2005]. Die Zusammensetzung enthält daher in allen diesen Organismen auch Vorstufen und andere Derivate der Hauptkomponenten von Carotinoiden.

Die in Tieren vorkommenden Carotinoide werden zuvor mit der Nahrung aufgenommen und akkumuliert. Dies geschieht entweder ohne vorhergehende Umwandlung oder in umgewandelter Form, womit sie zu typischen Tier-Carotinoiden werden können [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]. Auch dort sind sie wesentlicher

Bestandteil der Färbung z.B. von Vögeln, Insekten, Fischen und Krustentieren [STAHL und SIES, 2005].

In Pflanzenzellen werden die Carotinoide hauptsächlich in Plasmavakuolen gespeichert [MAIANI et al., 2009]. Außerdem können sie in Membranen und anderen lipophilen Kompartimenten angereichert werden. Sie spielen dort eine wichtige Rolle beim Schutz der Pflanze vor photooxidativen Schäden [STAHL und SIES, 2005].

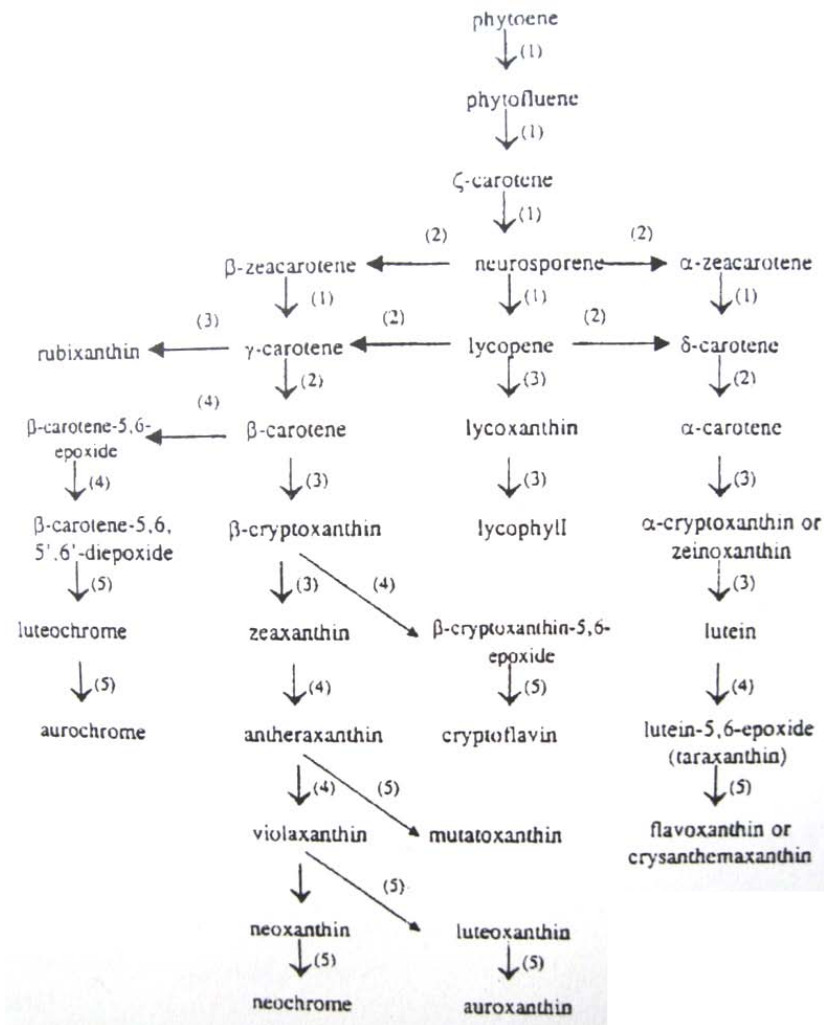


Abbildung 3: Stufen der Carotinoid-Biosynthese und mögliche Transformationen durch Reaktionen: 1) Desaturierung; 2) Zyklisierung; 3) Hydroxylierung; 4) Epoxidation; 5) Epoxid-Furanosid Umlagerung [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]

2.3. Carotinoide in Nahrungsmitteln

Das bekannteste Carotinoid ist wohl β -Carotin. Dieses bicyclische Carotin ist eines der am häufigsten in Nahrungsmitteln vorkommenden, entweder als Haupt- oder als Nebenkomponekte und stellt auch ein wichtiges Provitamin A dar [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

β -Carotin reiche Lebensmittel sind z.B. Karotten und Mangos, wobei Karotten, die vor allem β -Carotin und α -Carotin enthalten, neben Süßkartoffeln eine der wenigen carotinoidhaltigen Wurzelgemüsen darstellen [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

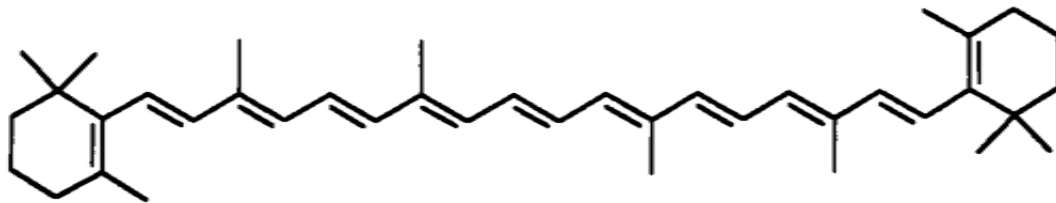


Abbildung 4 : Strukturformel des β -Carotins [BRITTON et al., 2004]

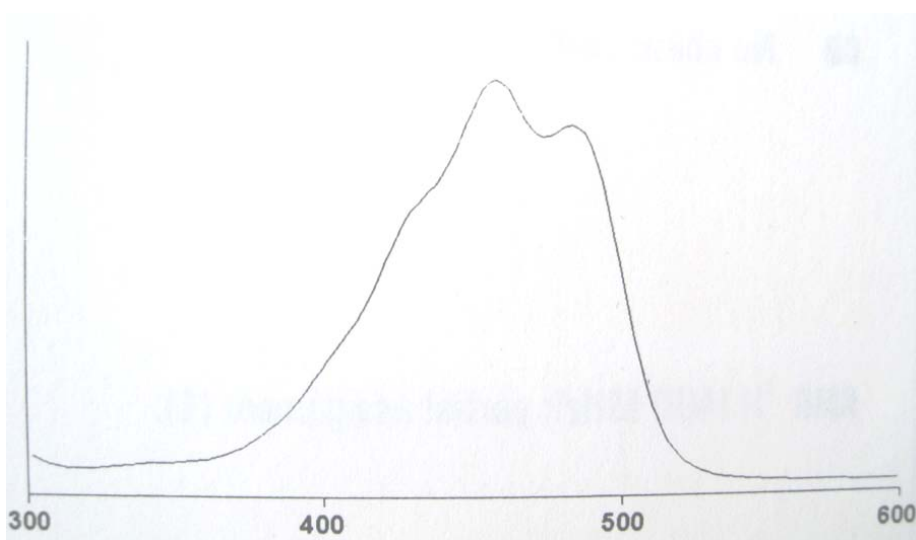


Abbildung 5: Absorbtionsspektrum des β -Carotins in Petrolether [BRITTON et al., 2004]

Ein anderes carotinoidreiches Lebensmittel ist die Tomate. Hier ist es allerdings das acyclische Lycopin, welches die Hauptkomponente darstellt. Lycopin zeigt sich hier wie auch bei Wassermelonen oder vielen anderen rot gefärbten Früchten und Gemüsen für die rote Farbe verantwortlich. In Tomaten finden sich außerdem noch Spuren von Lycopinderivaten nämlich Lycoxanthin und Lycophyll [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

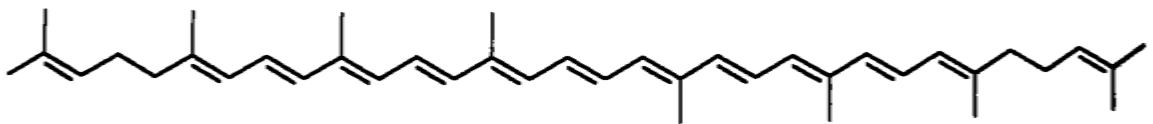


Abbildung 6: Strukturformel des Lycopins [BRITTON et al., 2004]

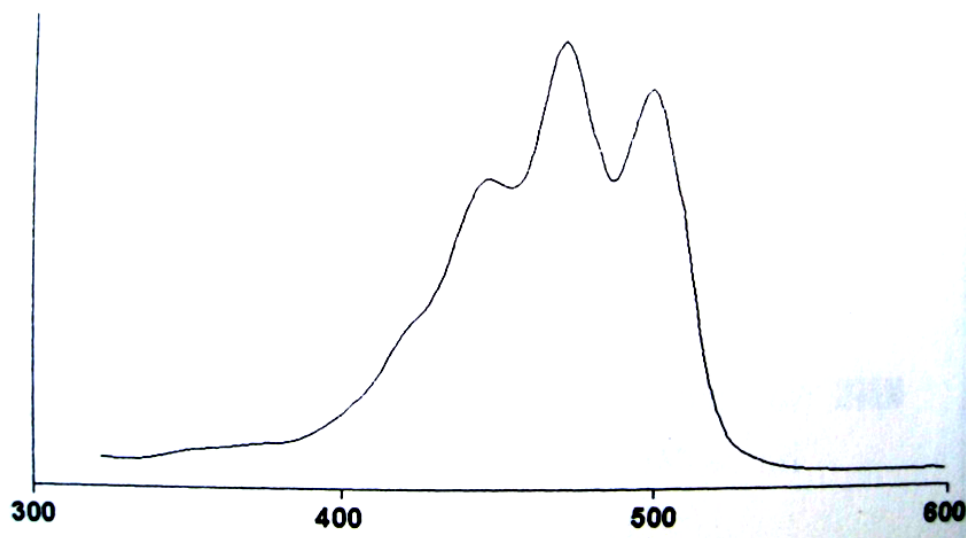


Abbildung 7: Absorbtionsspektrum des Lycopins in Petrolether [BRITTON et al., 2004]

In Blättern, grünen Gemüsen und gelben Blumen ist jedoch Lutein das vorherrschende Carotinoid. Es kommt dort in wesentlich höheren Konzentrationen vor als Zeaxanthin, ein Carotinoid, welches das Hauptcarotinoid in Mais darstellt [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

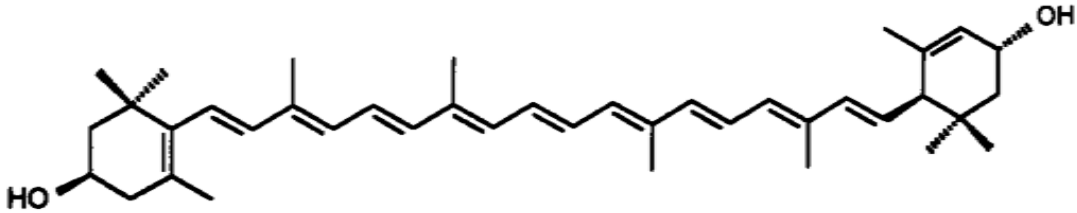


Abbildung 8: Strukturformel des Luteins [BRITTON et al., 2004]

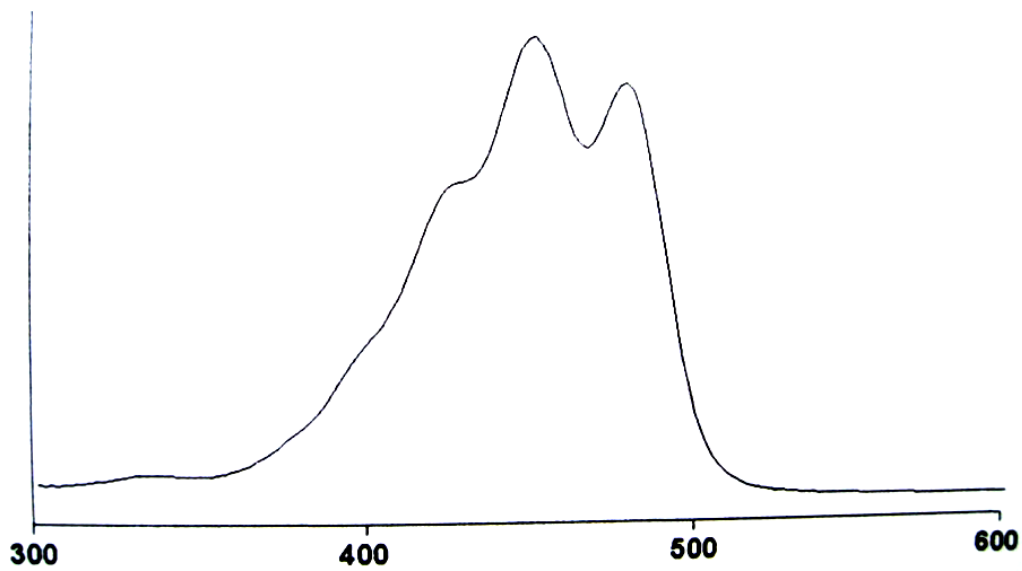


Abbildung 9: Absorbtionpektrum des Luteins in Ethanol [BRITTON et al., 2004]

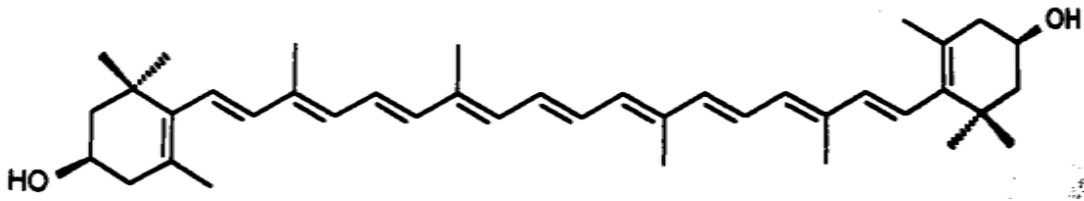


Abbildung 10: Strukturformel des Zeaxanthins [BRITTON et al., 2004]

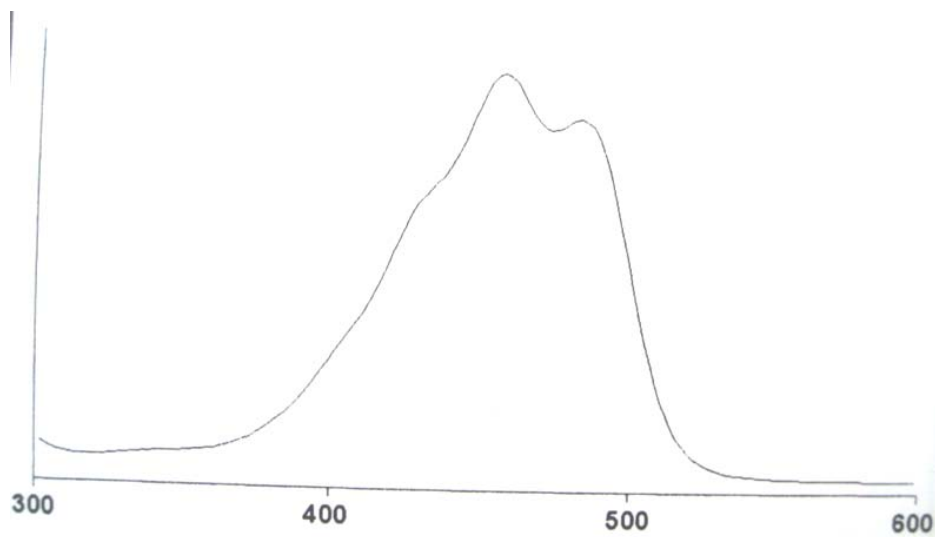


Abbildung 11: Absorptionsspektrum des Zeaxanthins in Ethanol [BRITTON et al., 2004]

Ein typisches Carotinoid, das häufig in tierischen Organismen vorkommt, ist Astaxanthin. Man findet es z.B. in Fischen wie Lachs, aber auch in Krustentieren wie Shrimps oder Hummer [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001] in denen es auch häufig an Protein gebunden vorkommt [ZAGALSKY, 2003].

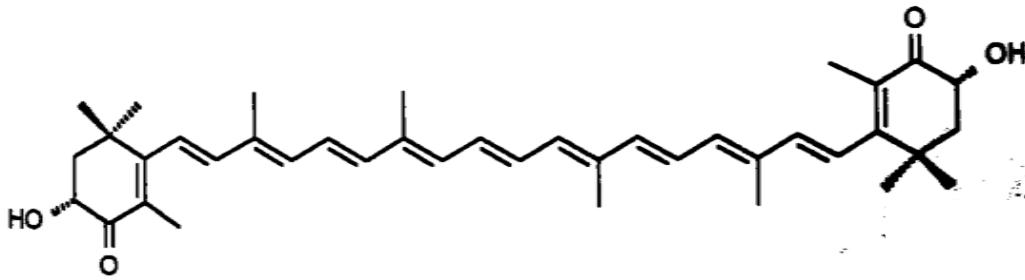


Abbildung 12: Strukturformel des Astaxanthins [BRITTON et al., 2004]

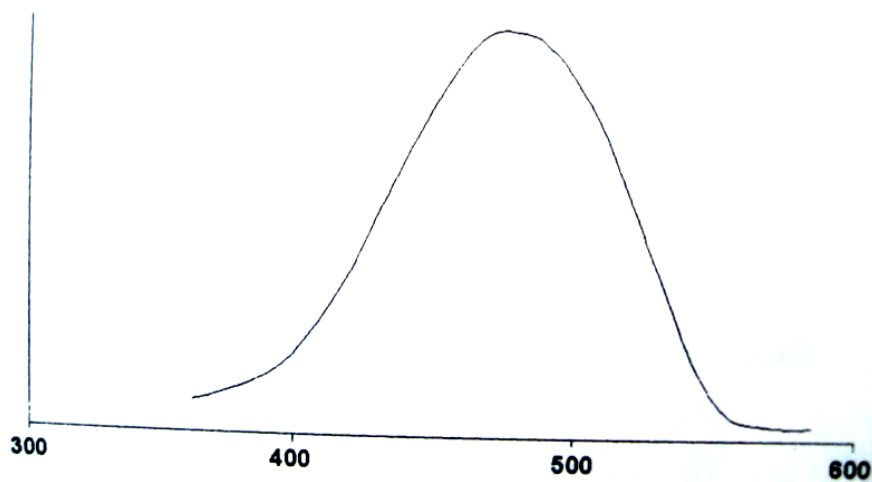


Abbildung 13: Absorbtionsspektrum des Astaxanthins in Ethanol [BRITTON et al., 2004]

Trotz der manchmal vorkommenden unveresterten Xanthophylle, z.B. in grünen Blättern oder in nach der Reifung grün bleibenden Früchten wie z.B. Kiwi, sind die meisten in Lebensmitteln vorkommenden Xanthophylle mit Fettsäuren verestert. Im Unterschied zu Blättern, welche ein konstantes Carotinoidmuster aufweisen, zeigen Früchte ein sehr komplexes und variables Carotinoidmuster [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Die Carotinoidzusammensetzung in Nahrungsmitteln wird u.a. von folgenden Faktoren beeinflusst [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; MAIANI et al., 2009]:

- Sorte und Art der Pflanze
- Teil der Pflanze
- Reifegrad der Frucht
- Klima / Temperatur
- Geografische Lage des Anbaugebietes
- Handhabung während und nach der Ernte
- Verarbeitung
- Lagerung

Carotinoide sind auch nicht in gleichem Ausmaß in der gesamten Frucht zu finden. Meistens zeigt sich, dass die Schale mehr Carotinoide enthält als das Fruchtmark.

Auch der Reifegrad spielt eine wesentliche Rolle. Die Reifung wird dabei meistens von einer erhöhten Carotenogenese begleitet, bei der das Chlorophyll abgebaut wird und die Chloroplasten zu Chromoplasten umgewandelt werden [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Bei Früchten, deren Farbe im Reifestadium nicht auf Carotinoide, sondern auf Anthocyane zurückgeht, oder deren gelbe Farbe nur auf den Abbau von Chlorophyll und die so einfach sichtbar werdenden, schon vorhandenen Carotinoide zurückzuführen ist, wird allerdings ein Rückgang der Carotinoidkonzentration während der Reifung beobachtet. Der Vorgang der Carotenogenese kann auch nach der Ernte fortgesetzt werden, solange die Frucht intakt bleibt. Dies ist z.B. bei Tomaten der Fall. Der Effekt von Temperatur und Erntezeitpunkt wurde ebenfalls bei den Carotinoidgehalten von Glashaus-Tomaten mit kontrollierter Umgebung deutlich. Dabei zeigte sich eine höhere β -Carotin Konzentration bei niedrigerer Temperatur und eine höhere Lycopin Konzentration bei höherer Temperatur [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Tabelle 2: Carotinoidgehalt von Glashaustomaten [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]

Tag/Temperatur min.-max.	β -Carotin Konzentration [$\mu\text{g/g}$]	Lycopin Konzentration [$\mu\text{g/g}$]
7/ 17,8-25,6°C	2,97	43,5
14/ 17,8-25,6°C	2,18	57,7
21/ 17,8-25,6°C	2,19	64,8
7/2,8-13,9°C	3,56	9,30
14/2,8-13,9°C	3,73	20,5
21/2,8-13,9°C	3,67	24,2

Carotinoide sind zusätzlich sehr empfindlich für Isomerisierung und Oxidation während des Verarbeitungsprozesses und der Lagerung. Dadurch kommt es zu Farbverlusten, Verlusten der biologischen Aktivität der Carotinoide (z.B. der Provitamin A-Aktivität) und zur Entstehung von flüchtigen Komponenten die zu erwünschten und unerwünschten Gerüchen führen können [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Ob eine Oxidation stattfindet, hängt von folgenden Faktoren ab [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]:

- Anwesenheit von Sauerstoff, Metallen, Enzymen, ungesättigte Fettsäuren, Prooxidantien oder Antioxidantien
- Lichteinstrahlung
- Art des anwesenden Carotinoids
- Oxidativer Status des Lebensmittels
- Stärke der Behandlung (Ultraschall, Erhitzen,...)
- Verpackungsmaterial
- Lagerbedingungen

Es hat sich gezeigt, dass das Erhitzen von carotinoidhaltigen Lebensmitteln vor allem die *trans-cis*-Isomerisation von Carotinoiden fördert. Wobei die *cis*-Isomerisation einen

geringen Farbverlust nach sich zieht, die auch durch Säuren oder Adsorption an aktive Oberflächen gefördert wird [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

2.4. Carotinoide im menschlichen Körper

Zur Förderung der menschlichen Gesundheit wird empfohlen, regelmäßig Obst und Gemüse zu sich zu nehmen [STAHL und SIES, 2005]. Dabei sind besonders stark gefärbte Produkte zu empfehlen. Diese Färbung ist auf die sekundären Pflanzenstoffe zurückzuführen, zu denen auch die Carotinoide zählen und denen eine wesentliche Rolle in der Krankheitsprävention zugeschrieben wird [STAHL und SIES, 2005].

