



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Quantitative Bestimmung der wasserlöslichen Vitamine in
verschiedenen Obst- und Gemüsesäften mittels HPLC
und massenspektrometrischer Analyse

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Verfasserin:	Sophie-Marie Wagner
Studienrichtung:	A-474 Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Univ. Prof. Dr. Jürgen König
Betreuerin	Dr. Elisabeth Rudolph-König

Wien, 03.06.2011

Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.“

(Ort, Datum)

(Name des Autors)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Betreuern, **Univ. Prof. Dr. Jürgen König** und **Dr. Elisabeth Rudolph-König** bedanken. Durch ihre tatkräftige Unterstützung konnte ich mein selbst gewähltes Thema ausarbeiten. Danke für die Hilfestellung und Geduld bei all meinen analytischen und labortechnischen Fragen!

Ebenso möchte ich mich bei meinen Eltern, **Dr. Peter Wagner** und **VOBL Susanna Wagner**, bedanken. Sie waren mir während meiner gesamten Ausbildungszeit immer eine große Unterstützung und haben mich jederzeit ermutigt, diesen von mir gewählten Weg, auch zu Ende zu gehen.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Freund **Helmut Steinbrecher BSc.** bedanken, der mich zusätzlich zu meiner Betreuung, fachlich aber auch emotional, während der gesamten Arbeit unterstützt hat.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an **Dr. Dr. Herbert Stammer** und **VOBL Eveline Stammer**. Sie haben sogar unter extremen Zeitdruck, diese Arbeit sehr sorgfältig überprüft.

Zusätzlich danke ich meinen **Studienkolleginnen**, die diesen Lebensabschnitt mit mir zu Ende gebracht haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Problem- und Aufgabenstellung	5
1.1. Überprüfung der Messmethode für die Anwendung auf die wasserlöslichen Vitamine	5
1.2. Quantitative Überprüfung der Packungsangaben mit den gemessenen Vitamingehalten.....	6
1.3. Auswahl der zu untersuchenden Vitamine	6
2. Einleitung	7
3. Literaturübersicht.....	8
3.1. Vitamine	8
3.2. Wasserlösliche Vitamine	8
3.3. Obst- und Gemüsesäfte	17
3.3.1. Obstsäfte	17
3.3.2. Gemüsesäfte	19
3.3.3. Industrielle Herstellung und Haltbarmachung von Obst- und Gemüsesäften ..	20
3.3.4. Verbrauch.....	22
4. Materialien und Methoden	23
4.1. Chemikalien, Materialien und Geräte	23
4.2. Festphasenextraktion	29
4.2.1. Probenvorbehandlung mittels SPE.....	34
4.3. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	35
4.4. Massenspektrometrie	41
4.5. Kopplung von Massenspektrometrie und HPLC	43

4.6. Herstellung einer Standardlösung für die Etablierung einer HPLC/MS Methodik zur quantitativen Analyse wasserlöslicher B-Vitamine und Vitamin C	45
4.7. HPLC/ESI-MS Grundlagen für die Analyse der wasserlöslichen B-Vitamine und Vitamin C	46
5. Ergebnisse	48
5.1. Auswertung des Vorversuchs	48
5.2. Auswertung und Ergebnisse der Einzelstandardlösungen:	50
5.2.1. Kalibriergerade der UV/VIS Messungen	52
5.2.2. Kalibriergerade der MS Messung.....	55
5.3. Korrelation der UV/VIS mit der MS Standards	59
5.4. Ergebnisse der Auswertung von Obst- und Gemüsesäften mittels HPLC/UV-MS	62
5.4.1. Ergebnisse der Auswertung von Kindergetränken mittels UV/VIS-Detektor ...	63
5.4.2. Ergebnisse der Auswertung von kohlenensäurehaltigen Getränken mittels UV/VIS-Detektor	65
5.4.3. Ergebnisse der Auswertung von Multivitaminsäften mittels UV/VIS-Detektor .	66
5.4.4. Ergebnisse der Auswertung von Brausetabletten mittels UV/VIS-Detektor	68
5.4.5. Ergebnisse der Auswertung von Bio-Säften mittels UV/VIS-Detektor.....	71
5.4.6. Ergebnisse der Auswertungen von Tees mittels UV/VIS-Detektor	73
5.4.7. Ergebnisse der Auswertung von Kindergetränken mittels MS	74
5.4.8. Ergebnisse der Auswertung von kohlenensäurehaltigen Getränken mittels MS .	76
5.4.9. Ergebnisse der Auswertung von Multivitaminsäften mittels MS	77
5.4.10. Ergebnisse der Auswertung von Brausetabletten mittels MS	79
5.4.11. Ergebnisse der Auswertung von Bio-Säften mittels MS.....	81
5.4.12. Ergebnisse der Auswertung von Tees mittels MS.....	83
6. Diskussion.....	85
6.1. Werte außerhalb der Regressionsgeraden	85
6.2. Messfehler der Massenspektrometrie	85

6.3. Bei der Auswertung von ausgewählten Vitaminen aufgetretene Messfehler	86
6.3.1. Messfehler bei der Auswertung des Vitamin C-Gehalts	86
6.3.2. Messfehler bei der Auswertung des Folsäure -Gehalts.....	87
6.4. Vitaminverluste durch Umwelteinflüsse	87
7. Schlussbetrachtung	89
7.1. Conclusio.....	89
7.2. Ausblick	89
Kurzfassung.....	91
Abstract.....	93
Abbildungsverzeichnis	95
Tabellenverzeichnis	97
Abkürzungsverzeichnis	99
Literaturverzeichnis	101
Anhang	105
Lebenslauf.....	105

Die Bezeichnungen sollen immer geschlechtsneutral verstanden werden.