In entwickelten Ländern beträgt der durch Obst und Gemüse aufgenommene Carotinoidanteil 80-90% der Gesamtmenge [MAIANI et al., 2009].

Carotinoide sind vor allem als Antioxidantien und Provitamin A bekannt. Um als Provitamin A zu gelten, muss zumindest ein unsubstituierter β -Ring mit einer C11-Polyenkette vorhanden sein. Vitamin A (Retinol) ist im Grunde die Hälfte des β -Carotin Moleküls, mit einer zusätzlichen terminalen Hydroxylgruppe. α -Carotin hingegen besitzt nur einen β -Iononring [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Vitamin A ist im Körper ein wichtiges fettlösliches Vitamin, das u.a. Funktionen beim Wachstum, der Embryonalentwicklung und beim Sehvermögen hat [STAHL und SIES, 2005].

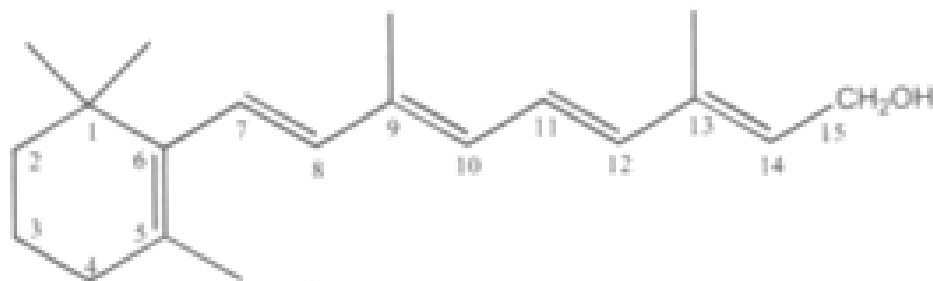


Abbildung 14: Strukturformel von *all-trans*-Retinol

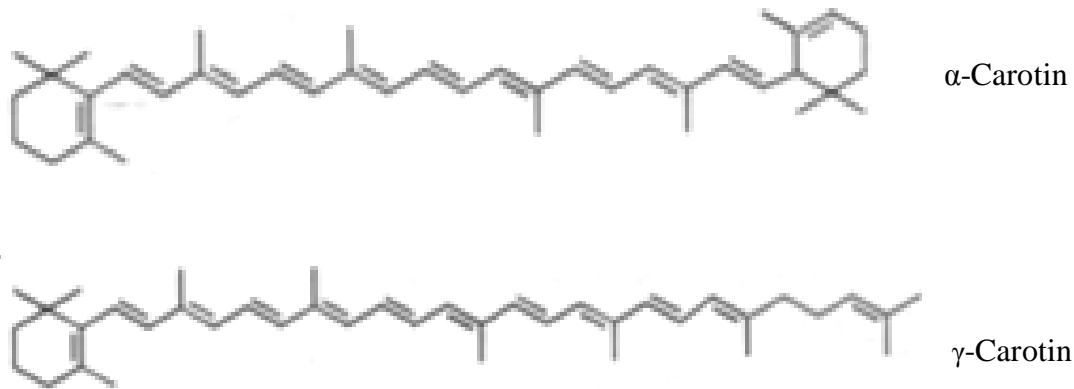


Abbildung 15: Strukturformel von α - und γ -Carotin

Bedarf [ELMADFA, 2004]:

$$1\mu\text{g Retinol} = 6\mu\text{g } \beta\text{-Carotin} \\ = 12\mu\text{g andere Carotinoide}$$

Für β -Carotin entspricht der Richtwert der täglichen Zufuhr für Mann und Frau 2-4 mg/Tag.

Für eine obere sichere Grenze der Zufuhr gibt es noch keine gesicherten Angaben [ELMADFA, 2004].

Die Aufnahme der Carotinoide hängt auch von verschiedenen Faktoren wie der Lebensmittelzusammensetzung, der Zubereitung des Lebensmittels und der gleichzeitigen Aufnahme von Ballaststoffen und Fett ab. Auch Krankheiten des Verdauungstraktes, der Vitamin A-Status oder Unterernährung können die Aufnahme zusätzlich beeinflussen [STAHL und SIES, 2005].

Andere biologische Wirkungen, die Carotinoiden zugeschrieben werden, beruhen allerdings nicht auf deren Provitamin A-Aktivität, sondern auf der antioxidativen Wirkung von Carotinoiden, die durch die Fähigkeit der Carotinoide zur Neutralisation von Singulett-Sauerstoff und zur Deaktivierung von freien Radikalen hervorgerufen wird [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Würden diese freien Radikale, die u.a. durch metabolische Prozesse entstehen, nicht deaktiviert, könnten sie biologisch wichtige Moleküle wie Lipide, DNA und Proteine schädigen, wodurch es zu verschiedenen degenerativer Erkrankungen kommen kann [STAHL und SIES, 2005].

Zeaxanthin und Lutein wird außerdem eine präventive Wirkung bei altersbedingter Makuladegeneration [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001], aber auch bei der Bildung von Katarakten, koronaren Herzkrankheiten und Schlaganfall zugewiesen. Des Weiteren gelten Carotinoide als hilfreich bei der Verbesserung des Immunsystems und als Schutz vor Sonnenbrand. Als ebenfalls antioxidativ hoch wirksames Carotinoid gilt Astaxanthin, welches in Krustentieren und Meeresfrüchten vorkommt [MAIANI et al., 2009]. Dabei wird den Carotinoiden mit neun oder mehr Doppelbindungen die größte Schutzfunktion zugeschrieben [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]. Eine weitere wichtige antioxidative Fähigkeit der Carotinoide wie z.B. von β -Carotin ist die Inhibierung der Photooxygenierung [SCHREINER, 2008].

Bei der Aufnahme von Carotinoiden gibt es außerdem ein Nord-Süd-Gefälle, da in den südlicheren Länder mehr Früchte konsumiert werden und somit die Carotinoidaufnahme höher ist [MAIANI et al., 2009].

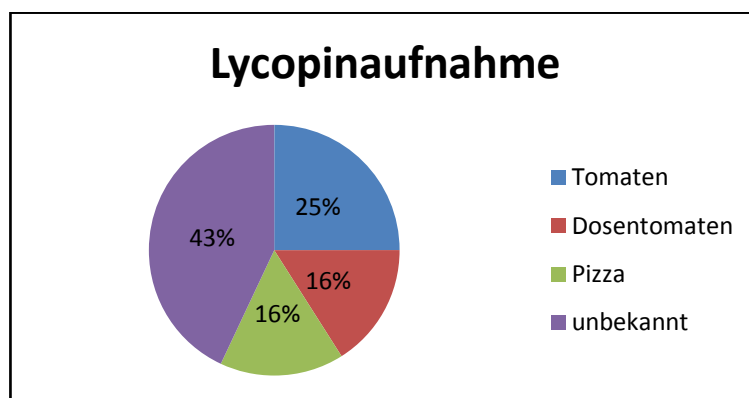


Abbildung 16: Lycopin-Aufnahme durch verschiedene Tomatenprodukte in Frankreich 2001 in % der Gesamtycopinaufnahme [MAIANI et al., 2009]

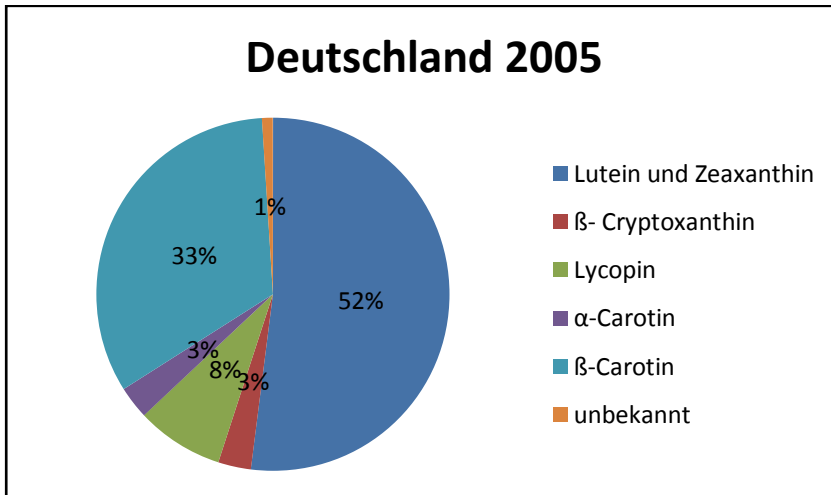


Abbildung 17: Beitrag verschiedener Carotinoide in % zur Gesamtcarotinoidaufnahme (9.368 μ g/Tag) in Deutschland 2005 [MAIANI et al., 2009]

2.5. Analyse von Carotinoiden

Da es viele verschiedene Carotinoide gibt und auch ihre Zusammensetzung sehr stark variiert, muss die Methode zur Carotinoidanalyse an das jeweils vorhandene Material angepasst werden [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Ein weiteres Problem bei der Analyse stellt die hohe Instabilität der Carotinoide dar. Es müssen daher Vorkehrungen getroffen werden, um eine möglichst korrekte Analyse zu gewährleisten [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Vorsichtsmaßnahmen sind z.B. [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]:

- Abwicklung der Analyse in möglichst kurzer Zeit
- Ausschluss von Sauerstoff
- Lichtschutz
- Vermeidung hoher Temperaturen
- Vermeidung von Säurekontakt
- Verwendung möglichst reiner Lösungsmittel, da Unreinheiten zu unerwünschten Wechselwirkungen führen könnten

Besonders Sauerstoff in Verbindung mit Licht und Wärme ist sehr schädlich. Es ist daher nötig, wo immer es möglich ist, Sauerstoff auszuschließen und die Carotinoide unter Vacuum oder unter einer Schutzgas Atmosphäre zu lagern. Als Gefäße sollten jene aus dunklem Glas verwendet werden oder das Gefäß mit Aluminiumfolie eingewickelt werden, um den Lichtschutz zu gewährleisten. Auch eine Verwendung von Antioxidantien ist anzuraten, vor allem, wenn die Analyse über einen längeren Zeitraum fortgesetzt wird [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Die analytischen Schritte sind fast in jedem Fall folgendermaßen [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]:

- Probenentnahme und Probenvorbereitung
- Extraktion der Carotinoide
- Überführung der Carotinoide in ein Lösungsmittel, dass mit den anschließenden Schritten kompartibel ist
- Verseifung und Neutralisation
- Konzentrierung der Lösung
- chromatographische Trennung
- Identifikation und Quantifikation

Bei jedem dieser Schritte können Fehler auftreten. Es ist daher notwendig, die einzelnen Schritte vor der Durchführung zu verstehen und gegebenenfalls zu üben [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

2.5.1. Probenentnahme, Probenvorbereitung und Extraktion

Um eine homogene, repräsentative Probe zu erhalten und die Extraktion zu erleichtern, wird das Ausgangsmaterial möglichst stark zerkleinert und anschließend sofort extrahiert, um eine Veränderung der Probe zu verhindern.

Dabei wird die Probe mit dem Lösungsmittel geschüttelt und die obere Phase abgenommen [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

2.5.2. Verseifung und Neutralisation

Eine Verseifung wird durchgeführt, um Chlorophylle und unerwünschte Lipide zu entfernen, die die Analyse beeinträchtigen könnten. In Früchten werden dabei auch die Carotenol-Ester hydrolysiert. Dies vereinfacht die chromatographische Trennung dahingehend, dass nicht die Ester, sondern die freien Carotenoide analysiert werden können [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Die Verseifung kann jedoch auch zum Verlust von Carotinoiden führen. Denn während β -Carotin und andere Provitamin A Carotinoide die Verseifung überstehen, kommt es z.B. bei Lutein zu einer starken Verringerung während der Verseifung und dem darauf folgenden Waschschrift (Neutralisation) [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Eine Verseifung sollte daher, wenn möglich, vermieden werden. Beispielsweise bedürfen Proben wie Blattgemüse, Tomaten und Karotten keiner Verseifung, da es sich um fettarme Materialien handelt, die im Allgemeinen frei von Carotenol-Estern sind [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Bei Proben bei denen eine Verseifung unumgänglich ist wird diese am besten folgendermaßen durchgeführt [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]:

1. Probe in Petrolether oder Hexan überführen
2. gleiche Menge 10%iges methanolisches Kaliumhydroxid zufügen
3. Mischung bei Raumtemperatur über Nacht im Dunkeln lassen
4. anschließend 5 mal mit Wasser waschen um das Alkali zu entfernen
5. um beim Waschschrift einen Carotinoidverlust speziell der polareren zu verhindern, sollte das Wasser langsam entlang der Glasflaschenwand in die Probe laufen

2.5.3. Konzentrierung der Lösung

Da Carotinoide auch hitzeempfindlich sind, sollte eine Erhitzung nur erfolgen, wenn diese absolut notwendig ist. Um Carotinoid-Lösungen zu konzentrieren, sollte daher ein Vacuumverdampfer mit reduziertem Druck und einer Temperatur unter 40°C verwendet werden. Allerdings sollte nicht bis zur vollständigen Trocknung eingedampft werden, um eine Veränderung der Carotinoide und ein Adsorbieren an der Glasflasche zu verhindern. Um das restliche Lösungsmittel abzdampfen, sollte daher Stickstoff oder Argon verwendet werden. Die Substanzen sollten danach, wenn dies notwendig ist, trocken oder in Petroleumether oder Hexan unter Stickstoff oder Argon bei -20°C oder kälter aufbewahrt werden [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

2.5.4. Chromatographische Trennung , Identifikation und Quantifikation

Es gibt mehrere Methoden, um die chromatographische Trennung von Carotinoiden zu erreichen. Darunter sind herkömmliche Säulenchromatographie (Open-Column Chromatography) und HPLC die meistverwendeten, wobei für HPLC der Vorteil besteht, dass sie für die gesamte Bandbreite an Carotinoiden verwendet werden kann. Gaschromatographie scheidet zur Analyse von Carotinoiden aus, da Carotinoide zu hitzelabil und zu schwer flüchtig sind, um gute Ergebnisse zu erzielen [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

In der RP-HPLC eluieren die Xanthophylle vor den Carotinen. Die Elutionsfolge ist im speziellen jedoch wieder von der Laufmittelzusammensetzung abhängig, so dass z.B. je nach Laufmittel β -Carotin vor oder nach Lycopin eluiert werden kann [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Bei der HPLC-Analyse ist die RP-HPLC mit C18-Säulen die bevorzugte Methode, da die C18-Säule nur schwache hydrophobe Wechselwirkungen mit den Analyten zeigt, mit den meisten Laufmitteln kompatibel ist, leicht erhältlich ist und gut mit der Polaritätsbandbreite von Carotinoiden zurechtkommt [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Allerdings verwenden neuere Studien immer häufiger C30-Säulen wie z.B. WENZEL et al., (2010). Diese sind vor allem auch besser geeignet, die *cis/trans*-Isomere der Carotinoide zu trennen [LIU, 2009].

Bei den Fritten und Säulen für die HPLC sollten außerdem Metalloberflächen vermieden werden, da diese für die Carotinoide schädlich sind.

Für das Laufmittel (mobile Phase) gibt es viele verschiedene Varianten, wobei diejenigen mit Mischungen mit den Hauptkomponenten Acetonitril und Methanol überwiegen. Außerdem muss das Lösungsmittel, in dem die Probe gelöst ist, mit dem Laufmittel kompatibel sein [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

Für die Trennung wird eine isokratische Trennung gegenüber einer Gradientenelution bevorzugt, da die Anwendung einfacher ist und zu einer gleichbleibenden Basislinie mit reproduzierbareren Retentionszeiten führt.

Um eine bessere Reproduzierbarkeit zu erreichen, sollte eine Temperaturregulierung für die Säule vorhanden sein, um eventuelle Unterschiede der Umgebungstemperatur auszugleichen. Die optimale Temperatur für Lutein, β -Carotin, Zeaxanthin und Lycopin ist hierbei bei 20-22,5°C [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001].

2.5.5. Aufbau eines HPLC-Systems

Die HPLC (= Hochleistungsflüssigchromatographie) ist ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem ein Lösungsmittel bzw. ein Lösungsmittelgemisch verwendet wird, um das zu trennende Stoffgemisch durch das Trennsystem zu transportieren [UNGER und WEBER, 1995].

Die HPLC-Apparatur besteht aus mehreren Komponenten, die aneinander gekoppelt sind. Das sind im Allgemeinen eine Versorgungseinheit mit Fließmittelreservoir und Pumpe, ein Dosierventil (Injektionsventil), eine Trennsäule, eventuell mit Vorsäule und ein Detektor, Abfallreservoir und Registriereinheit mit Auswertesystem [UNGER und WEBER, 1995].

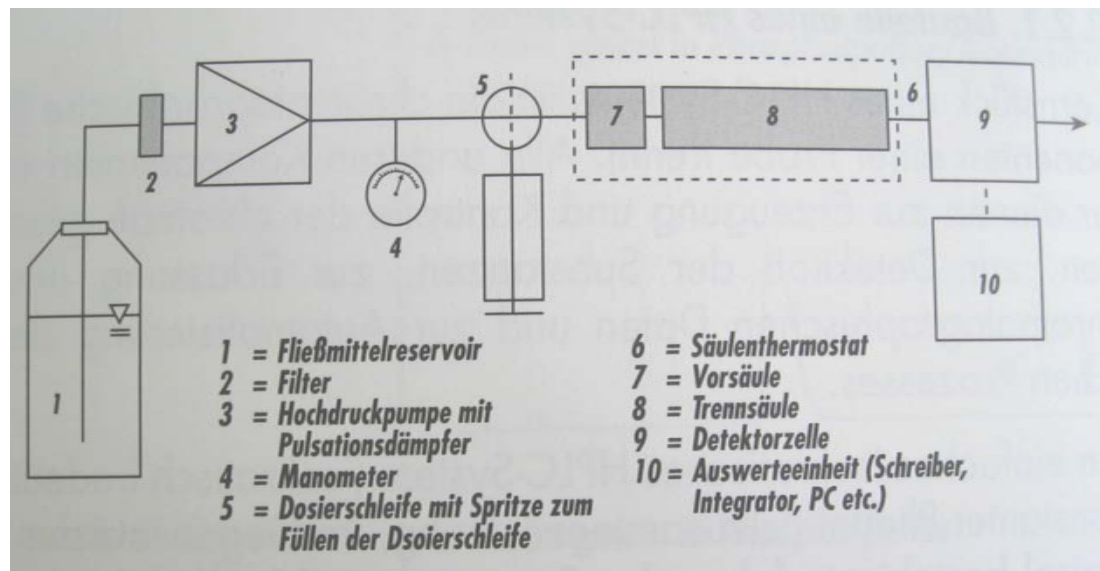


Abbildung 18: Schematischer Aufbau einer HPLC-Apparatur für isokratische Arbeitsweise [BRITTON et al., 2004]

Bei isokratischer Arbeitsweise wird ein Laufmittel mit konstanter Zusammensetzung zum Eluieren benutzt. Es kann sich dabei um binäre (Gemische aus zwei Laufmitteln), ternäre (aus drei Laufmitteln) oder quaternäre (aus vier) Gemische handeln [UNGER und WEBER, 1995].

Die Probe wird in das System eingespritzt (manuell oder mit Autosampler) und unter konstantem Druck und konstanter Geschwindigkeit von der Säule durch die unterschiedlich starke Wechselwirkung aufgetrennt und anschließend detektiert [UNGER und WEBER, 1995].

Bei den meisten HPLC-Detektoren wird das Eluat durch eine Durchflußzelle geleitet und dabei die Änderung einer physikalischen oder chemischen Eigenschaft während des Durchflusses der Probensubstanz gemessen. Diese wird über ein elektrisches Signal zum PC-Auswertesystem übertragen. Es gibt selektive und universelle Detektoren. Zu den selektiven zählen UV- und Fluoreszenzdetektoren [UNGER und WEBER, 1995].

Ein Photodiodenarray-Detektor ist ein UV-Detektor, der nicht nur die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge misst, sondern gleichzeitig das gesamte UV-Spektrum erfassen kann [UNGER und WEBER, 1995].

2.5.6. RP-HPLC

Als Packungsmaterial für RP-Säulen werden chemisch modifizierte Kieselgele verwendet, die hydrophobe funktionelle Gruppen bzw. Liganden tragen z.B. n-Octyl [UNGER und WEBER, 1995].

Das Packungsmaterial ist Träger der unpolaren stationären Phase in der RP-Chromatographie. Die stationäre Phase im Gleichgewicht mit der polareren mobilen Phase, dem Fließmittel, verursacht aufgrund der unterschiedlichen Polaritäten eine Verzögerung der Substanzen (je stärker die Wechselwirkung, desto länger wird die Substanz zurückgehalten), die zur Trennung führt [UNGER und WEBER, 1995].

RP-HPLC ist die am meisten verwendete Methode bei der Trennung von Carotinoiden [MAIANI et al., 2009].

2.5.7. Do's und Don'ts bei der Carotinoid-Analyse

Um die Schwierigkeiten bei der Arbeit mit Carotinoiden in den Griff zu bekommen, werden folgende Maßnahmen empfohlen:

Do's [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]:

- Die Probe sollte immer vor Licht geschützt werden z.B. durch Aluminiumfolie und es sollte bei gedimmtem Kunstlicht gearbeitet werden.
- Es sollten immer reagent-grade Lösungsmittel verwendet werden.
- Peroxide in den Lösungsmitteln sollten verhindert werden.
- Alle Schritte sollten möglichst schnell durchgeführt werden, um das Risiko einer Oxidation und Isomerisation zu verringern.

- Sauerstoff sollte so gut wie möglich ausgeschlossen werden. Die Carotinoide sollten daher in luftdichten Behältern unter Vacuum oder Stickstoff aufbewahrt werden.
- Außerdem sollten die Proben sofort nach Erhalt analysiert werden, um Veränderungen des Carotinoidgehaltes auszuschließen.
- Je weniger Analyse-Schritte durchgeführt werden müssen desto besser, da so die Fehlerquellen verringert werden.
- Es sollte Braunglas oder Aluminiumfolie als Lichtschutz verwendet werden.
- Zur Entfernung von Wasser aus der Carotinoid-Lösung kann eine kleine Portion Natriumsulfat zugegeben werden.
- Zum Aufkonzentrieren der Carotinoid-Lösung sollte ein Vakuumverdampfer verwendet werden und die Carotinoide nicht bis zur vollständigen Trocknung eingedampft werden. Der Rest kann mit Stickstoff getrocknet werden.
- Alle Glasbehälter sollten stets völlig rein sein.

Don'ts [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]:

- Carotinoide sollten nicht in Dichlormethan, Ethylether oder Aceton aufbewahrt werden, da sie in diesen Lösungsmitteln schneller zerfallen.
- Es sollten kein Plastikmischer verwendet werden, da das Aceton das Plastik angreifen kann und Carotinoide sich leicht an Plastik anlagern.

- Eine Verseifung sollte vermieden werden, außer es ist unbedingt notwendig. Wenn die Notwendigkeit einer Verseifung besteht, sollte die mildeste Form gewählt werden: Probe in Petrolether oder Hexan überführen, gleiche Menge 10%iges methanolisches Kaliumhydroxid zufügen, Mischung bei Raumtemperatur über Nacht im Dunkeln lassen.

- Auf keinen Fall sollte die Probe dem Licht ausgesetzt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Produkte (Proben)

Bei dieser Arbeit wurden Proben von fetthaltigen Lebensmitteln wie Lachs und Ei, als auch Lebensmittel mit sehr geringem Fettgehalt, wie frische Tomaten und Tomatenprodukte, untersucht. Die Produkte wurden im Zeitraum von Mai bis August 2010 im österreichischen Handel gekauft und mittels HPLC auf ihren Carotinoidgehalt untersucht.

Tabelle 3: Bezugsquellen der untersuchten Produkte

Nummer	Produkt	Marke	Geschäft
	Atlantischer Räucherlachs geschnitten	Novomare [®]	Billa
	Tonis Sommerfrische Freilandeier mittel	Tonis Freilandeier	Billa
1	Pannonische Kirschtomaten Bio, Österreich	“Zurück zum Ursprung”	Hofer
2	Pannonische Tomaten Bio, Österreich	“Zurück zum Ursprung”	Hofer
3	Paradeiser, Österreich, Genussregion Österreich	LGV Frischgemüse	Hofer
1a	Pannonische Kirschtomaten Bio, Österreich – gekocht	“Zurück zum Ursprung”	Hofer
2a	Pannonische Tomaten Bio, Österreich – gekocht	“Zurück zum Ursprung”	Hofer
3a	Paradeiser, Österreich, Genussregion Österreich – gekocht	LGV Frischgemüse	Hofer
4	Geschälte Tomaten in der Dose	clever [®]	Billa
5	Tomatenmark ,Triplo concentrato di pomodori,	Mutti [®]	Billa
6	Getrocknete Tomatenfertigsauce “Napoli” ,	Knorr [®]	Billa
7	Getrocknete Tomaten Crèmesuppe “Heiße Tasse”	Knorr [®]	Billa

3.2. Bestimmung des Carotinoidgehaltes

3.2.1. Geräte

- Laborwaage
- Mixer (Osterizer[®])
- Ultraschallbad
- Magnetrührer
- Trockenschrank
- BÜCHI[®] Rotavapor R-134
- BÜCHI[®] Waterbath B-480
- Reacti-Therm Heating Module PIERCE[®]
- HPLC-Anlage Shimadzu[®] LC-9

3.2.2. Labormaterialien

- Alufolie
- Spatel
- Bechergläser
- Pyrexröhrchen
- dunkle Vials
- Exsikkator
- Vakuumverdampfer (Rotavapor[®]) der Firma BÜCHI[®]
- Pasteurpipetten
- Plastiktrichter
- 250 ml Scheidetrichter mit Stopfen
- 1000 µl Eppendorfpipette
- 100 ml Messzylinder
- 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml Messkolben
- Eprouvetten
- Faltenfilter
- 250 ml, 1000 ml Laborflaschen

- 250 ml Rundkolben
- 150 ml Erlenmeyerkolben
- Glaspetrischale
- Silica-Säule Supelco LC-Si 12 ml, 2000 mg

3.2.3. Reagentien

Tabelle 4: Reagentien für die Probenaufbereitung

Substanz	Firma	Reinheit
n-Hexan	Carl Roth GmbH ROTISOLV [®] HPLC	
Diethylether	Carl Roth GmbH	>99,5%
Petroleumether 40°-60°C	PESTINORM [®]	
Acetonitril	ROTISOLV [®] HPLC	Gradient Grade
Dichlormethan	MERCK [®]	Zur Analyse ACS, ISO
Methanol	AnalaR NORMAPUR [®]	99,9%
Ethanol vergällt mit 1% MEK	Roth [®]	96%
KOH (Kaliumhydroxid) Plätzchen	MERCK [®]	reinst
Natriumsulfat wasserfrei, gepulvert	Roth [®]	>99,9% p.a.
Aceton	Rotipuran	>99,8% p.a.
Stickstoff		5.0

Tabelle 5: Reagentien für die HPLC-Analyse

Substanz	Firma	Reinheit
Acetonitril	ROTISOLV [®] HPLC	Gradient Grade
Dichlormethan	MERCK [®]	Zur Analyse ACS, ISO
Methanol	AnalaR NORMAPUR [®]	99,9%
β-Carotin	Sigma Aldrich [®] , Fluka	purum > 97,0%

3.2.4. HPLC-Untersuchungsmethode

Die Carotinoide wurden bei dieser Untersuchung mittels einer High Performance Liquid Chromatography (HPLC) bestimmt. Dabei wurde eine Reversed Phase (RP) Säule verwendet.



Abbildung 19: Verwendete HPLC-Anlage

Tabelle 6: HPLC-System für die Carotinoidanalyse

Komponente	Zusammenetzung
Pumpe	2x Shimadzu Liquid Chromatograph LC-9A mit Hochdruckgradientenmischer Flow: 1 ml/min
Probenaufgabemenge	20 µl Probenschleife

Probeneinbringung	Shimadzu System Controller SCL-6B Autoinjektor SIL-6B
Säule	ACE 5 C18 250 x 4.0mm ACE-121-2504
Thermostatisierung der Säule	Shimadzu CTO-6A Säulenofen Säulentemperatur: 22°C
Detektoren	Shimadzu UV Spectrophotometric Detektor SPD-6A Shimadzu Photodiode Array UV-VIS Detektor SPD-M6A
Mobile Phase	70% Acetonitril 18% Methanol 12% Dichlormethan
Software	Shimadzu Class-VP

Eine C18-Säule wurde für die Analyse gewählt, da dies eine sehr häufig für Carotinoide verwendete Säulenart ist und CORTES et al., (2004) zu den Vorteilen dieser Säulen zählt, dass diese mit vielen Laufmitteln kompartibel sind, leicht erhältlich sind und außerdem für die gesamte Carotinoid-Bandbreite verwendet werden können [CORTES et al., 2004].

Die einzelnen Läufe wurden wie bei TAKAICHI S., (2000) isokratisch durchgeführt.

3.2.5. Laufmitteloptimierung

Das Laufmittel zur Trennung der Carotinoide sollte zum Großteil leicht organisch sein und eine niedrige Viskosität besitzen. Zusätzlich sollten sich die Carotinoide darin leicht lösen lassen. Diese Eigenschaften treffen vor allem auf Acetonitril und Methanol zu [CORTES et al., 2004].

In mehreren Studien [OLLILAINEN et al., (1989); ADEWUSI et al., (1993); ARUNA et al., (2009); DIAS et al., (2009) OLLILAINEN et al., (1989); ADEWUSI et al., (1993)] wurde für die Carotinoidanalyse eine Laufmittelzusammensetzung von Acetonitril-Methanol-Dichlormethan in verschiedenen Verhältnissen empfohlen. Das

jeweilige Verhältnis dieser Substanzen hängt auch davon ab, auf welche Carotinoide man sein Augenmerk richten möchte und welche Säule verwendet wird.

ARUNA et al., (2009) benutzte eine Mischung von 6:2:2 Acetonitril-Methanol-Dichlormethan, während OLLILAINEN et al., (1989) und ADEWUSI et al., (1993) eine Mischung im Verhältnis 70:20:10 Acetonitril- Dichlormethan-Methanol bevorzugten.

Um zu testen, ob diese Zusammensetzung auch für diese Untersuchung optimal wäre, wurde ein Karottenextrakt hergestellt, um mit diesem einen β -Carotinpeak zu erhalten.

Dazu wurden 30 g Karotten im Osterizer unter Vermeidung direkter Sonneneinstrahlung zerkleinert und mit 50 ml:50 ml n-Hexan-Diethylether [ARUNA et al., 2009] ausgeschüttelt. Danach wurde die Probe über einen Plastiktrichter mit Faltenfilter in einen Rundkolben überführt und im Rotavapor fast bis zur Trocknung eingedampft. Die Substanz wurde in eine Eprovette überführt und der Rundkolben 3x mit n-Hexan gespült und die erhaltenen Flüssigkeiten in der Eprovette vereinigt. Danach wurde die Flüssigkeit im Heizblock mit Stickstoff bis zur Trocknung eingedampft, mit 2 ml Petroleumether verdünnt und in ein Braunglas Vial überführt, zur Vermeidung von Sauerstoff mit Stickstoff begast und in die HPLC eingespritzt und bei 450 nm gemessen.

Es wurden mehrere Läufe mit unterschiedlicher Laufmittelzusammensetzung getestet, um die ideale Zusammensetzung zu ermitteln.

DIAS et al., (2009) empfahl z.B. eine Zusammensetzung von 75:20:5 Acetonitril-Methanol-Dichlormethan.

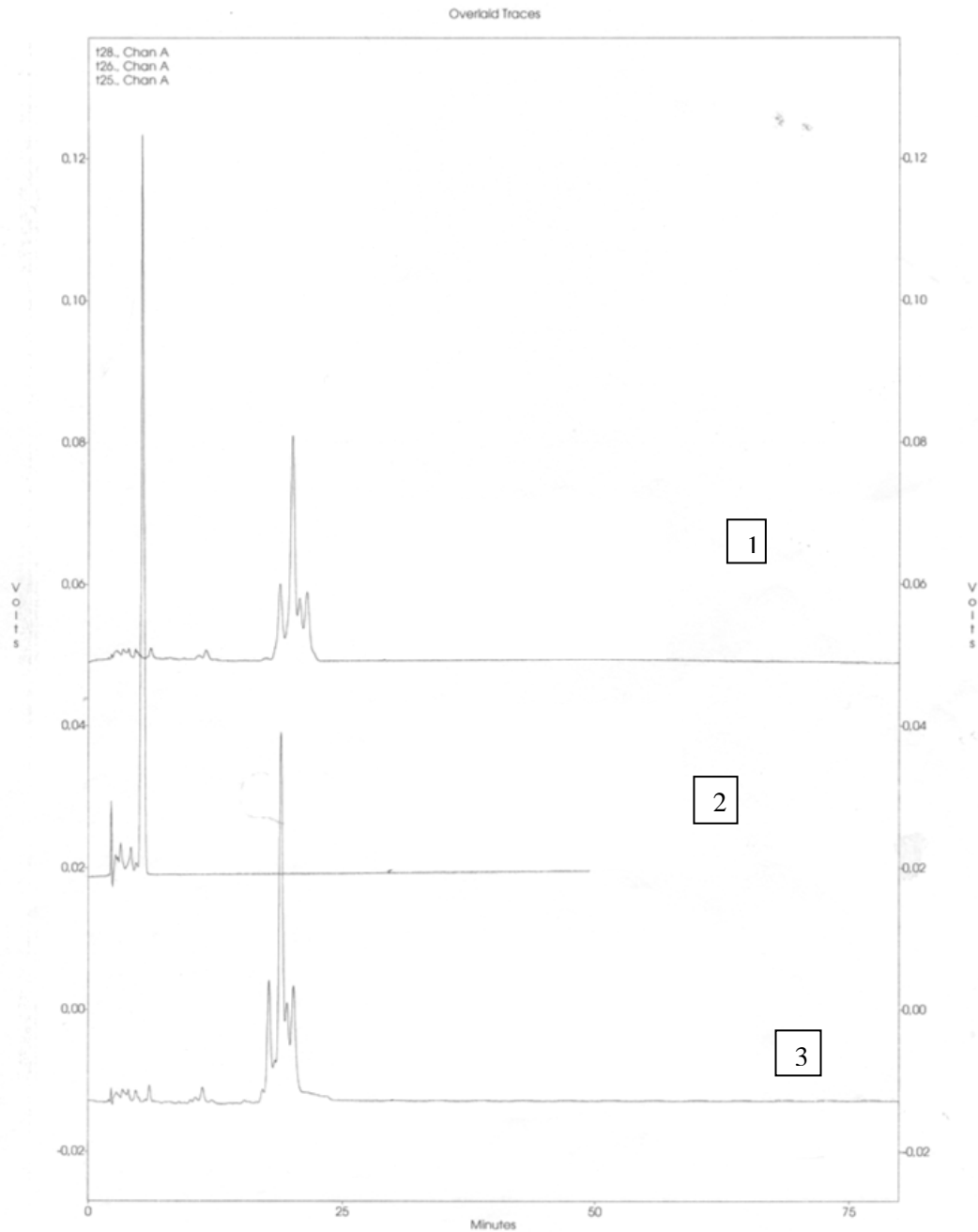


Abbildung 20: HPLC-Chromatogramm: Karottenextrakt in Laufmittelmischungen von 50% Acetonitril mit 50% Mischungen aus Methanol/ Dichlormethan gemessen bei 450 nm und 22°C

Lauf 1: 5:3:2 AcN/MeOH/Dichlormethan

Lauf 2: 5:1:4 AcN/MeOH/Dichlormethan

Lauf 3: 5:4:1 AcN/MeOH/Dichlormethan

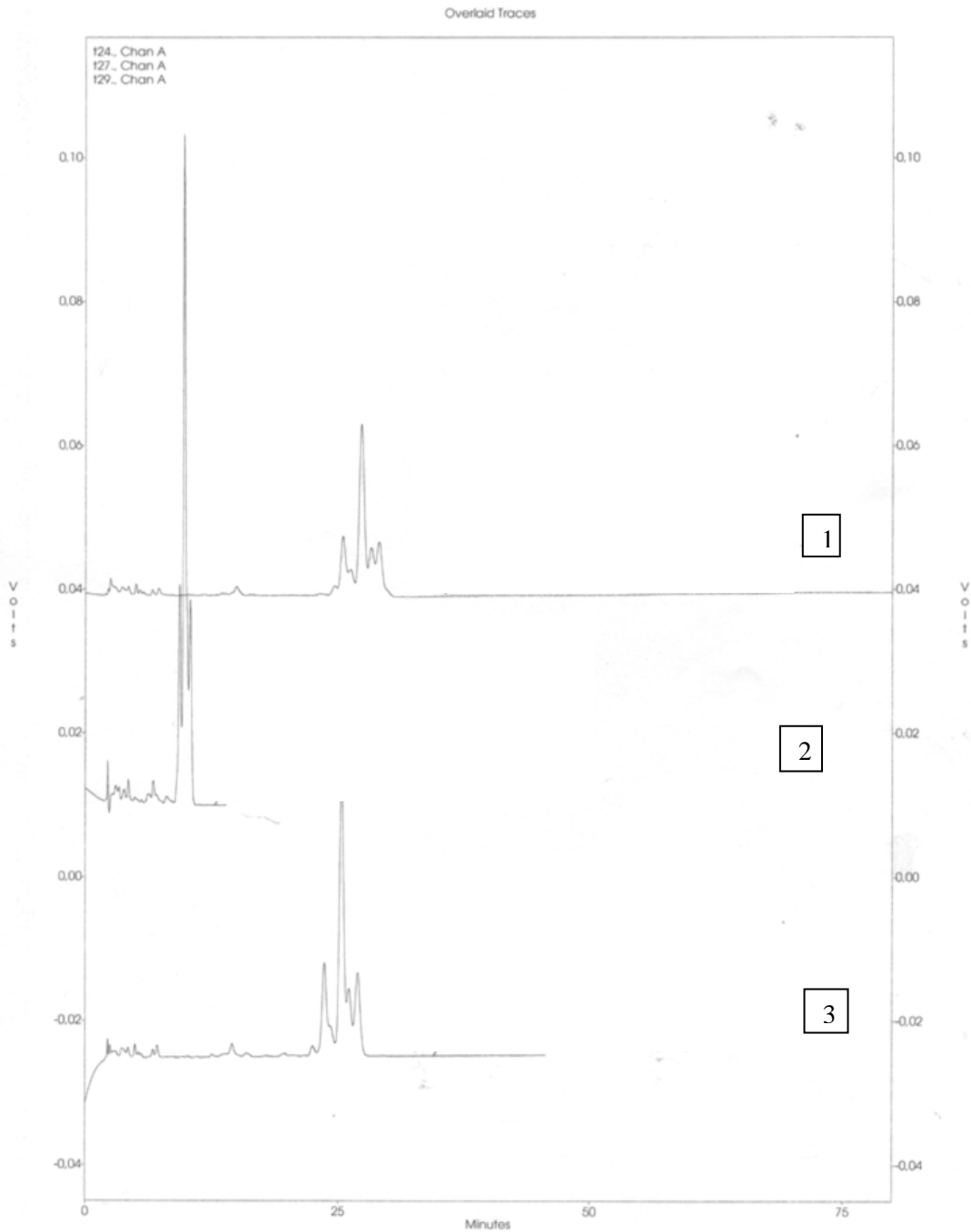


Abbildung 21: HPLC-Chromtogramm: Karottenextrakt in Laufmittelmischungen von 70% Acetonitril mit 30% Mischungen aus Methanol/ Dichlormethan gemessen bei 450 nm und 22°C

Lauf 1: 35:9:6 AcN/MeOH/Dichlormethan

Lauf 2: 35:3:12 AcN/MeOH/Dichlormethan

Lauf 3: 35:12:3 AcN/MeOH/Dichlormethan

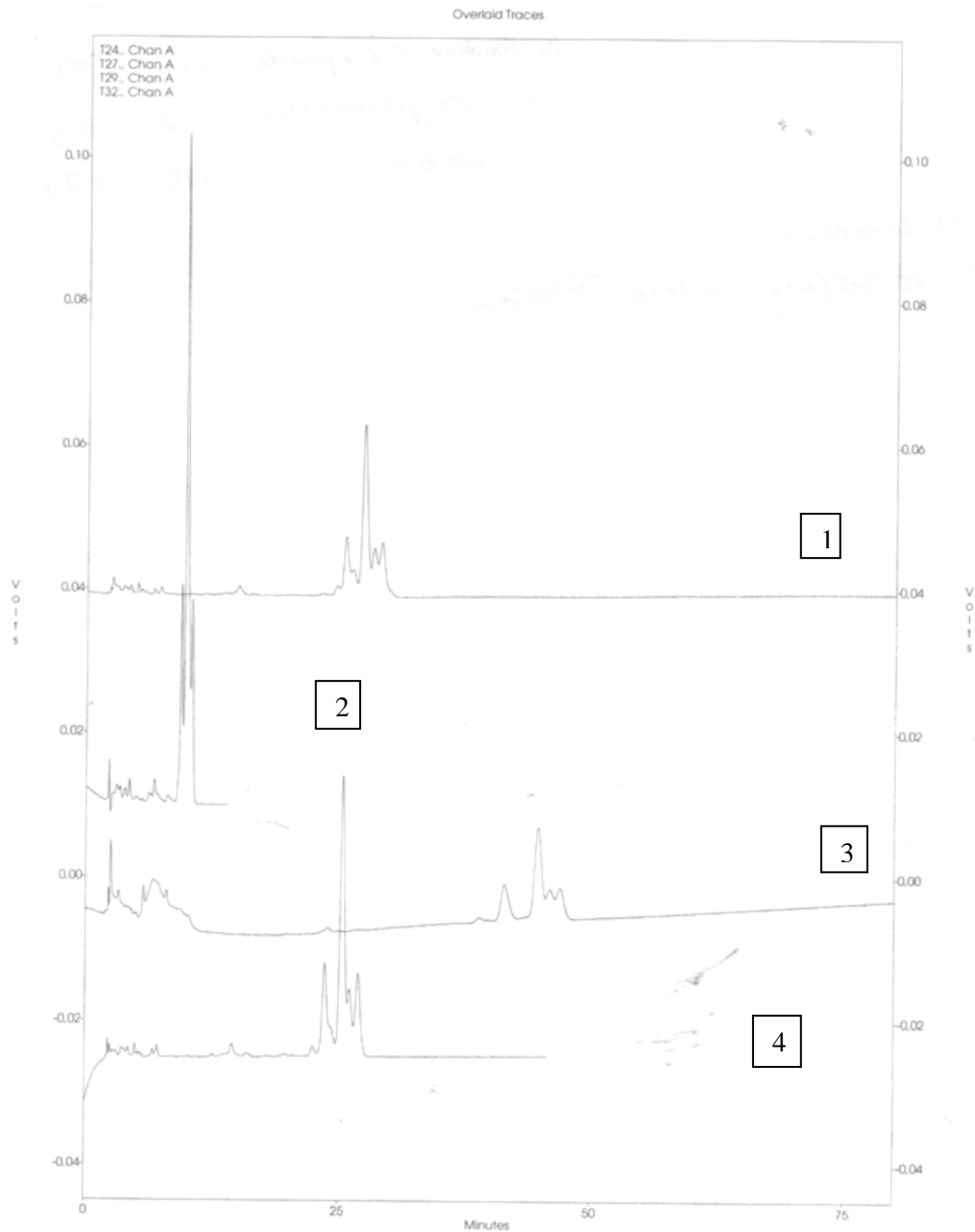


Abbildung 22: HPLC-Chromatogramm: Karottenextrakt in Laufmittelmischungen von 70% Acetonitril mit 30% Mischungen aus Methanol/ Dichlormethan bzw. reines Methanol gemessen bei 450 nm

Lauf 1: 35:9:6 AcN/MeOH/Dichlormethan

Lauf 2: 35:3:12 AcN/MeOH/Dichlormethan

Lauf 3: reines MeHO

Lauf 4: 35:12:3 AcN/MeOH/Dichlormethan

Es stellte sich heraus, dass die Peaks sich bei einer Zusammensetzung von 70% Acetonitril mit 30% Methanol-Dichlormethan im Verhältnis 3:2 am besten detektieren ließen und auch die Retentionszeiten passend waren.

Bei einer höheren Zugabe von Dichlormethan lief die Probe schneller durch die Säule. Dies erwies sich als äußerst ungünstig, da die Probenpeaks mit dem Laufmittelpic zusammenfielen.

Bei einer höheren Zugabe von Methanol wurden die Peaks breiter und die Retentionszeiten länger, was für die Interessen dieses Projektes ebenfalls als unnötig war, da kein Augenmerk auf die unterschiedliche Detektion von *cis*- oder *trans*-Carotinoiden gelegt wurde.

3.2.6. Erstellung der β -Carotin Eichgeraden

Um eine Eichgerade für β -Carotin zu erhalten wurde 0,0101 g des gepulverten β -Carotins in einen 100 ml Messkolben eingewogen und auf 100 ml mit n-Hexan aufgefüllt. Von dieser Stocklösung mit einer β -Carotinkonzentration von 101 mg/l wurde folgende Verdünnungsreihe erstellt (Tab.7).

Tabelle 7: Verdünnungsreihe des β -Carotin-Standards

Lauf	Mischung	Konzentration in mg/l
a1	1ml Stocklösung auf 10ml mit n-Hexan	10,10
a2	1ml Stocklösung auf 20ml mit n-Hexan	5,05
a3	1ml a2 auf 10ml mit n-Hexan	1,01
a4	1ml a3 auf 10ml mit n-Hexan	0,10

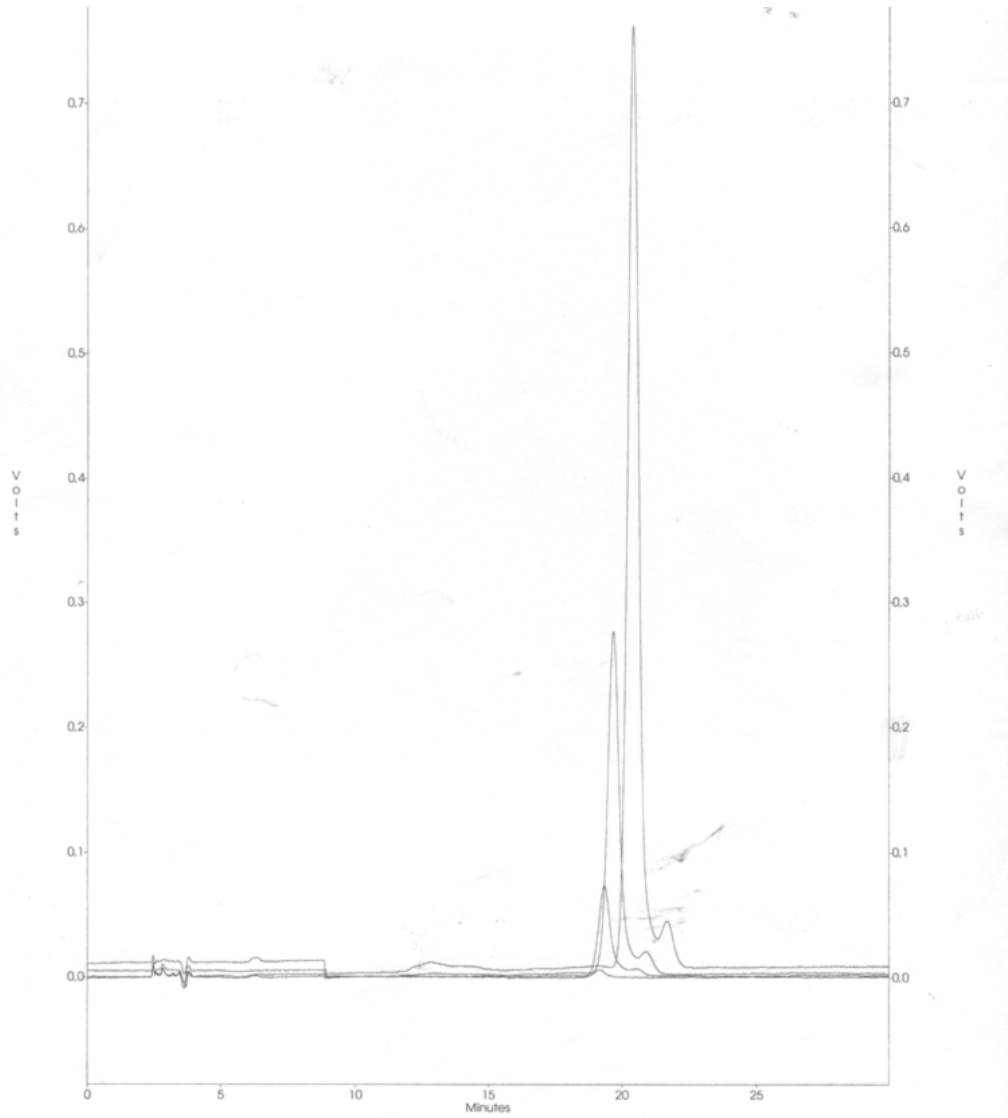
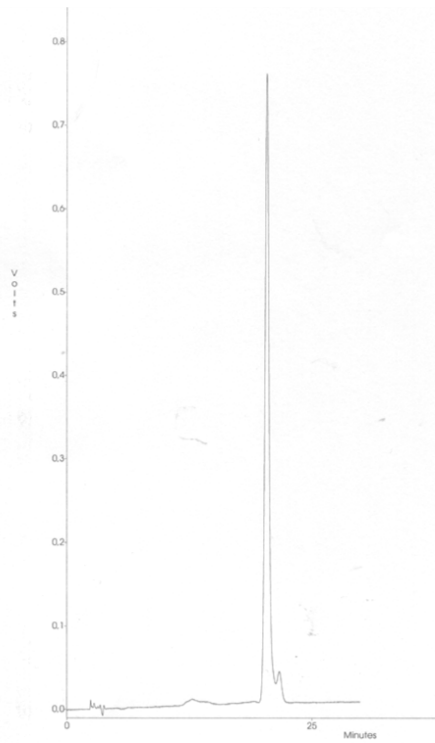
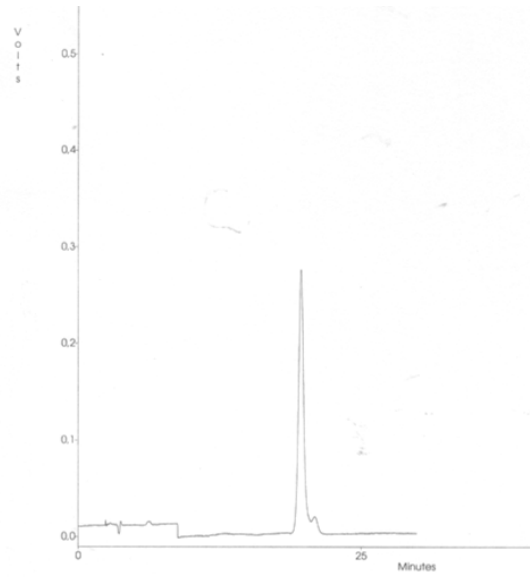


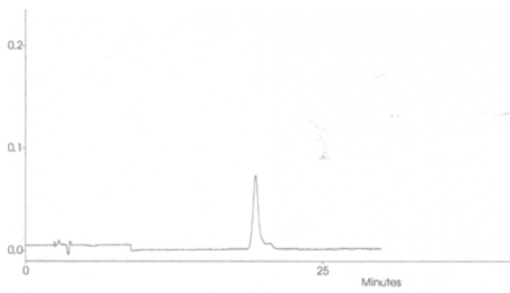
Abbildung 23: HPLC-Chromatogramme des β -Carotin Standards (Tab.7)



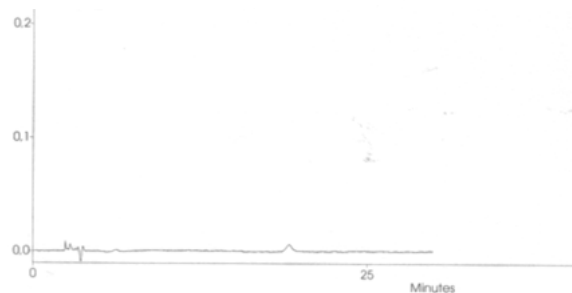
a1



a2



a3



a4

Abbildung 24: HPLC-Chromatogramme (a1, a2, a3, a4) des β -Carotin Standards (Tab.7) einzeln

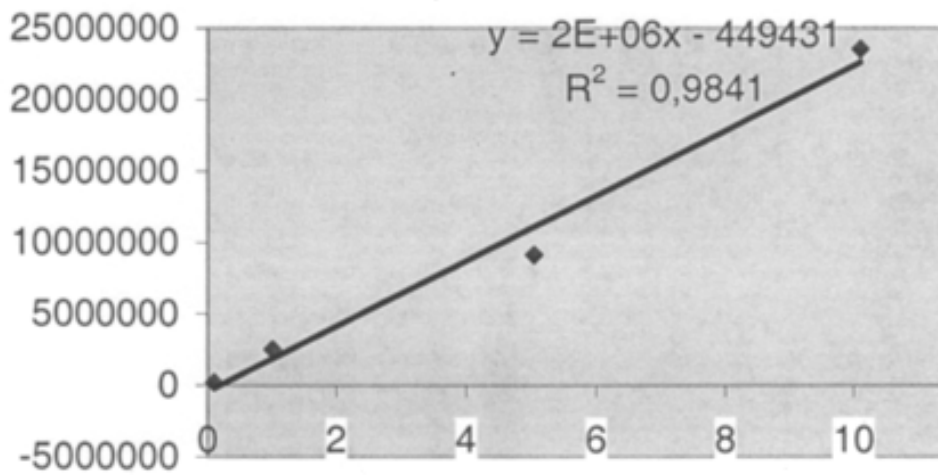


Abbildung 25: β -Carotin Kalibrationsgerad

3.3. Herstellung der verwendeten Lösungen und Laufmittel

3.3.1. Extraktionslösung für Tomaten

Dafür wurden für jede Probe 100 ml einer 1:1 Lösung n-Hexan-Diethylether hergestellt [ARUNA et al., 2009]. Dazu wurden 50 ml n-Hexan mit 50 ml Diethylether in einem Messkolben vermischt und zur zerkleinerten Probe zugefügt.

3.3.2. Laufmittel (mobile Phase) der HPLC

Da nur 2 Pumpen zur Verfügung standen wurde für eine Pumpe in binäres Gemisch hergestellt. Dafür wurden 90 ml Methanol und 60 ml Dichlormethan in einem Messkolben vermischt und in eine 150 ml Laborflasche überführt. An Pumpe A wurde reines Acetonitril angeschlossen und an Pumpe B die Methanol-Dichlormethan-Mischung. Beides wurde vor der Verwendung entgast.

3.4. Probenaufbereitung

3.4.1. Extraktion des Fischöls und des Eieröls

Die Lipidextraktion erfolgte nach BLIGH et al., (1959) und wurde unter Vermeidung von Licht durchgeführt.

Tabelle 8: Herstellungsschritte von Lachs- und Eieröl

Schritt	Lachs	Ei
	2 Teile Methanol 1 Teil Chloroform 0,8 Teile H ₂ O entspricht 1 Teil Fisch	2 Teile Methanol 1 Teil Chloroform 0,8 Teile H ₂ O
1	⇒ 20 ml Methanol 10 ml Chloroform 10 g Lachs in einen 150 ml	⇒ 20 ml Methanol 10 ml Chloroform 5 g Dotter + 5ml H ₂ O in einen 150 ml

	Erlenmeyerkolben geben	Erlenmeyerkolben geben
2	schütteln	schütteln
3	1 Teil (10 ml) Chloroform zufügen	1 Teil (10 ml) Chloroform zufügen
4	schütteln	schütteln
5	1 Teil (10 ml) H ₂ O zufügen	1 Teil (10 ml) H ₂ O zufügen
6	⇒ den Fettteil, der die untere Phase bildet, in einem Scheidetrichter abnehmen	⇒ den Fettteil, der die untere Phase bildet, in einem Scheidetrichter abnehmen
7	⇒ mit Stickstoff die Lösungsmittelreste abdampfen und anschließend verseifen	⇒ mit Stickstoff die Lösungsmittelreste abdampfen und anschließend verseifen

3.4.2. Verseifung

Die Verseifung wurde nach RODRIGUEZ-AMAYA, (2001) durchgeführt. Die Substanzen wurden in einem Pyrexröhrchen vermischt und nach unten angeführtem Schema behandelt.

Tabelle 9: Behandlungsschritte von Lachs- und Eieröl

Schritt	Lachs und Ei
1	10 ml Lachsöl + 10 ml Petrolether + 10 ml Methanol mit 1 g Kaliumhydroxid
2	mit Stickstoff begasen und verschließen
3	über Nacht im Dunkeln stehen lassen
4	obere Phase abnehmen
5	Lösung aus 80 ml Petrolether und 20 ml Diethylether herstellen
6	untere Phase der Verseifung 3x mit obriger Lösung waschen, bis keine Rosafärbung mehr in die obere Phase geht
7	alle oberen Phasen vereinigen

8	zur Neutralisation 5x mit H ₂ O dest. waschen
9	obere Phase abnehmen
10	mit Stickstoff trockendampfen
11	mit n-Hexan auf 2 ml verdünnen und in Braunglas Vials füllen, mit Stickstoff begasen zur Vermeidung von Sauerstoff und in HPLC einspritzen

3.5. Dünnschichtchromatographie

Um möglichst reines Lycopin zu erhalten, das als Standard benutzt werden könnte, wurde eine Dünnschichtchromatographieplatte mit Tomatenextrakt präpariert.

3.5.1. Herstellung des Tomatenextraktes und Laufmittel

Dazu wurden 30 g Tomaten im Mixer unter Vermeidung direkter Sonneneinstrahlung zerkleinert und mit 50 ml : 50 ml n-Hexan-Diethylether [ARUNA et al., 2009] ausgeschüttelt. Danach wurde die Probe über einen Plastiktrichter mit Faltenfilter in einen Rundkolben überführt und im Rotavapor fast bis zur Trocknung eingedampft [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]. Die Substanz wurde in eine Epruvette überführt und der Rundkolben 3x mit 3 ml n-Hexan gespült und die erhaltenen Flüssigkeiten in der Epruvette vereinigt. Danach wurde die Flüssigkeit im Heizblock mit Stickstoff bis zur Trocknung eingedampft und mit Heptan verdünnt.

Als Laufmittel wurde eine Mischung 10:4:1 Petroleumether-Aceton-Diethylamin [MATEOS R. et al, 2006] verwendet. Von diesem Laufmittel wurden 100 ml (70 ml Petroleumther – 28 ml Aceton – 7 ml Diethylamin) hergestellt.

3.5.2. Durchführung

Es wurde für diesen Versuch eine DC-Silicagel-Platte GF 254 von MERCK® mit 0,2 mm Partikelgröße laut MATEOS et al., (2006) verwendet.

Die Platte wurde 30 min lang bei 120°C im Trockenschrank getrocknet und anschließend im Exsikkator abgekühlt. Anschließend wurde die Probe auf ca. 5 cm der Breite der Platte aufgetragen und daneben zum Vergleich ca. 5 cm (200µl) β-Carotin Standard a2 (5,05 mg/l). So präpariert wurde die Platte in die Entwicklungskammer mit dem Laufmittel gegeben und bis zur fertigen Entwicklung (ca. 60 min) stehen gelassen.

Da sich keine Auftrennung der Carotinoide zeigte sondern die Probe mit der Laufmittelfront mitwanderte wurde die Platte umgedreht und in eine Entwicklungskammer mit reinem Petrolether gestellt.

Dadurch kam es aufgrund der sehr geringen Polarität der Carotinoide zu einer sehr guten Auftrennung, da diese mit dem unpolaren Petolether mitwandern.

Die Platte wurde anschließend mit einer UV-Lampe (254 nm) untersucht, die Banden mit einem Bleistift markiert und abgekratzt. Das erhaltene Pulver wurde in Methanol-Dichlormethan (3:2) und einigen Tropfen Aceton gelöst und über Natriumsulfat welches sich in einer Pasteurpipette über etwas Glaswolle befand wasserfrei gemacht.

Das Eluat wurde mit Stickstoff eingedampft, in Methanol-Dichlormethan (3:2) gelöst und in die HPLC eingespritzt.

3.5.3. Berechnung der Rf-Werte

Die Rf-Werte wurden nach folgender Formel berechnet:

$R_f = \text{Laufstrecke der Probe} / \text{Laufstrecke des Laufmittels}$

3.6. Tomaten

3.6.1. Trockenmassebestimmung

Die Trockenmassebestimmung wurde für die frischen Tomatenproben durchgeführt.

3.6.1.1. Durchführung

Zur Bestimmung der Trockenmasse wurde eine Glaspetrischale genommen und das Gewicht notiert. Die Proben (1-5, siehe Tab.3) wurden im Mixer zerkleinert, je ca. 100 g eingewogen und auf der Glaspetrischale verteilt. Danach wurden die Proben für 24 h bei 50°C im Trockenschrank getrocknet und anschließend im Exsikkator ausgekühlt und erneut gewogen.

Die Proben der Napoli Sauce (Probe 6, vgl. Tab. 3) und der Tomatencreme Suppe (Probe 7, vgl. Tab. 3) lagen bereits in getrockneter Form vor und es wurde vom Nassegewicht (Probe 6: 125 ml, Probe 7: 150 ml; Trockengewicht: 6: 24 g, 7: 18 g) in zubereiteter Form die Prozente der Trockenmasse berechnet.

3.6.1.2. Auswertung

Der prozentuelle Trockenmassegehalt wurde mit folgender Formel berechnet.

$$T(\%) = 100 \times (E-F) / A$$

A = Ausgangsgewicht ohne Glaspetrischale

E = Endgewicht mit Glaspetrischale

F = Gewicht Glaspetrischale

3.6.2. Tomatenextrakte der frischen Tomaten



Abbildung 26: Verwendete Tomaten (vgl. Tab. 3)

Die jeweiligen Tomaten wurden im Osterizer zerkleinert und von jeder der drei Proben je 100 g eingewogen und je mit einer Mischung 1:1 (50 ml:50 ml) n-Hexan-Diethylether [ARUNA et al., 2009] ausgeschüttelt. Danach wurde die Probe über einen Plastiktrichter mit Faltenfilter in ein Becherglas gefiltert und durch eine Pasteurpipette mit etwas Glaswolle und Natriumsulfat gefüllt und so wasserfrei gemacht. Die erhaltene Flüssigkeit wurde in einen Rundkolben überführt und im Rotavapor fast bis zur Trocknung eingedampft. Die Substanz wurde in eine Eprovette überführt und der Rundkolben 3x mit einigen ml n-Hexan gespült und die erhaltenen Flüssigkeiten in der Eprovette vereinigt. Danach wurde die Flüssigkeit im Heizblock mit Stickstoff bis zur Trocknung eingedampft und mit 2 ml n-Hexan verdünnt in Braunglas Vials gefüllt, mit Stickstoff zur Vermeidung von Sauerstoff begast und in die HPLC eingespritzt und bei 470 nm [BUSHWAY, 1986] gemessen.

3.6.3. Tomatenextrakte der gekochten Tomaten

Die jeweilige Probe wurde in Bechergläser eingewogen (je 100 g pro Probe) und im Trockenschrank bei 160°C 30 min erhitzt. Anschließend wurde die Probe mit dem Becherglas wieder gewogen und so das Endgewicht ermittelt.

Danach wurden die Proben im Mixer zerkleinert und je mit einer Mischung 1:1 (50 ml:50 ml) n-Hexan-Diethylether [ARUNA et al., 2009] ausgeschüttelt. Anschließend wurde die Probe über einen Plastiktrichter mit Faltenfilter in ein Becherglas gefiltert und durch eine Pasteurpipette mit etwas Glaswolle und Natriumsulfat gefüllt und auf diese Weise wasserfrei gemacht. Die erhaltene Flüssigkeit wurde in einen Rundkolben überführt und im Rotavapor fast bis zur Trocknung eingedampft. Die Substanz wurde in eine Eprovette überführt und der Rundkolben 3x mit einigen ml n-Hexan gespült und die erhaltenen Flüssigkeiten in der Eprovette vereinigt. Danach wurde die Flüssigkeit im Heizblock mit Stickstoff bis zur Trocknung eingedampft und mit 4 ml n-Hexan verdünnt, in Braunglas Vials gefüllt, mit Stickstoff begast und in die HPLC eingespritzt und bei 470 nm [BUSHWAY, 1986] gemessen.

3.6.4. Tomatenextrakte der Tomatenprodukte



Abbildung 27: Verwendete Tomatenprodukte (v.l.n.r: Probe 4, 5, 6, 7)

Bei allen Proben wurde unter möglichster Vermeidung von Licht gearbeitet.

3.6.4.1. Durchführung geschälte Tomaten (Probe 4)

Die Probe 4 (lt. Tab. 3) wurde im Osterizer zerkleinert, ca. 100 g eingewogen und mit einer Mischung 1:1 (50 ml:50 ml) n-Hexan-Diethylether [ARUNA et al., 2009] ausgeschüttelt. Anschließend wurde die Probe über einen Plastiktrichter mit Faltenfilter in ein Becherglas gefiltert und durch eine Pasteurpipette mit etwas Glaswolle und Natriumsulfat gefüllt und so wasserfrei gemacht. Die erhaltene Flüssigkeit wurde in einen Rundkolben überführt und im Rotavapor fast bis zur Trocknung eingedampft. Die Substanz wurde in eine Epruvette überführt und der Rundkolben 3x mit einigen ml n-Hexan gespült und die erhaltenen Flüssigkeiten in der Epruvette vereinigt. Danach wurde die Flüssigkeit im Heizblock mit Stickstoff bis zur Trocknung eingedampft und mit 4 ml n-Hexan verdünnt, in Braunglas Vials gefüllt, mit Stickstoff zur Vermeidung von Sauerstoff begast und in die HPLC eingespritzt und bei 470 nm [BUSHWAY, 1986] gemessen.

3.6.4.2. Durchführung Tomatenmark (Probe 5)

Bei Probe 5 (lt. Tab. 3) war eine zuvorige Zerkleinerung nicht notwendig. Es wurden daher ohne vorherige Bearbeitung 10 g Tomatenmark eingewogen ($\hat{=}$ einer Portion für die Herstellung einer Pizza) und mit einer Mischung 1:1 (50 ml:50 ml) n-Hexan-Diethylether [ARUNA et al., 2009] ausgeschüttelt. Anschließend wurde die Probe über einen Plastiktrichter mit Faltenfilter in ein Becherglas gefiltert und durch eine Pasteurpipette mit etwas Glaswolle und Natriumsulfat gefüllt und damit wasserfrei gemacht. Die erhaltene Flüssigkeit wurde in einen Rundkolben überführt und im Rotavapor fast bis zur Trocknung eingedampft. Die Substanz wurde in eine Epruvette überführt und der Rundkolben 3x mit einigen ml n-Hexan gespült und die erhaltenen Flüssigkeiten in der Epruvette vereinigt. Danach wurde die Flüssigkeit im Heizblock mit Stickstoff bis zur Trocknung eingedampft, mit 2 ml n-Hexan verdünnt und diese Flüssigkeit abermals 1:1000 mit n-Hexan verdünnt, in Braunglas Vials gefüllt, mit Stickstoff begast, zur Vermeidung von Sauerstoff, und in die HPLC eingespritzt und bei 470 nm [BUSHWAY, 1986] gemessen.

3.6.4.3. Durchführung Napoli Sauce (Probe 6) und Tomatencremesuppe (Probe 7)

Da Probe 6 und 7 (lt. Tab. 3) bereits in Pulverform vorlagen, war auch hier keine Zerkleinerung notwendig.

Es wurden von Probe 6 24 g eingewogen (\cong 1 Portion laut Packungsangabe) und von Probe 7 18 g (\cong 1 Portion laut Packungsangabe). Die jeweilige Probe wurde mit einer Mischung 1:1 (50 ml:50 ml) n-Hexan-Diethylether [ARUNA et al., 2009] ausgeschüttelt. Anschließend wurde die Probe über einen Plastiktrichter mit Faltenfilter in ein Becherglas gefiltert und durch eine Pasteurpipette mit etwas Glaswolle und Natriumsulfat gefüllt und damit wasserfrei gemacht. Die erhaltene Flüssigkeit wurde in einen Rundkolben überführt und im Rotavapor fast bis zur Trocknung eingedampft. Die Substanz wurde in eine Eprovette überführt und der Rundkolben 3x mit einigen ml n-Hexan gespült und die erhaltenen Flüssigkeiten in der Eprovette vereinigt. Danach wurde versucht, die Flüssigkeit im Heizblock mit Stickstoff bis zur Trocknung einzudampfen. Es blieb allerdings bei beiden ein fettiger Rest. Daher wurde die Probe mit 2 ml n-Hexan verdünnt und verseift.

3.6.4.3.1. Verseifung von Probe 6 und 7

Die Verseifung wurde laut RODRIGUEZ-AMAYA, (2001) und HART et al., (1995) durchgeführt (siehe Tab. 10). Die Verseifung wurde in einem Pyrexröhrchen (40 ml) durchgeführt.

Tabelle 10: Verseifungsschritte der Proben 6 und 7

Schritt	
1	2 ml Probe + 10 ml Petrolether + 10 ml Methanol mit 1 g Kaliumhydroxid
2	mit Stickstoff begasen und verschließen
3	über Nacht im Dunkeln stehen lassen
4	obere Phase abnehmen



Abbildung 28: Phasentrennung nach Verseifung der Probe 6 und 7 (lt. Tab. 10)

3.6.4.3.2. Bearbeitung der unteren Verseifungsphase

Dies ist notwendig, da auch bei dieser Probe eine Gelbfärbung der unteren Verseifungsphase gefunden wurde. Das Prozedere wurde durch verschiedene Versuche an anderen Ölen ermittelt und ist ausführlicher als beim Lachs und Eiöl, da sich zeigte, dass die Lachs- und Ei-Vorgehensweise bei anderen Ölen nicht zum gewünschten Ergebnis führte und die Gelbfärbung sich nicht auswaschen ließ.

Tabelle 11: Bearbeitungsschritte der unteren Verseifungsphase (von Probe 6 und 7)

5	Zugabe von 2 ml einer Lösung aus 80:20 Petrolether-Diethylether [RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]
6	Lösungsmittel abdampfen, bis kein Restwasser mehr vorhanden ist
7	1 Schaufel Natriumsulfat zugeben
8	4 ml 1-Propanol zugeben
9	4 ml Aceton zugeben
10	in Zentrifuge die festen Bestandteile abzentrifugieren
11	Flüssigkeit abnehmen und eindampfen
12	6 ml einer 1:1 Mischung aus H ₂ O dest. und n-Hexan zugeben
13	1 ml Hexan zugeben => es bilden sich 2 Phasen (gelb aus der unteren Phase geht in obere Phase)
14	obere Phase abnehmen
15	Schritt 12-14 noch 2x wiederholen und obere Phasen vereinigen
16	die vereinigten oberen Phasen mit der in Schritt 4 erhaltenen oberen Phase vereinigen
17	zur Neutralisation 5x mit H ₂ O dest. waschen
18	obere Phase abnehmen
19	mit Stickstoff trockendampfen

20	Mit 2 ml n-Hexan verdünnen und in Braunglas Vials füllen, mit Stickstoff begasen zur Vermeidung von Sauerstoff und in HPLC einspritzen und bei 470 nm messen.
----	---

3.7. Kalibration des Lycopins

3.7.1. Präperative Aufreinigung

Zur Analyse wurde das Tomatenextrakt der Probe 2a (lt. Tab. 3) im Exsikkator aufgetaut und noch ungelöste Partikel im Ultraschallbad aufgelöst.

Anschließend wurde die Flüssigkeit über eine Silica-Säule mit angelegtem Vakuum und Petrolether zum Spülen aufgetrennt und die Lycopin-Bande in einer Epruvette aufgefangen. Diese Flüssigkeit wurde mit Stickstoff abgedampft und der übriggebliebene Rest mit 2 ml Petrolether verdünnt. Die Substanz wurde danach in ein Braunglas Vial überführt und in die HPLC eingebracht und bei 470 nm mit einem UV-Detektor gemessen.

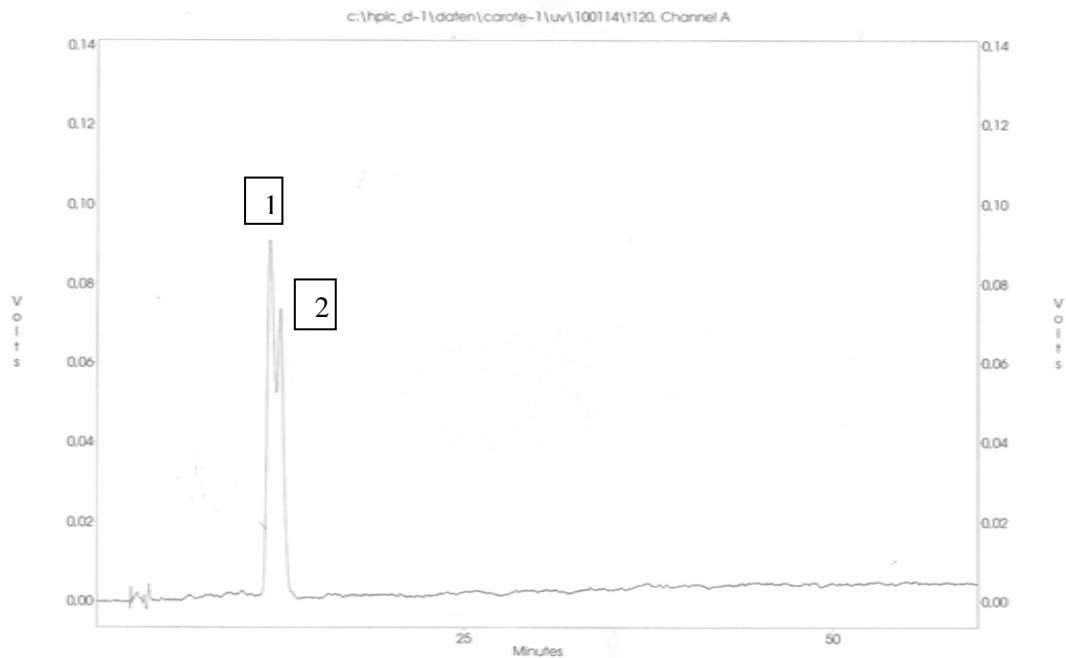


Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm des Lycopins

Retentionszeiten: 1: 11,86 min

2: 12,58 min

Dieselbe Substanz wurde außerdem in einer Quarzglasküvette im Photometer (Hitachi U-2900 Spectrophotometer) gemessen, nachdem ein Nullabgleich mit Petrolether durchgeführt wurde.

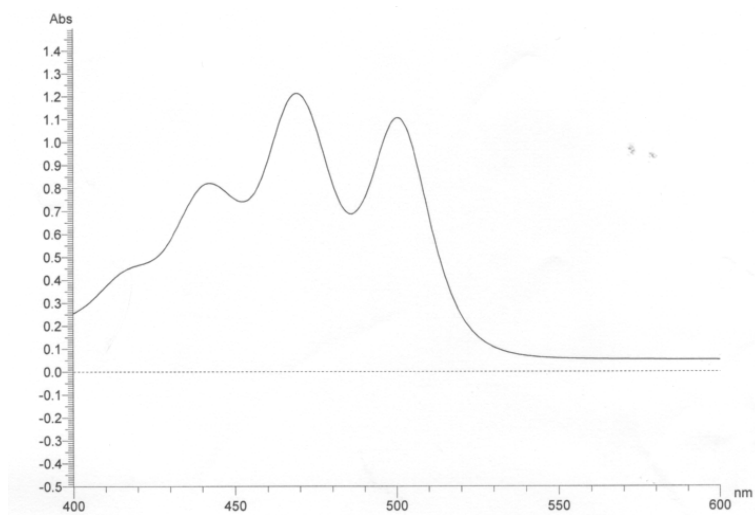


Abbildung 30: Absorptionsspektrum des Lycopins

Aus der ermittelten Extinktion (= 1,131) wurde die Konzentration des Lycopins mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt.

$$E = c \times d \times E(\text{mol})$$

=>

$$c = E / E(\text{mol})$$

$$c = 1,131 / 3450 = \underline{0,0003278 \text{ mol/l}}$$

E = Extinktion = engl. Absorption = 1,131

c = Konzentration

d = Schichtdicke = 1 cm

E (mol) = molarer Extinktionskoeffizient des Lycopins in Petrolether = 3450
[RODRIGUEZ-AMAYA, 2001]

3.7.2. Berechnung der Konzentration in mg/l

β -Carotin-Summenformel: C₄₀H₅₆

Molmasse des β -Carotins: 536,88 g/mol

$$m = n \times M$$

$$m = 0,0003278 \times 536,88 = 0,176$$

$$\Rightarrow \underline{\text{Konzentration des Lycopins} = cL = 0,176 \text{ mg/l}}$$

m = Masse in g

n = mol Menge

M = Molmasse

3.7.3. Berechnung der Lycopin-Konzentration

3.7.3.1. Berechnung des Responsefaktors für Lycopin

Danach wurde aus 1,7 ml β -Carotin Standard Stocklösung ($c = 101 \text{ mg/l}$), aufgefüllt auf 10 ml mit Petrolether, eine Lösung mit einer Konzentration von $c = 0,17 \text{ mg/l}$ hergestellt.

1 ml dieser Lösung mit $c = 0,17 \text{ mg/l}$ und 1 ml der obigen Lycopin Lösung mit $c = 0,176 \text{ mg/l}$ wurden anschließend in einem 5 ml Kolben mit Petrolether verdünnt.

Die β -Carotin Konzentration betrug in dieser Lösung daher:

$$c = 0,17 \text{ mg/l} : 5 = 0,034 \text{ mg/l}$$

und die Konzentration des Lycopins in dieser Lösung betrug:

$$c_L = 0,176 \text{ mg/l} : 5 = 0,0352 \text{ mg/l}$$

Diese Lösung wurde in die HPLC eingebracht und sowohl der β -Carotin Peak als auch der Lycopin-Peak vermessen.

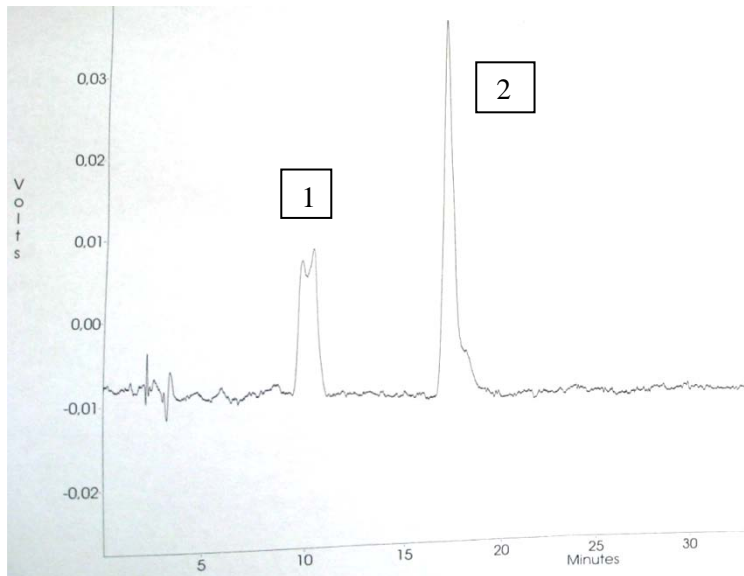


Abbildung 31: HPLC-Chromatogramm der Lösung: Lycopin Peak (1) und β -Carotin Peak (2) gemessen bei 470 nm

Tabelle 12: Retentionszeiten und Peakfläche von Lycopin und β -Carotin

Carotinoid	Retentionszeit Peak	Retentionszeit Peak	Peakfläche gesamt
	1 in min	2 in min	
Lycopin	9,97	10,52	1052473
β -Carotin	17,10	18,07	1861318

Anschließend wurde mit folgender Formel der Faktor berechnet:

K_{β} = Konzentration des β -Carotins

P_{β} = Peakfläche des β -Carotins

f = Faktor

K_L = Konzentration des Lycopins

P_L = Peakfläche des Lycopins

$$K_{\beta} / P_{\beta} = f \times K_L / P_L$$

$$0,034 / 1861318 = f \times 0,0352 / 1052473$$

$$0,000000018 = f \times 0,00000003345$$

$$f = 0,000000018 / 0,00000003345$$

$$= 1,8 \times 10^{-8} / 33,45 \times 10^{-9}$$

$$f = \underline{0,538}$$

Wird die obige Formel nun auf K_L umgeformt, kann durch den nun bekannten Faktor des Abstandes der Peaks von β -Carotin und Lycopin die unbekannte Lycopin-Konzentration einer Probe berechnet werden bzw. eine Lycopin-Kalibrationsgerade erstellt werden, auch wenn nur eine β -Carotin Standard-Kalibrationsgerade vorliegt bzw. die Konzentration einer beliebigen Lycopinprobe errechnet werden, wenn in die Formel eingesetzt wird.

$$K_L = (K_B / P_B \times P_L) / f$$

Für die Berechnung der Lycopinkonzentration in den Tomatenproben wurde also folgende Rechnung herangezogen:

$$\begin{aligned} K_L &= (0,034 / 1861318 \times \text{Peakfläche Lycopin}) / 0,538 \\ &= K_L \text{ in mg/L} : 10 = K_L \text{ in mg/100 ml} \hat{=} \text{mg/100 g Tomatensubstanz} \end{aligned}$$

Lycopingehalt pro 100g Trockenmasse:

$$\text{mg/100g Lycopingehalt} / \text{Trockenmasse} \%$$

Berechnung der β -Carotin Konzentration:

$$K_B = [0,1 \text{ mg/L (Verdünnungsreihe } \beta\text{-Carotin a4)} \times \text{Area des } \beta\text{-Carotins}] / 181903 \text{ (Area von a4)}$$

β -Carotingehalt pro 100g Trockenmasse:

$$\text{mg/100g } \beta\text{-Carotingehalt} / \text{Trockenmasse} \%$$

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Ergebnisse der Lachs- und Ei-Analyse

Bei der Verseifung der beiden Komponenten war zu sehen, dass sowohl die obere Phase als auch die untere gefärbt waren. Da die Carotinoide sich eigentlich in der oberen fettigen Phase befinden sollten war die Färbung der unteren Phase nicht gewünscht. Es ist jedoch anzunehmen, dass sich auch in der unteren Phase Carotinoide befinden, da Lutein beim Ei und Astaxanthin beim Lachs sehr polare Xanthophylle darstellen, die auch eine gute Löslichkeit in alkoholischer Lösung besitzen.



Abbildung 32: Lachsöl und Eieröl vor der Verseifung



Abbildung 33: Lachsöl und Eieröl nach der Verseifung

Wie in Abb. 33 zu erkennen ist, war beim Eieröl sowohl obere als auch untere Phase in gleichem Ausmaß gelb gefärbt wohingegen beim Lachsöl die untere Phase wesentlich stärker rosarot gefärbt war.

Es folgte daher die Ausschüttlung der unteren Phase mit Petrolether und Diethylether in dem sich Teile des Farbanteiles lösten, allerdings nicht alles.

Bei Lachs und Ei zeigte sich, dass sich im Extrakt eher Stoffe gelöst hatten, die sehr früh durch die Säule kamen und es sich daher um Xanthophylle handelt.

Darauf könnte auch hinweisen, da nach Vereinigung der oberen Phase und der Ausschüttlungsflüssigkeit der unteren Verseifungsphase diese Peaks größer wurden. Da die Xanthophylle polarer sind als die Carotinoide, haben diese sich mit hoher Wahrscheinlichkeit in der unteren wässrigen Verseifungsphase befunden.

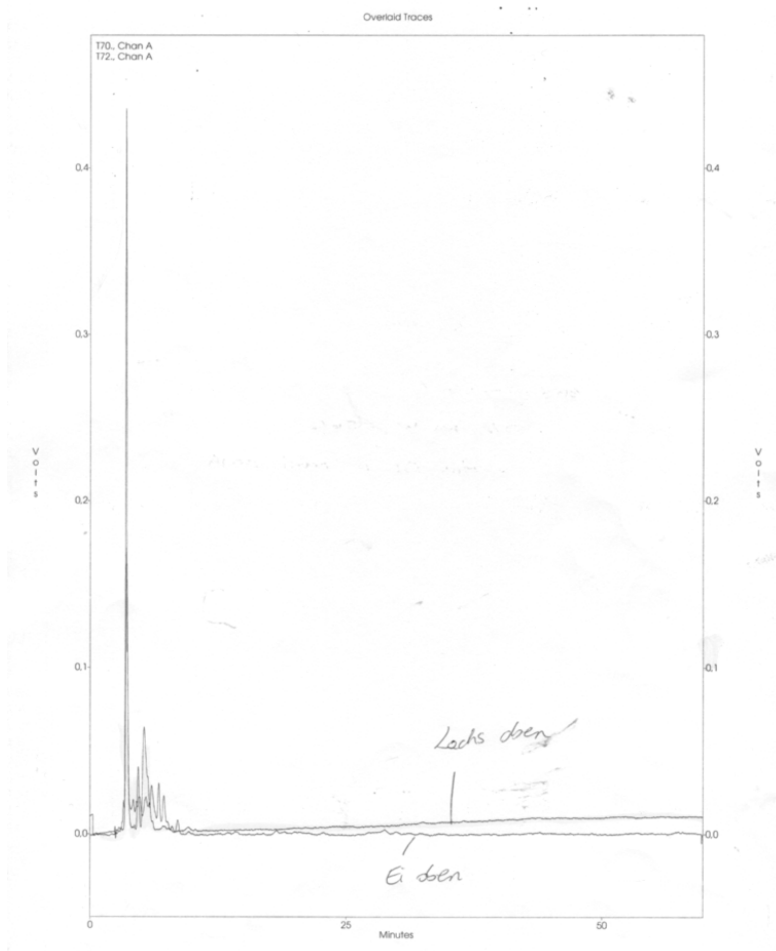


Abbildung 34: HPLC-Trennung der oberen Phase der Verseifung von Lachs- und Eieröl – Lösungsmittel Hexan

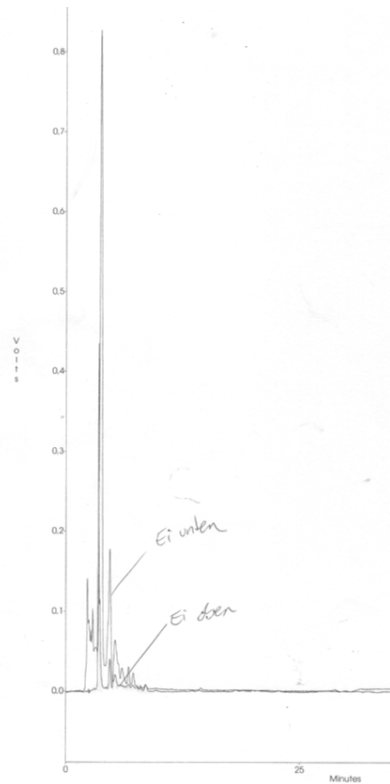


Abbildung 35: HPLC-Trennung der oberen und unteren Eieröl-Verseifungsphase – Lösungsmittel Hexan

4.2. Dünnschichtchromatographie

4.2.1. Dünnschichtchromatographie Platte

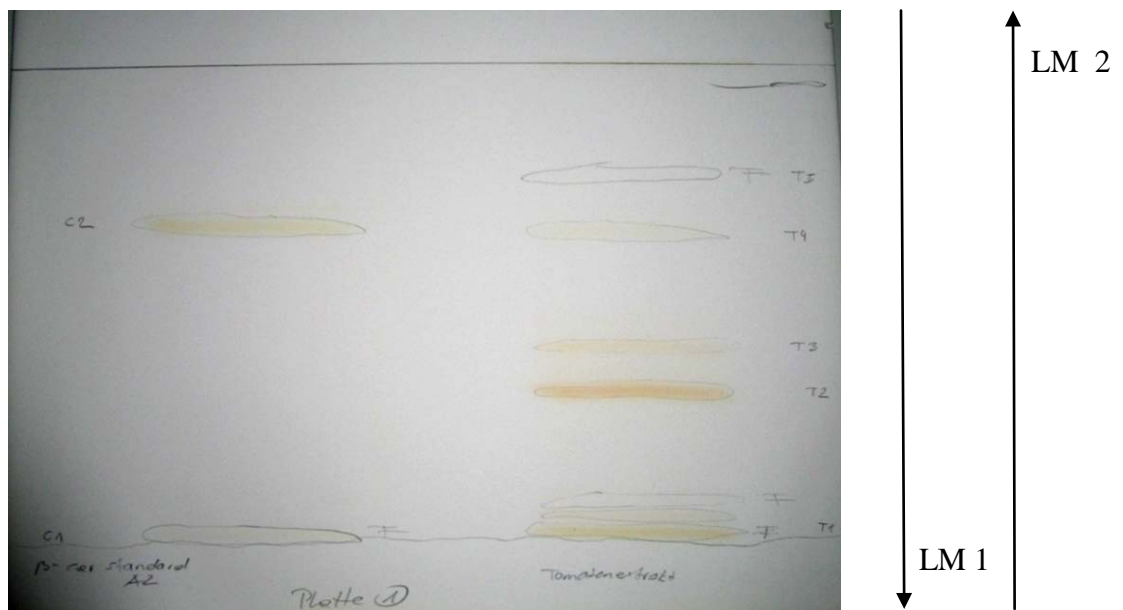


Abbildung 36: Dünnschichtchromatographie Platte: 10:4:1 Petroleumether-Aceton-Diethylamin (LM 1) und anschließend reiner Petrolether (LM 2); Probe links: β -Carotin Standard; Probe rechts: Tomatenextrakt

Tabelle 13: Ergebnisse Dünnschichtchromatographie (T1-T5 und C1, C2 vgl. Abb. 36)

Probe	Rf-Wert
T1	0,02
T2	0,31
T3	0,41
T4	0,64
T5	0,76
β -Carotin Standard	Rf-Wert
C1	0,02
C2	0,65

Das Laufmittel, das bei MATEOS R. und GARCIA-MESA J.A. (2006) verwendet wurde brachte zwar bei Spinat in ihrer Studie gute Ergebnisse, funktionierte aber in diesem Fall nicht und die Auftrennung erfolgte erst nach einem weiteren Lauf in reinem Petrolether. Bei einem zusätzlichen Vorversuch bei dem die Platte mit der selben Probenzusammensetzung zuerst in reinen Petrolether und danach in das Laufmittel aus MATEOS R. und GARCIA-MESA J.A. (2006) gestellt wurde, zeigte sich, dass bei reinem Petrolether ebenfalls keine Auftrennung erfolgte und erst der Lauf in 10:4:1 Petroleumether-Aceton-Diethylamin dies ermöglichte, wobei die Auftrennung in der Reihenfolge - Laufmittel und anschließend reiner Petrolether besser war.

Auf der Platte wurden sowohl farbige Banden als auch nur unter UV-Licht sichtbare Banden gefunden (gekennzeichnet mit F). Da die Rf-Werte von C1 und T1 bzw. C2 und T4 übereinstimmen ist es wahrscheinlich, dass es sich dabei um im Tomatenextrakt enthaltenes β -Carotin handeln.

Da für Lycopin kein Standard vorlag, kann durch das alleinige Betrachten nicht bestimmt werden bei welcher Bande es sich um Lycopin handelt.

Daher folgte eine weitere Untersuchung in der HPLC welche folgende Diagramme ergab:

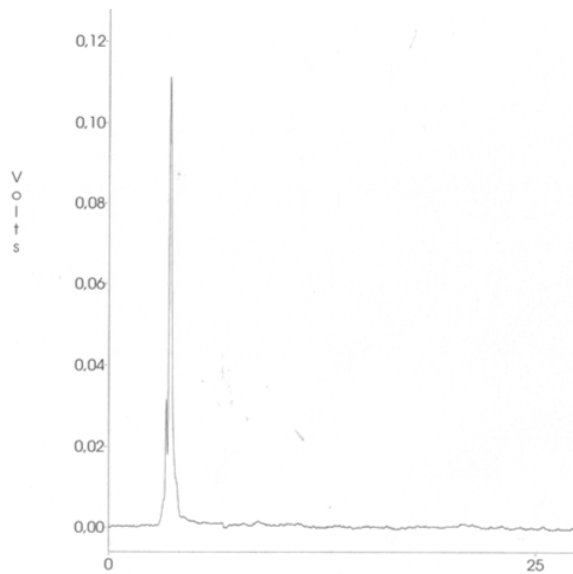


Abbildung 37: HPLC-Trennung der DC-Bande T1

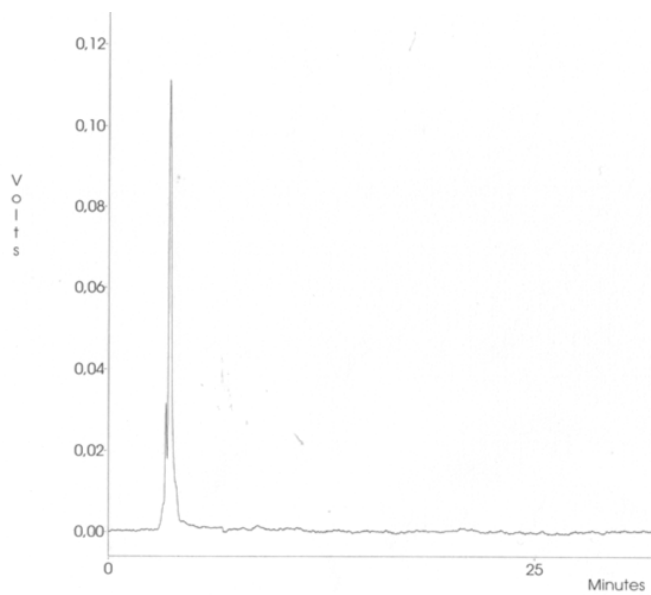


Abbildung 38: HPLC-Trennung der DC-Bande T2

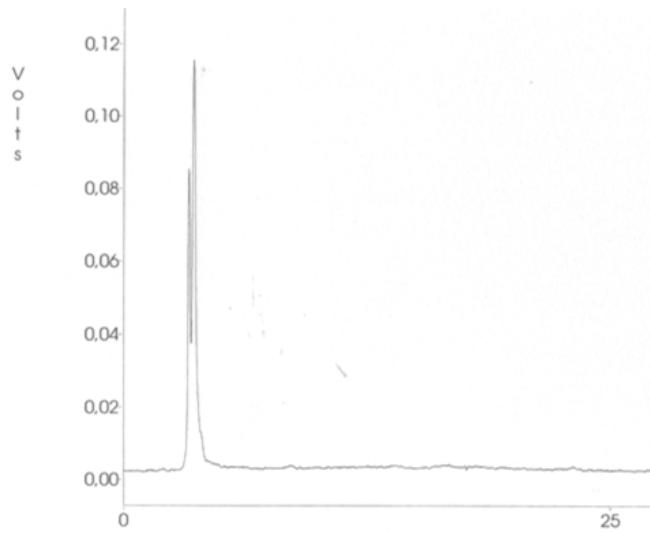


Abbildung 39: HPLC-Trennung der DC-Bande T3

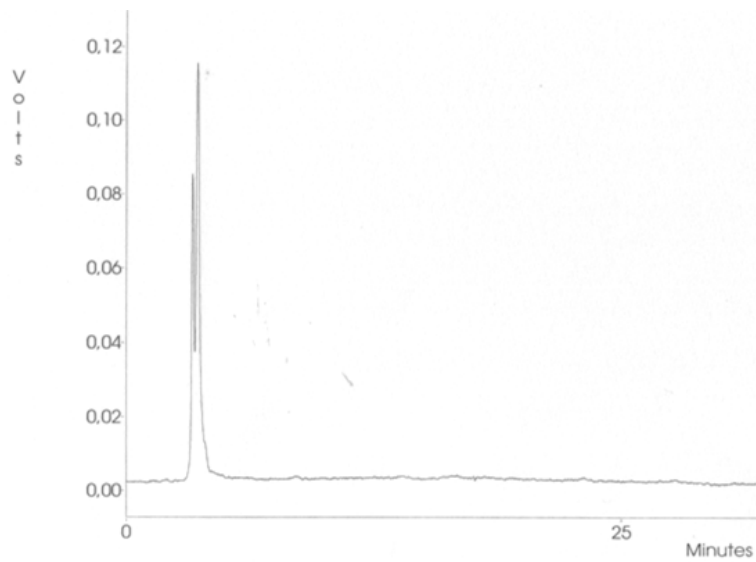


Abbildung 40: HPLC-Trennung der DC-Bande T4

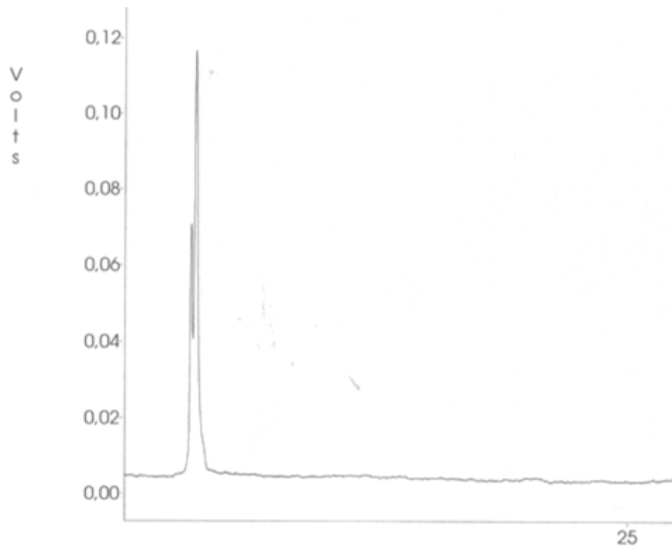


Abbildung 41: HPLC-Trennung der DC-Bande T5

Bei allen HPLC-Läufen der Dünnschichtchromatographie (T1-T5) wurde kein Lycopinpeak gefunden. Möglicherweise war die Konzentration zu gering, da mindestens $10\mu\text{g/ml}$ Lycopin als Nachweisgrenze laut Tab.7 vorhanden gewesen sein müssten um einen Peak zu erkennen.

Da daher bei dieser Methode kein eindeutiger Lycopin Peak gefunden wurde, wurde eine andere Methode gewählt um eine Lycopin Standard zu etablieren.

4.3. Ergebnisse Tomaten

4.3.1. Ergebnisse Trockenmasse

Bei der Trockenmasse zeigte sich, dass die Pannonischen Bio Tomaten mit 6,59 % den niedrigsten Trockenmassegehalt hatten und somit den höchsten Wassergehalt.

Den höchsten Trockenmassegehalt mit 8,37 % hatten die Pannonischen Bio Kirschtomaten, was möglicherweise auf den höheren Schalenanteil zurückzuführen sein könnte, da es sich um mehrere kleine Tomaten anstatt großer Tomaten handelte.

Tabelle 14: Trockenmasse Tomaten in % (Probennr. vgl. Tab. 3)

Nummer	Produkt	Trockenmasse in %
1	Pannonische Kirschtomaten	8,43
2	Pannonische Tomaten	6,59
3	Paradeiser	8,37
1a	Pannonische Kirschtomaten, gekocht	8,43
2a	Pannonische Tomaten, gekocht	6,59
3a	Paradeiser, gekocht	8,37
4	geschälte Dosentomaten	8,40
5	Tomatenmark	36,00
6	Napoli Sauce	19,20
7	Tomatensupp	12,00

4.3.2. Ergebnisse frische Tomaten

Bei den frischen Tomaten hatten die Pannonischen Bio Kirschtomaten (Probe 1) den niedrigsten Anteil an Lycopin, während die Paradeiser (Probe 3) den höchsten Anteil hatten. Dies könnte daran liegen, dass die Paradeiser im Gegensatz zu den anderen beiden Frischtomaten einen höheren Reifegrad aufwiesen und somit eventuell mehr Lycopin enthielten. Allerdings können auch andere Faktoren wie eine andere Sorte oder ein andere Temperatur während des Wachstums eine Rolle spielen [MAIANI G. et al, 2009].

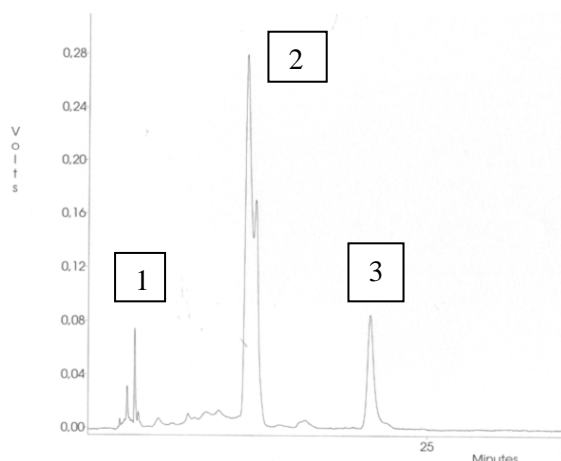


Abbildung 42: HPLC-Chromatogramm der Pannonischen Kirschtomaten (Probe 1)

- 1 = Lösungsmittelpeak und möglicherweise auch Xanthophylle
- 2 = Lycopin Peak mit höherem *trans*-Lycopin Peak und niedrigerem *cis*-Lycopin Peak
- 3 = β -Carotin Peak

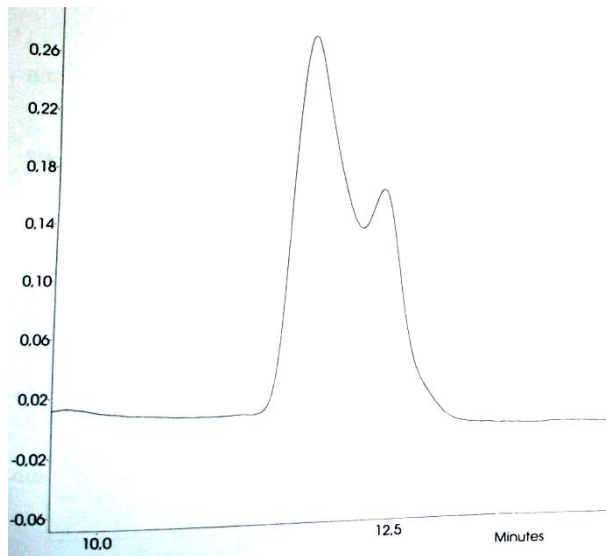


Abbildung 43: Peak Nr. 2 (Lycopin) vergrößert

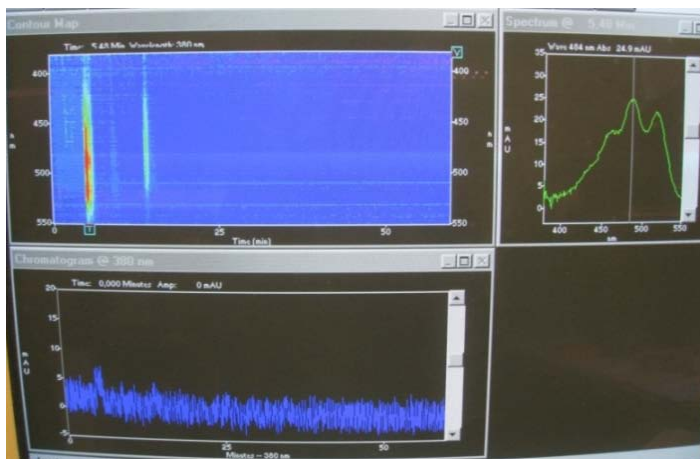


Abbildung 44: HPLC-Chromatogramm der Pannonischen Kirschtomaten (Probe 1) mit PDA-Detektor

Bei dem roten Strich handelt es sich um das durchlaufende Lycopin, während der grüne Strich rechts davon das β -Carotin anzeigt.

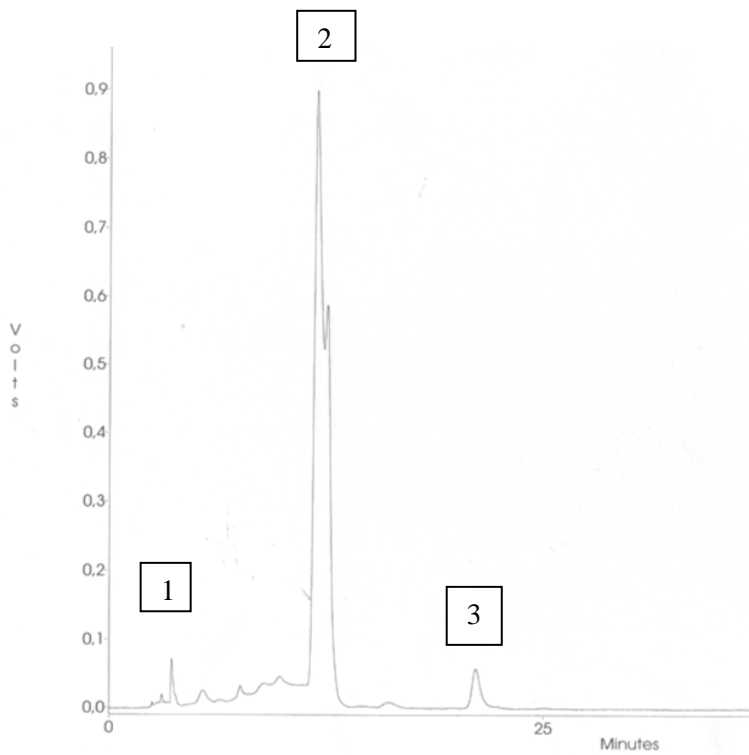


Abbildung 45: HPLC-Chromatogramm der Pannonischen Tomaten (Probe 2)

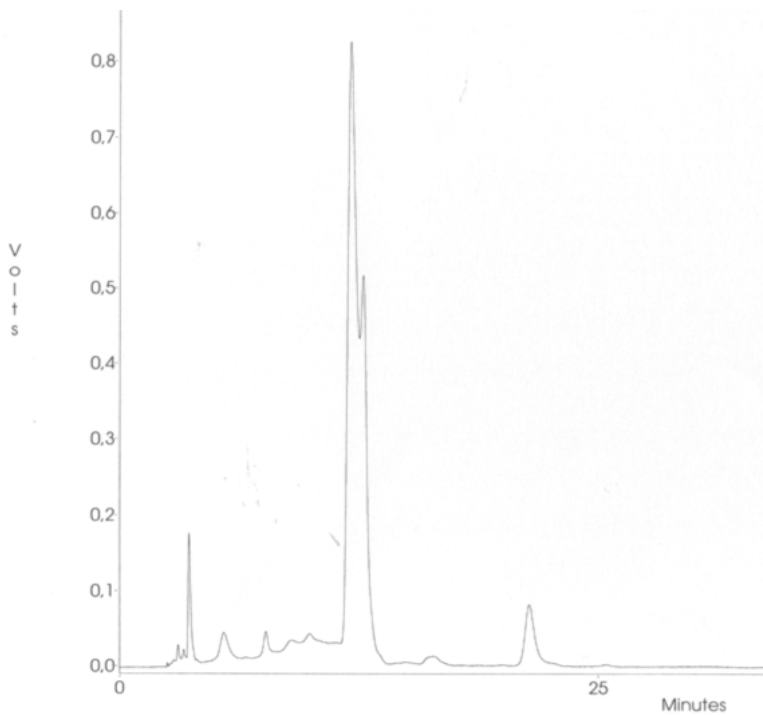


Abbildung 46: HPLC-Chromatogramm der Paradeiser (Probe 3)

Das Diagramm der Probe 3 ist ähnlich dem von Probe 2.

Lycopingehalt der Tomaten

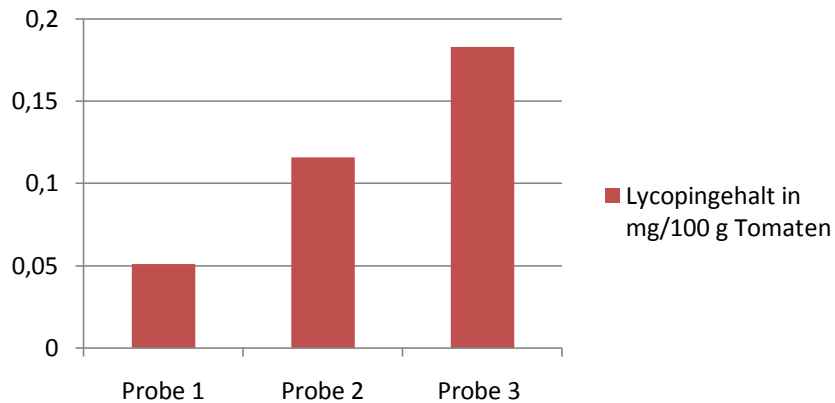


Abbildung 47 : Lycopingehalte der Tomaten

Tabelle 15: Carotinoidgehalte der Tomaten

Probe	mg Lycopin pro 100 g Tomaten	mg Lycopin pro 100 g Trockenmasse der Tomaten	mg β -Carotin pro 100 g Tomaten	mg β -Carotin pro 100 g Trockenmasse der Tomaten
1 (Kirschtomaten)	0,051	0,604	0,203	2,408
2 (Tomaten)	0,116	1,760	0,146	2,215
3 (Paradeiser)	0,183	2,186	0,256	3,059

Die Ergebnisse der rohen Tomaten bewegten sich zwischen 0,051 und 0,183 mg Lycopin /100 g Tomaten wobei die Paradeiser (Probe 3) den höchsten Wert und die Kirschtomaten (Probe 1) den niedrigsten Wert aufweisen. Die Paradeiser haben zudem einen hohen Anteil an Lycopin bezogen auf die Trockenmasse.

Bei den β -Carotin Werten haben hingegen die Pannonischen Tomaten (Probe 2) den höchsten Wert.

4.3.3. Ergebnisse gekochte Tomaten

Bei den gekochten Tomaten hatten ebenfalls die Pannonischen Bio Kirschtomaten den niedrigsten Anteil an Lycopin, während die Paradeiser den höchsten Anteil hatten.

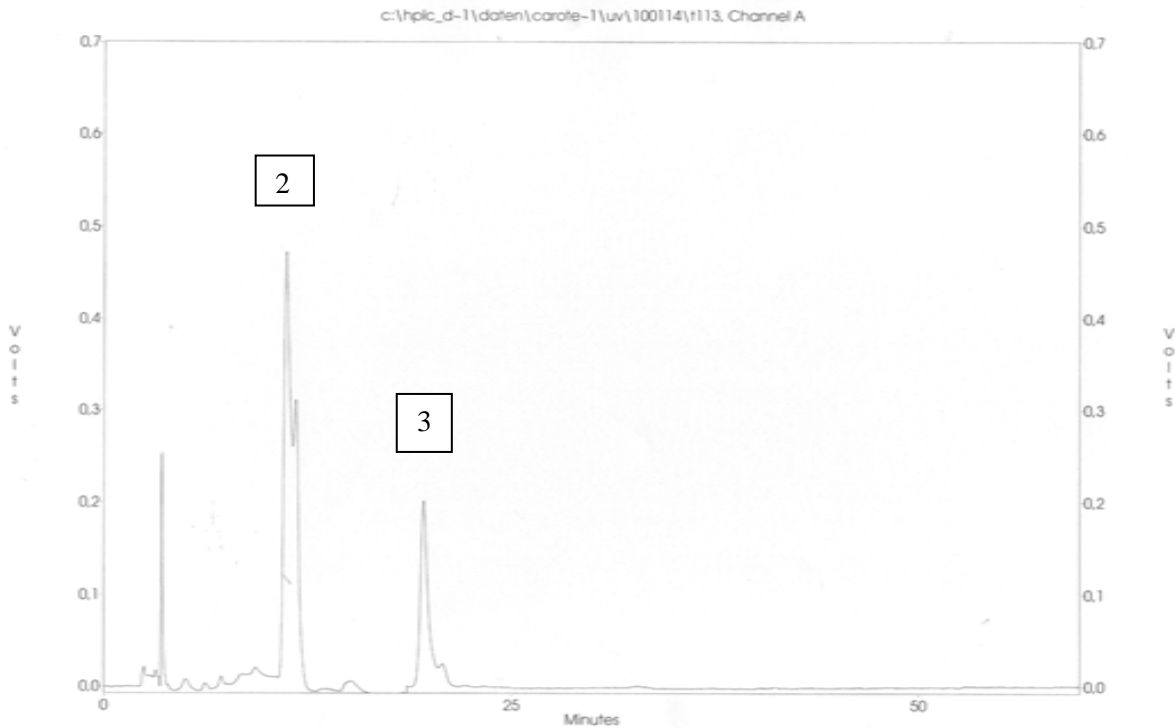


Abbildung 48: HPLC-Chromatogramm der Pannonischen Kirschtomaten gekocht (Probe 1a)

Peak Nr.2 ist im Vergleich zu den rohen Proben 1, 2 und 3 (siehe Tab.3) sehr viel höher wie auch Peak Nr.3. Dies steht im Kontrast zu RUBIO-DIAZ D.E. et al. (2010) bei dem ein Verlust von Carotinoiden durch Erhitzung festgestellt wurde. Allerdings ist speziell all-trans Lycopin sehr stabil gegen thermische Veränderungen [ROCKENDRA G.et al, 2010].

Die höhere Konzentration könnte darauf zu schließen sein, dass durch die Erhitzung und Zerkleinerung die Zellen des Pflanzengewebes aufgebrochen werden und so die Extraktion der Carotinoide erleichtert wird und mehr Carotinoid gelöst werden können wie bei RUBIO-DIAZ D.E. et al. (2010) und MAIANI G. et al. (2009).

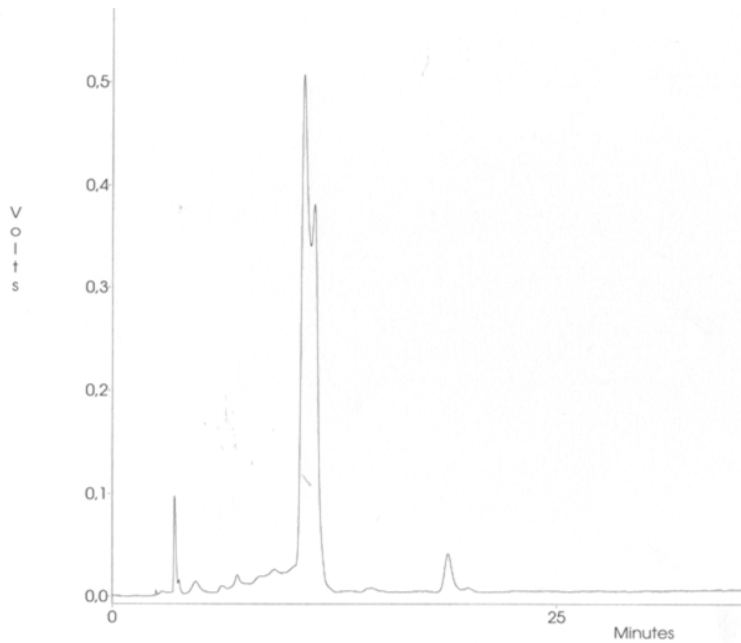


Abbildung 49: HPLC–Chromatogramm der Pannonischen Tomaten gekocht (Probe 2a)

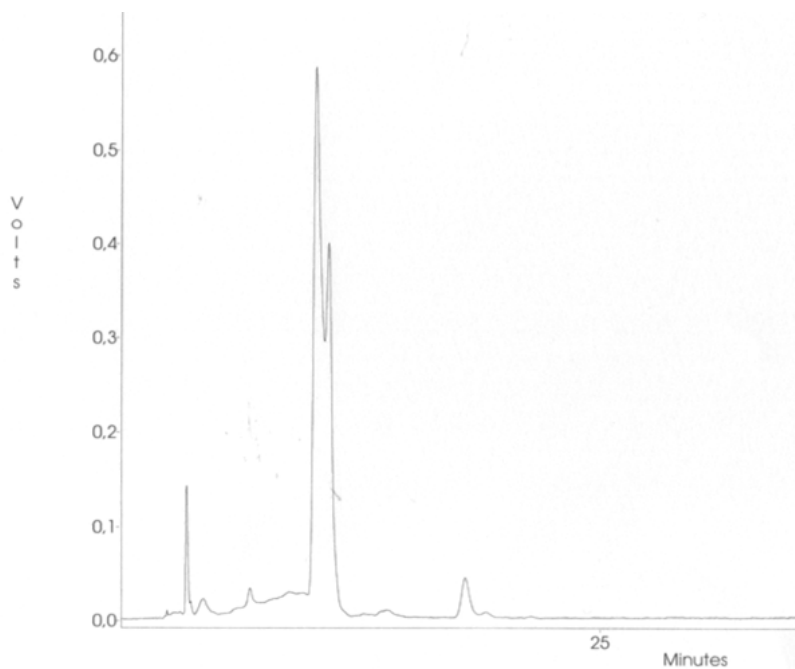


Abbildung 50: HPLC–Chromatogramm der Paradeiser gekocht (Probe 3a)

Auch bei Probe 3a (Paradeiser) zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei Probe 2a (Pannonische Bio Tomaten). Hier ist jedoch die Isomerisierung noch deutlicher zu erkennen.

Lycopingehalt der gekochten Tomaten

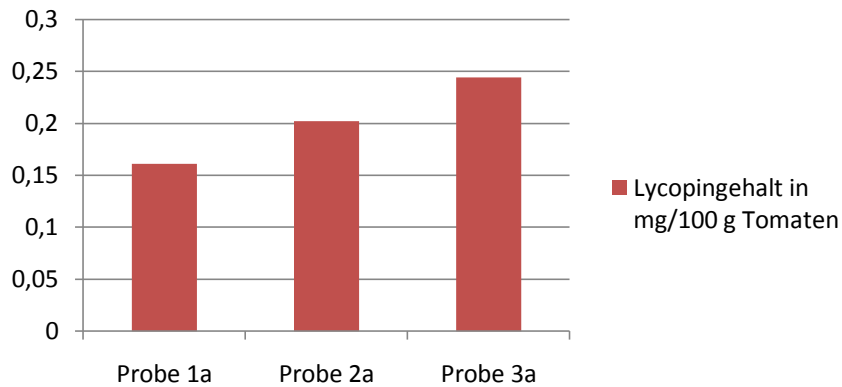


Abbildung 51: Lycopingehalte der gekochten Tomaten

Tabelle 16: Carotinoidgehalte der gekochten Tomaten

Probe	mg Lycopin pro 100 g Probe	mg Lycopin pro 100 g Trockenmasse der Probe	mg β -Carotin pro 100 g Probe	mg β -Carotin pro 100 g Trockenmasse der Probe
1a (Kirschtomaten Bio gekocht)	0,161	1,909	0,464	5,504
2a (Tomaten Bio gekocht)	0,202	3,065	0,099	1,502
3a (Paradeiser gekocht)	0,244	2,915	0,101	1,206

Bei den gekochten Tomaten liegen die Konzentrationen von Lycopin bei allen Proben höher. Vergleicht man die auf die Trockenmasse bezogenen Werte der ungekochten und gekochten Tomaten, so nimmt β -Carotin bei den gekochten Tomaten ab und der Lycopinwert steigt. Das könnte daran liegen, dass durch den Erhitzungsvorgang die Pflanzenmatrix in größerem Ausmaß zerstört wird als bei den rohen Tomaten die nur zerkleinert werden und so das Extraktionsausmaß an Lycopin erhöht wird [MAIANI G. et al, 2009] während β -Carotin hitzelabiler ist und abnimmt.

4.3.4. Ergebnisse der Tomatenprodukte

Bei den Tomatenprodukten hatte wie erwartet das Tomatenmark den höchsten Anteil an Lycopin, während die Tomatencreme Suppe den niedrigsten hatte. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Tomatenmark aus sehr konzentrierten Tomaten besteht. Die Tomatencreme Suppe enthält allerdings wenig Tomatenanteil und es haben auch zusätzlich noch Hitze und Sauerstoff auf das in getrockneter Form vorliegende Produkt bei der Verarbeitung eingewirkt wobei der vorhandene Carotinoid Anteil weiter reduziert wurde.

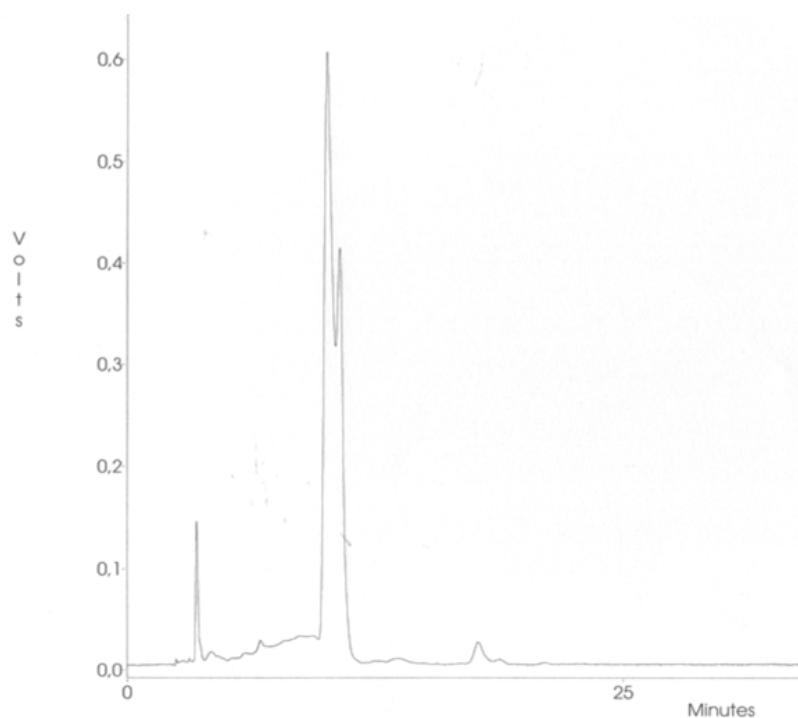


Abbildung 52: HPLC-Chromatogramm der geschälten Tomaten (Probe 4)

Bei den geschälten Dosentomaten in Probe 4 zeigt sich ein ähnliches Bild als bei den erhitzten Tomaten in Probe 3a (Paradeiser, gekocht). Der Lycopingehalt lag etwas höher. Dies liegt möglicherweise daran, da bei der Erhitzung in der Dose (Autoklavieren) das Tomatenprodukt weniger mit Sauerstoff in Kontakt kommt und so das Lycopin in geringerem Ausmaß verändert wird oder eine andere Tomatensorte bzw. ein anderer Reifegrad der Tomaten verwendet wurde. Der β -Carotin Gehalt ist allerdings sehr niedrig. Dies könnte daran liegen, dass β -Carotin instabiler gegen die Verarbeitung ist als Lycopin [ROCKENDRA et al., 2010].

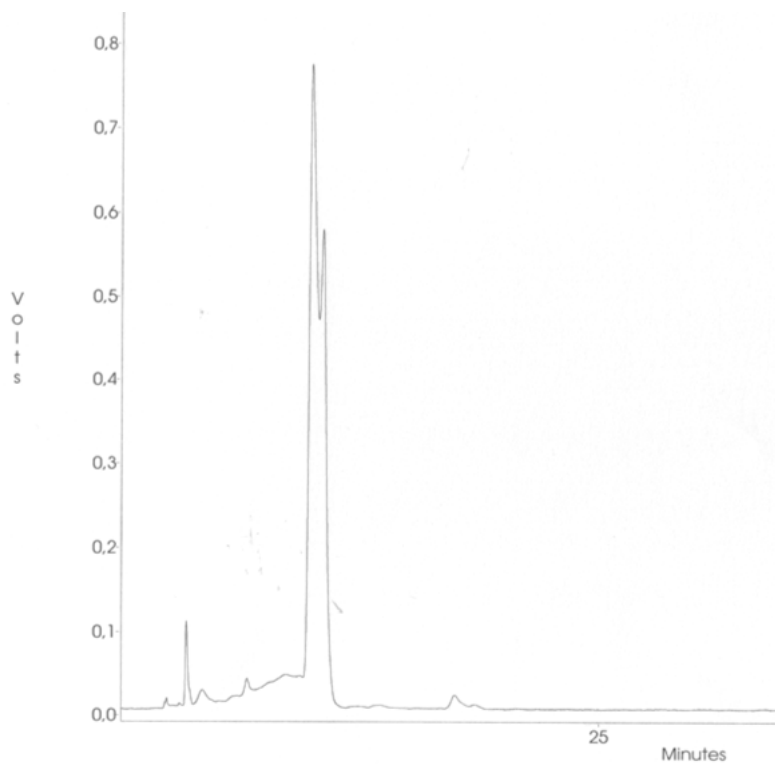


Abbildung 53: HPLC–Chromatogramm des Tomatenmarks (Probe 5)

Im Tomatenmark wurde ein sehr hoher Anteil an Lycopin gefunden, bei dem im Verhältnis das β -Carotin weniger ist als bei den vorhergehenden Proben. Der hohe Anteil an Lycopin ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in dieser Probe die Tomaten in sehr konzentrierter Form vorliegen.

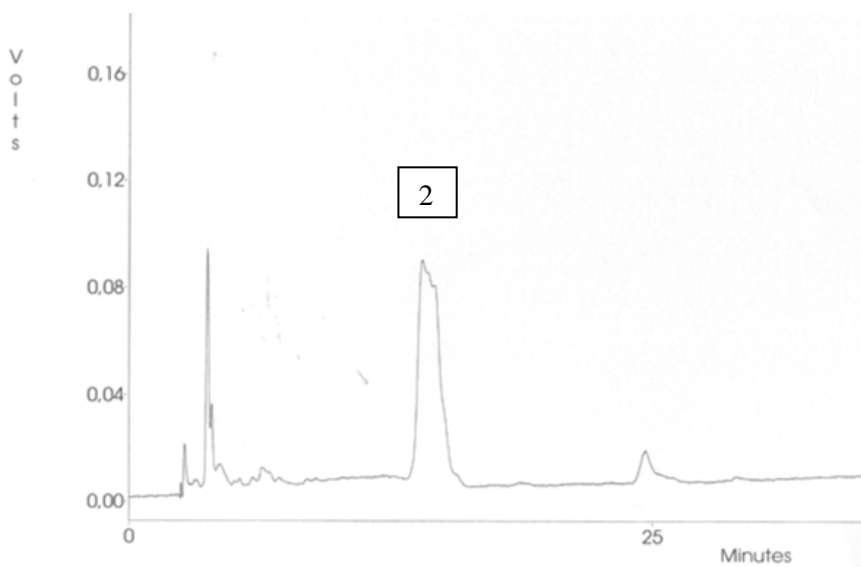


Abbildung 54: HPLC–Chromatogramm der Napoli Sauce (Probe 6)

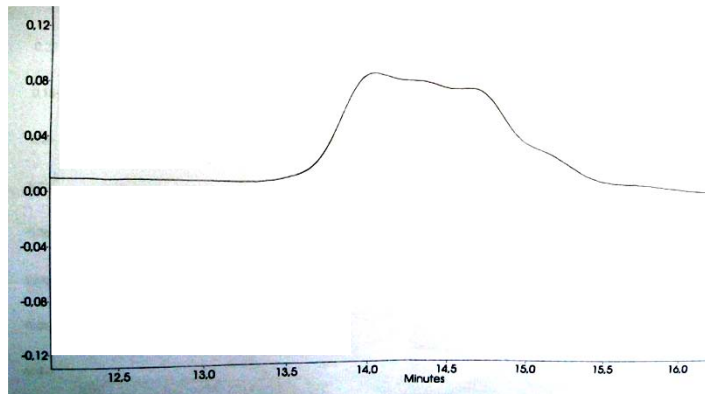


Abbildung 55: Peak Nr. 2 (Lycopin) vergrößert

Trotz der Verarbeitung zeigt sich bei Probe 6 (Napoli Sauce) dennoch ein deutlicher Lycopin und β -Carotin Peak. Der Lycopin Peak ist jedoch verbreitert und zeigt keine deutliche Spitze was möglicherweise auf eine Isomerisierung der Carotinoide schließen lässt. Da die Auftrennung der *cis*- und *trans*- Isomere mit der verwendeten C18 Säule nicht möglich war und es auch nicht das Ziel dieser Arbeit war die Isomere aufzutrennen ist es unmöglich genauer darauf einzugehen.

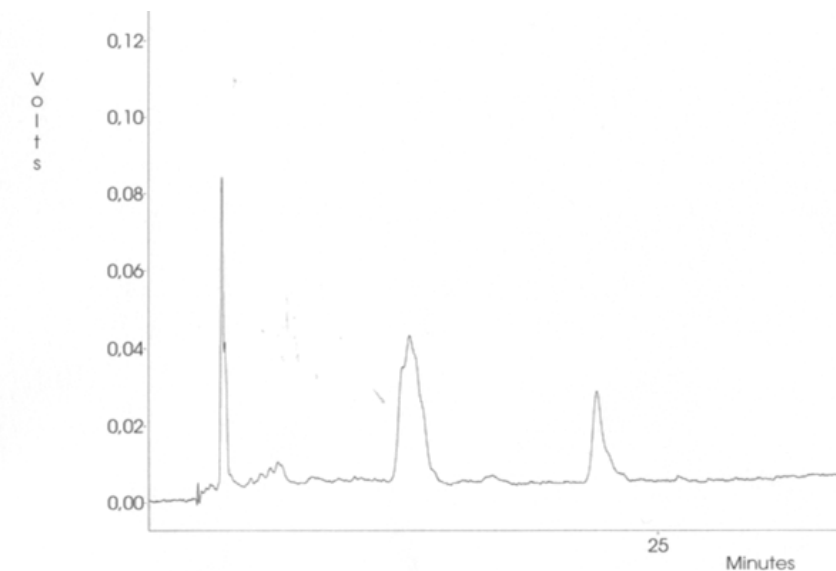


Abbildung 56: HPLC-Chromatogramm der Tomatencreme Suppe (Probe 7)

Auch bei Probe 7 (Tomatensuppe) zeigt sich ein deutlicher Lycopin und β -Carotin Peak, wobei der Lycopin Peak schon deutlich niedriger und verbreitert ist. Der β -Carotin Peak ist jedoch höher als in Probe 6 (Napoli Sauce).

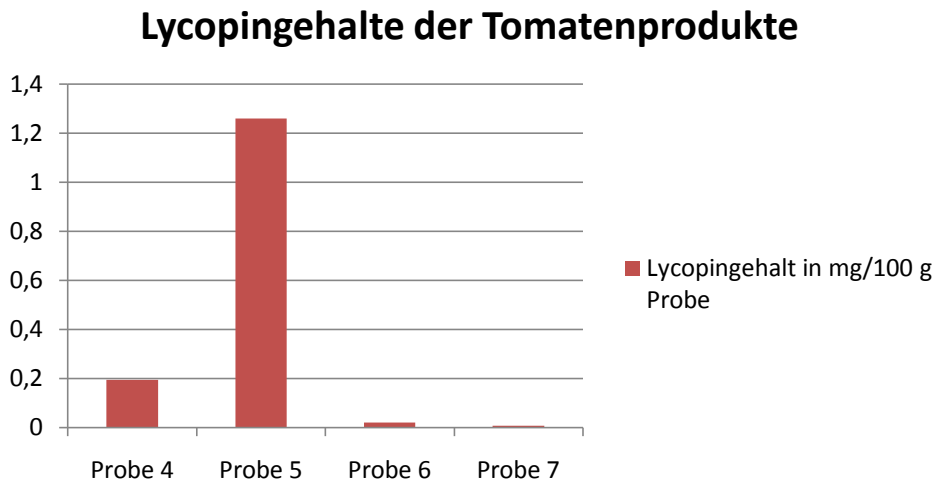


Abbildung 57: Lycopingehalte der Tomatenprodukte

Tabelle 17: Carotenoidgehalte der Tomatenprodukte

Probe	mg Lycopin pro 100 g Probe	mg Lycopin pro 100 g Trockenmasse der Probe	mg β -Carotin pro 100 g Probe	mg β -Carotin pro 100 g Trockenmasse der Probe
4 (Dosentomaten)	0,196	2,333	0,019	0,226
5 (Tomatenmark)	1,260	3,500	0,009	0,025
6 (Napoli Sauce)	0,021	0,109	0,026	0,135
7 (Tomatensuppe)	0,009	0,075	0,077	0,641

Lycopingehalte ohne Tomatenmark

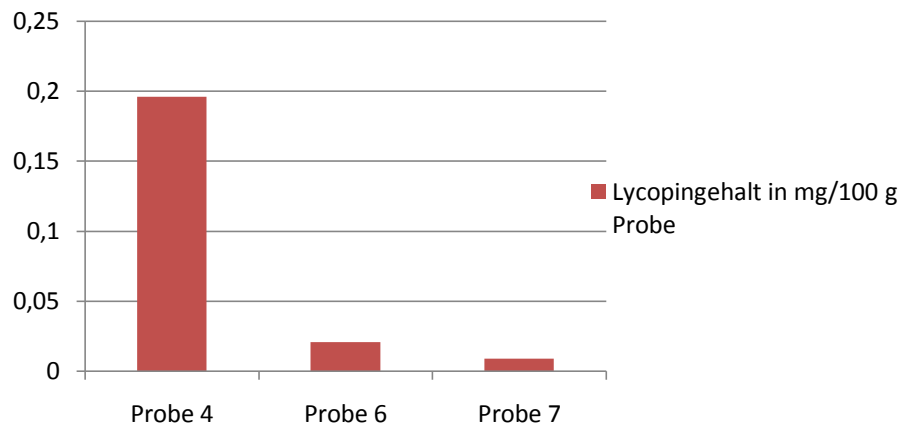


Abbildung 58 : Lycopingehalte der Tomatenprodukte ohne Tomatenmark

Obwohl auch hier das Tomatenmark den höchsten Anteil an Lycopin aufwies könnte noch mehr Lycopin enthalten sein, da eine rote Färbung der Ausgangssubstanz zurückblieb, die nicht mehr mit dem verwendeten Lösungsmittel extrahiert werden konnte. Die verbleibende rote Färbung könnte auf verschiedene Verbindungen der Carotinoide (Derivate, Ether,...) zurückzuführen sein oder Xanthophylle darstellen die in, in diesem Fall, verwendeten Lösungsmittel unlöslich sind und die zwar für diese Untersuchung unwesentlich sind aber zum gesamt Carotinoidgehalt beitragen.

Bei den höher verarbeiteten Tomatenprodukten von Probe 6 und 7 (Napli Sauce und Tomatensuppe) wurde am wenigsten Lycopin gefunden. Dies ist eventuell auf die durch die Verarbeitung entstandenen Verluste zurückzuführen, auf den geringen Tomatenanteil dieser Produkte oder auf eine stärkere Isomerisierung.

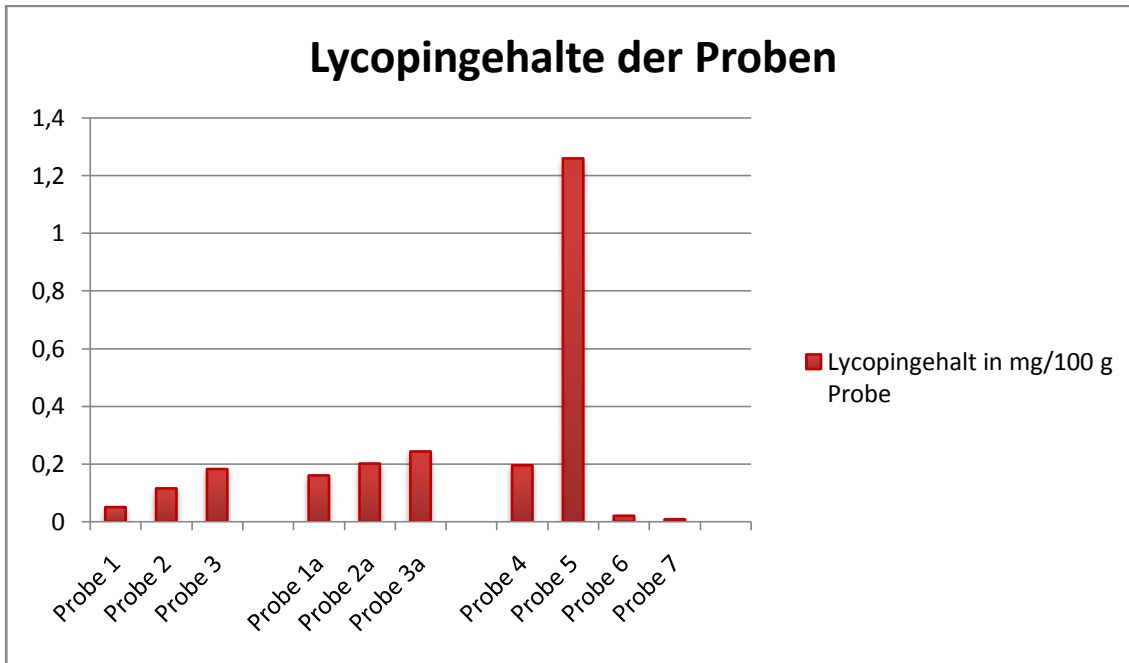


Abbildung 59: Lycopingehalte der Proben (siehe Tab.3) gesamt

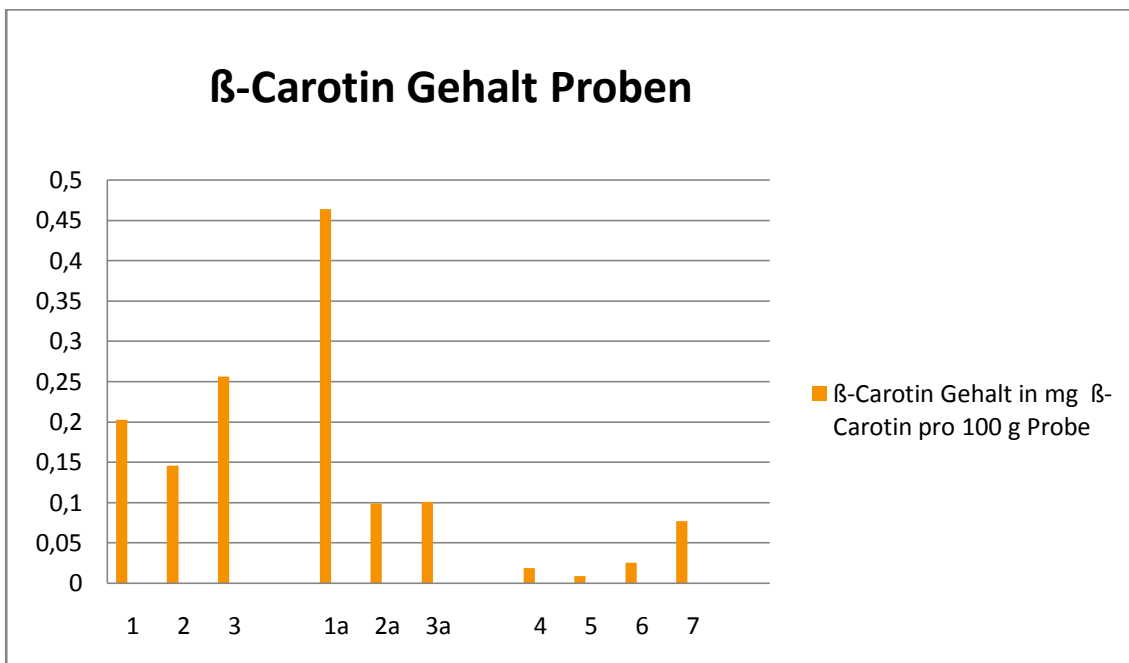


Abbildung 60: β-Carotingehalte der Proben (siehe Tab.3) gesamt

4.4. Ergebnisse zusammengefasst

Tabelle 18: Tomatenproben (siehe Datenliste Tab.3) Peaks

Probe	mg Lycopin pro 100 g Probe	mg Lycopin pro 100 g Trockenmasse der Probe	mg β -Carotin pro 100 g Probe	mg β -Carotin pro 100 g Trockenmasse der Probe
1 (Kischgtomaten)	0,051	0,604	0,203	2,408
2 (Tomaten)	0,116	1,760	0,146	2,215
3 (Paradeiser)	0,183	2,186	0,256	3,059
1a (K.Tomaten gek.)	0,161	1,909	0,464	5,504
2a (Tomaten gek.)	0,202	3,065	0,099	1,501
3a (Paradeiser gek.)	0,244	2,915	0,101	1,206
4 (Dosentomaten)	0,196	2,333	0,019	0,226
5 (Tom.Mark)	1,260	3,500	0,009	0,025
6 (Napoli Sauce)	0,021	0,109	0,026	0,135
7 (Tom.Suppe)	0,009	0,075	0,077	0,641

5. Schlussbetrachtung

Carotinoide sind in der Natur weit verbreitet und kommen sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Geweben vor. Somit sind Carotinoide auch ein wichtiger Bestandteil unserer Ernährung und sowohl als gesundheitsförderliche Stoffe oder auch als Farbstoffe nicht wegzudenken.

Unter den vielen carotinoidhaltigen Lebensmitteln, mit denen wir tagtäglich zu tun haben, spielen Tomaten eine nicht unwesentliche Rolle, da sie sowohl in roher Form als auch in vielen verschiedenen verarbeiteten Formen auf unserem Speiseplan stehen und so, zu einem nicht unerheblichen Teil, zur menschlichen Versorgung mit Carotinoiden beitragen [MAIANI et al., 2009].

Hierbei spielen die verarbeiteten Produkte eine immer größere Rolle, da die Beliebtheit von Fertigprodukten stetig zunimmt und Tomaten auch hier eine große Rolle als Ketchup oder auf Fertiggpizza usw. spielen.

Da die Tomaten bei ihrer Verarbeitung in den allermeisten Fällen erhitzt werden, stellte sich die Frage, ob sich das nachteilig auf den Carotinoidgehalt auswirken würde.

Bei dieser Arbeit wurden daher sowohl rohe, erhitzte als auch noch weiter verarbeitete Tomaten bzw. Tomatenprodukte, die zu dieser Zeit in österreichischen Supermärkten erhältlich waren mittels HPLC auf ihren Carotinoidgehalt und im speziellen auf ihren Lycopin- und β -Carotingehalt untersucht.

Die Analyse der Tomaten und Tomatenprodukte zeigte, dass bezüglich der Trockenmasse die Pannonischen Bio Tomaten mit 6,5 % den niedrigsten Trockenmassegehalt aufwiesen und die Pannonischen Bio Kirschtomaten den höchsten mit einem Prozentanteil von 8,3 %.

Der Lycopingehalt war bei den frischen Tomaten mit 0,116 mg/100 g und bei den Pannonischen Bio Kirschtomaten mit 0,051 mg/100 g am geringsten und bei den Paradeisern am höchsten mit 0,183 mg/100 g. Obwohl die verschiedenen Tomaten zur gleichen Zeit erworben wurden, zeigt sich trotzdem ein großer Unterschied im Lycopingehalt.

Bei den gekochten Tomaten behielten die Pannonischen Bio Kirschtomaten mit 0,161 mg/100 g den niedrigsten Lycopinanteil während die Paradeiser den höchsten Anteil mit 0,244 mg/100 g hatten. Der Lycopingehalt bezogen auf die Trockenmasse war jedoch bei den Pannonische Bio Tomaten mit 3,065 mg Lycopin pro 100 g Trockenmasse am höchsten. Der allgemein höhere Wert im Vergleich zu den rohen Tomaten könnte dabei auf eine stärker zerstörte Zellstruktur durch die Erhitzung und eine somit bessere Extraktionsfähigkeit des Lycopins zurückzuführen sein.

Bei den Tomatenprodukten zeigten die Dosentomaten ähnliche Werte als die gekochten Tomaten. Es zeigte sich ein nur geringfügig höherer Wert bei den Dosentomaten mit 0,196 mg/100 g. Dies ist eventuell auf die Hitzebehandlung in der Dose zurückzuführen, bei der das Produkt weniger mit Sauerstoff in Kontakt kommt und so das Lycopin weniger zerstört werden kann.

Das Tomatenmark wies wie erwartet den höchsten Lycopinwert im Vergleich zu den übrigen Proben auf, da es sich um ein stark einkonzentriertes Tomatenprodukt handelt. Der gefundene Wert lag bei 1,260 mg/100 g.

Auch in der Napoli Sauce fand sich noch ein relativ hoher Anteil an Lycopin mit einem Wert von 0,021 mg/100 g. Allerdings war im HPLC Chromatogramm schon eine deutliche Isomerisierung des Lycopins sichtbar. Es lässt sich daher sagen, dass trotz des verstärkten Verarbeitungsgrades noch ein nennenswerter Anteil an Lycopin erhalten geblieben ist.

Die Tomatencreme Suppe wies von allen verwendeten Proben den niedrigsten Lycopinwert auf mit 0,009 mg/100 g. Der HPLC-Peak war auch hier wie bei der Napoli Sauce verbreitert was ebenfalls wieder auf eine Isomerisierung schließen lässt.

Beide hoch verarbeiteten Produkte haben einen geringeren Anteil an Lycopin als die weniger verarbeiteten Produkte.

Bei den β -Carotiningehalten hatten die unverarbeiteten frischen Tomaten durchschnittlich die höheren Werte. Wobei von den bearbeiteten Produkten die gekochten Bio Tomaten der Probe 1a mit einem Wert von 0,464 mg β -Carotin /100 g Probe den höchsten Wert von allen hatten. Die gekochten Dosentomaten zeigten jedoch den zweit niedrigsten

Wert von allen mit 0,019 mg β -Carotin / 100 g Probe. Bei den höher verarbeiteten Produkten waren die β -Carotin Werte im Vergleich ebenfalls niedriger als bei den frischen Produkten. Dies könnte daran liegen, dass Lycopin sehr stabil ist gegen Hitzebehandlung [ROCKENDRA et al., 2010] und β -Carotin möglicherweise weniger.

6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse des Carotinoidgehaltes verschiedener Tomatenprodukte und die Erarbeitung eines Lycopinstandards zur quantitativen Bestimmung von Lycopin, der auf einfache Weise im Labor reproduziert werden kann ohne das teure Reinprodukt erwerben zu müssen.

Als Untersuchungsmaterial dienten verschiedene Tomaten und Tomatenprodukte, von denen drei zuerst im frischen Zustand und anschließend im gekochten Zustand analysiert wurden. Zusätzlich wurden industriell gekochte Dosentomaten analysiert.

Bei den übrigen Tomatenprodukten handelte es sich um Tomatenmark, Tomatensauce und Tomatensuppe wobei die Tomatensauce und die Tomatensuppe in getrocknetem Zustand vorlagen. Bei allen Proben wurden die Carotinoidgehalte mittels HPLC gemessen.

Die Ergebnisse der Carotinoidanalyse zeigten, dass die Carotinoidmenge bei den frischen Tomaten [Probe 1 (Bio Kirschtomaten): 0,051 mg/100 g, Probe 2 (Bio Tomaten): 0,116 mg/100 g, Probe 3 (Paradeiser): 0,183 mg/100 g] niedriger lag als bei den gekochten [Probe 1a (Bio Kirschtomaten, gekocht): 0,161 mg/100 g, Probe 2a (Bio Tomaten, gekocht): 0,202 mg/100 g, Probe 3a (Paradeiser, gekocht): 0,244 mg/100 g].

Dies könnte jedoch auch daran liegen, dass nicht die Gehalte selbst niedriger waren sondern nur die Ausbeute der Extraktion aufgrund der unzerstörten Zellmatrices in denen sich das Lycopin befindet. Die folgende Analyse der gekochten Tomaten bei der die Ergebnisse höher lagen und die Werte der unterschiedlichen Tomaten ähnlich waren könnte dies bestätigen.

Auch der Lycopin-Wert der Dosentomaten befand sich mit 0,196 mg/100 g in diesem Bereich.

Beim Tomatenmark wurde aufgrund der hohen Konzentrierung ein wesentlich höherer Lycopinwert festgestellt. Der Wert betrug 1,26 mg/100 g.

Bei den höher verarbeiteten Tomatenprodukten wie Tomatensauce und Tomatensuppe wurden niedrigere Lycopinwerte gemessen (Napoli Sauce 0,021 mg/100 g und Tomatensuppe 0,009 mg/100 g).

Diese niedrigeren Werte können auf unterschiedliche Ursachen wie z.B. unterschiedliche verwendete Tomatensorten oder Reifegrade oder auf Unterschiede in der Verarbeitung zurückzuführen sein.

Bei den β -Carotinwerten zeigten die gekochten Kirschtomaten (Probe 1a) den höchsten Wert mit 0,464 mg β -Carotin / 100 g Probe während das Tomatenmak den niedrigsten Wert mit 0,009 mg β -Carotin / 100 g Probe aufwies.

Allgemein waren die β -Carotin Werte der frischen Tomaten im Durchschnitt höher als die der verarbeiteten Produkte. Dies deutet darauf hin, dass β -Carotin weniger hitzestabil ist als Lycopin und daher stärker mit der Verarbeitung abnimmt.

7. Summary

The aim of this study was to analyze the carotene content of various tomato products and the development of a procedure to easily quantify lycopene with which it is possible to avoid purchasing the expensive pure lycopene standard.

As samples, various tomatoes and tomato products were used. The fresh tomatoes were analyzed first fresh and then cooked. Also a canned tomatoes sample was used.

The rest of the tomato products were tomato puree, tomato sauce and tomato soup of which the last two were dried products. The carotene content of all these samples was measured by RP-HPLC.

The results of the carotene analysis showed that the carotene content in fresh tomatoes [sample 1 (organic cherry tomatoes): 0,051 mg/100 g, sample 2 (organic tomatoes): 0,116 mg/100 g, sample 3 (tomatoes): 0,183 mg/100 g] was lower than in the cooked ones [sample 1a (organic cherry tomatoes, cooked): 0,161 mg/100 g, sample 2a (organic tomatoes, cooked): 0,202 mg/100 g, sample 3a (tomatoes, cooked): 0,244 mg/100 g].

The reason for this could be that the extraction was not complete due to the maybe undisrupted cell matrices of the fresh tomatoes in which the lycopene is located. This could also be confirmed by the fact that there was not so much difference in the lycopene content within the cooked tomatoes than in the fresh ones and the total lycopene content was also higher.

The results of the canned tomatoes were also in this range with 0,196 mg/100 g. Due to the highly concentrated nature of the tomato puree the results were, with 1,26 mg lycopene /100 g, highest in it.

The higher processed tomato products like tomato sauce and tomato soup had the lowest amount of lycopene (tomato sauce 0,021 mg/100 g und tomato soup 0,009 mg/100 g). The reasons for this low amounts could be for example that different tomato cultivars were used or different ripening grades or processing steps.

It can be concluded that lycopene content decreases with processing. Exceptions make the cooked tomatoes, where the results were higher than in the not processed fresh tomatoes. Because of a lower recovery due to a lack of efficiency in the extraction, the total lycopene amount of the fresh tomatoes is unknown and it can't be said for sure if the lycopene content decreased.

When it comes to the β -carotene content, the cooked cherry tomatoes had the highest amount with 0,464 mg β -carotene / 100 g sample and tomato puree the lowest with 0,009 mg β -carotene / 100 g sample. Generally higher concentrations of β -carotene were found in the fresh tomatoes while all processed products showed lower amounts. Maybe this is due to a lesser stability of β -carotene to heat treatment than lycopene [ROCKENDRA et al., 2010].

8. Literaturverzeichnis

ADEWUSI S.R.A., BRADBURY J.H.: Carotenoids in Cassava: Comparison of Open Column and HPLC Methods of Analysis. *J Sci Food Agric*, 1993, 62: 375-383

ARUNA G., MAMATHA B.S., BASKARAN V.: Lutein content of selected Indian vegetables and vegetable oils determined by HPLC. *J Food Comps Anal*, 2009, 22: 632-636

BLIGH E.G., DYER W.J.: A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can J Biochem Physiol*, 1959, Vol.37: 911-917

BRITTON G., LIAAEN-JENSEN S., PFANDER H.; MERCADANTE A.Z., EGELAND E.S.: Carotenoids. Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, 2004

BUSHWAY R.J.: Determination of alpha- and β -Carotene in Some Raw Fruit and Vegetables by High-Performance Liquid Chromatography. *J Agric Food Chem* 1986, 34: 409-412

CORTES C., ESTEVE M.J., FRIGOLA A., TORREGROSA F.: Identification and Qualification of Carotenoids Including Geometrical isomers in Fruit and Vegetable Juices by Liquid Chromatography with Ultraviolet-Diode Array Detection. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 2203-2212

DIAS M.G., FILOMENA M., CAMOES G.F.C., OLIVEIRA L.: Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables. *Food Chem*, 2009, 113: 808-815

ELMADFA I.: Ernährungslehre. Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart, 2004

GRANADO F., OLMEDILLA B., BLANCO I., ROJAS-HIDALGO E.: Carotenoid Composition in Raw and Cooked Spanish Vegetables. *J Agric Food Chem*, 1992, 40: 2135-2140

HAMMERSHOJ M., KIDMOSE U., STEENFELDT S.: Deposition of carotenoids in egg yolk by short-term supplement of coloured carrot (*Daucus carota*) varieties as forage material for egg-laying hens. *J Sci Food Agric*, 2010, 90: 1163-1171

LEHMANN C.: Die Tomate. Akademische Verlagsgesellschaft Geest&Portig K.-G., Leipzig, 1953

LIU S.C., LIN J.T., YANG D.J.: Determination of *cis*- and *trans*- α - and β -carotenoids in Taiwanese sweet potatoes (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) harvested at various times. *Food Chem*, 2009, 116: 605-610

MAIANI G., PERIAGO CASTON M.J., CATASTA G., TOTI E., GONI CAMBRODON I., BYSTED A., GRANADO-LORENCIO F., OLMEDILLA-ALONSO B., KNUTHSEN P., VALOTI M., BÖHM V., MAYER-MIEBACH E., BEHSNILIAN D., SCHLEMMER U.: Review: Carotenoids. Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53: 194-218

MATEOS R., GARCIA-MESA J.A.: Rapid and quantitative extraction method for the determination of chlorophylls and carotenoids in olive oil by high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 385: 1247-1254

OLLILAINEN V., HEINONEN M., LINKOLA E., VARO P., KOIVISTOINEN P.: Carotenoids and Retinols in Finnish Foods: Dairy Products and Eggs. *J Dairy Sci*, 1989, 72: 2257-2265

PERRY A., RASMUSSEN H., JOHNSON E.J.: Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *J Food Compos Anal*, 2009, 22: 9-15

ROCKENDRA G., BALASUBRAMANIAM V.M., SCHWARTZ S., FRANCIS D.M.: Storage Stability of Lycopene in Tomato Juice Subjected to Combined Pressure – Heat Treatments. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 8305-8313

RODRIGUEZ-AMAYA D.B., A guide to carotenoid analysis in foods. One Thomas Circle, N.W. Washington D.C., 2001

RUBIO-DIAZ D.E., SANTOS A., FRANCIS D.M., RODRIGUEZ-SAONA L.E.: Carotenoid Stability during Production and Storage of Tomato Juice Made from Tomatoes with Diverse Pigment Profiles Measured by Infrared Spectroscopy. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 8692-8698

SCHREINER M.: *Lebensmittellipide. Unterlagen zur Vorlesung*, Wien, 2008

STAHL W., SIES H.: Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *BBA*, 2005, 1740: 101-107

SVELANDER C.A., TIBÄCK E.A., AHRNE L.M., LANGTON M. IBC, SVANBERG U. SO, ALMINGER M. AG: Processing of tomato: impact on in vitro bioaccessibility of lycopene and textural properties. *J Sci Food Agric*, 2010, 90: 1665-1672

TAKAICHI S.: Characterization of carotenes in combination of a C18 HPLC column with isocratic elution and absorption spectra with a photodiode-array detector. *Photosynth Res*, 2000, 65: 93-99

UNGER K.K., WEBER E.: *Handbuch der HPLC. Teil 1, Leitfaden für Anfänger und Praktiker*, 2. überarbeitete Auflage, GIT Verlag, Darmstadt, 1995

WENZEL M., SEUSS-BAUM I., SCHLICH E.: Influence of Pasteurisation, Spray- and Freeze- Drying, and Storage on the Carotenoid Content in Egg Yolk. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 1726-1731

YAGIZ Y., KRISTINSSON H.G., BALABAN M.O., WELT B.A., RAGHAVAN S., MARSHALL M.R.: Correlation between astaxanthin amount and a*value in fresh Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle during different irradiation doses. *Food Chem*, 2010, 120: 121-127

ZAGALSKY P.F.: b-Crustacyanin, the blue-purple carotenoprotein of lobster carapace: consideration of the bathochromic shift of the protein-bound astaxanthin. *Acta Cryst*, 2003, D59: 1529-1531

Lebenslauf

Persönliche Daten:

PÜHRINGER Ingeborg
geb. am 06.Juni 1985 in Ried im Innkreis
österreichische Staatsbürgerin

Ausbildung:

1991-1992 VS Mühlheim am Inn

1992-1993 aus gesundheitlichen Gründen von
der Schulpflicht befreit

1993-1996 Fortsetzung der VS Mühlheim
am Inn

1996-2000 Hauptschule Geinberg

2000-2004 BORG Ried im Innkreis

2004 mit der Matura abgeschlossen

2004-2011 Studium der Lebensmittel- und
Ernährungswissenschaften an
der Universität Wien

Wahlfach: Ernährung und Umwelt

Berufliche Praxis:

Juli/August 2007 Bezirksalten- und Pflegeheim /
Küche

September 2009 Reinhaltungsverband Ried i.I.u.U. /
Labor