1. Problem- und Aufgabenstellung

Im Folgenden soll kurz auf die Aufgabenstellung eingegangen werden und welche Probleme damit gelöst werden sollten. Dabei sind zwei Ziele verfolgt worden: Die Überprüfung der Messmethode für die Anwendung auf die wasserlöslichen Vitamine sowie die quantitative Überprüfung der Packungsangaben mit den gemessenen Vitamingehalten. Schlussendlich wird im Punkt 1.3 noch auf die Selektion der zu untersuchenden Vitamine eingegangen.

1.1. Überprüfung der Messmethode für die Anwendung auf die wasserlöslichen Vitamine

Für die vorliegende Arbeit wurde die HPLC/MS mit ihren Detektoren UV/VIS und Flugzeitmassen Hybrid Quadrupol ESI Messmethode als ausgewählt. Um jedoch eine erfolgreiche Auswertung des Vitamingehalts in den einzelnen Frucht- und Gemüsesäften zu gewährleisten, musste zunächst die verwendete Messmethode geprüft werden.

Ihre Anwendbarkeit auf die Vitamine war zwar in einigen Studien gezeigt worden, jedoch waren die Erfahrungen mit dieser, speziell für die Messung an Frucht- und Gemüsesäften, gering.

Ziel war es daher die Messmethode zu überprüfen, dass ein aussagekräftiges Ergebnis garantiert werden kann. Ein besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Folsäure gerichtet.

1.2. Quantitative Überprüfung der Packungsangaben mit den gemessenen Vitamingehalten

Als zweite und wichtigste Zielsetzung dieser Arbeit war es zu zeigen, ob die Packungsangaben mit den tatsächlichen Vitamingehalten übereinstimmen. Dabei sollte die Analyse mittels HPLC sowohl mit UV/VIS als auch massenspektrometrisch vorgenommen werden.

Die Resultate der Überprüfung der Messmethode sollten hier nicht nur praktische Anwendung finden, sondern sich noch einmal bestätigen.

1.3. Auswahl der zu untersuchenden Vitamine

Da wasserlösliche Vitamine eine andere Probenvorbereitung als die fettlöslichen benötigen, beschränkte man sich in dieser Arbeit auf die wasserlöslichen Vitamine. Vor allem auch deshalb, weil zu dieser Gruppe weniger Literatur vorhanden ist.

Diese Gruppe beinhaltet neun Vitamine, von denen allerdings nur folgende sechs Vitamine genauer betrachtet wurden:

- Ascorbinsäure (Vitamin C)
- Thiamin (Vitamin B₁)
- Riboflavin (Vitamin B₂)
- Niacin (Vitamin B₃)
- Pyridoxin (Vitamin B₆)
- Folsäure (Vitamin B₉)

2. Einleitung

Die tägliche Vitaminzufuhr für den Menschen ist essentiell. Sie werden für viele biochemische Prozesse im menschlichen Körper benötigt, können allerdings nicht von diesem hergestellt werden. [Deutsche Gesellschaft für Ernährung, 2004]

Obst und Gemüse enthalten die meisten Vitamine. Sie werden jedoch von vielen Menschen unzureichend verzehrt. Das Interesse an dieser Nährstoffgruppe ist dennoch groß. Die Lebensmittelindustrie hat dies erkannt und fügt ihren Produkten diese wichtige Nährstoffgruppe als Ergänzung bei. Während der Nahrungsmittelmarkt bereits an solchen Produkten gesättigt ist, sieht man nun die Getränkeindustrie diesem Trend folgen.

Davon betroffen sind vor allem Tees, Kindergetränke, Obst- und Gemüsesäfte, aber auch neue Produkte wie Smoothies oder alle möglichen Arten von Vitamindrinks.

Allerdings stellt sich die Frage ob angereicherte Obst- und Gemüsesäfte durch die zusätzliche Vitaminisierung mehr Vitamine enthalten und somit den Bedarf sättigen können. Ebenso interessant ist der quantitative Vitaminvergleich zu den biologischen Säften, die keine künstlichen Inhaltsstoffe vorweisen.

Zusätzlich gilt es zu klären, ob die Verpackung eine wesentliche Rolle für die Erhaltung der künstlichen Vitamine spielt.

Der Informationsbedarf zu diesem Thema ist vorhanden, allerdings gibt es momentan noch wenig Forschungsarbeiten dazu. Deshalb ist nicht nur der quantitative Vitaminvergleich der Getränke Ziel dieser Arbeit, sondern auch die Schaffung einer wissenschaftlichen Basis für diesen Vergleich.

Dabei konzentriert sich diese Arbeit auf die wasserlöslichen B-Vitamine wie auch auf das Vitamin C. Ausgewertet werden die Vitamingehalte in angereicherten und natürlichen Obst- und Gemüsesäften, um einen Vergleich mit den Angaben auf der Packung durchführen zu können.

3. Literaturübersicht

In diesem Kapitel, das als Übersicht der aktuellen Literatur verstanden werden soll, wird auf den derzeitigen wissenschaftlichen Stand bezüglich der Vitamine, aber insbesondere der in der Arbeit verwendeten wasserlöslichen Vitamine, eingegangen.

Zusätzlich wird auf die rechtliche Situation betreffend den Obst- und Gemüsesäften im Sinne der Definition, Deklaration und der industriellen Herstellung in Österreich eingegangen. Abschließend wird noch im Kapitel 3.3.4 auf den Verbrauch hingewiesen.

3.1. Vitamine

Vitamine sind eine Gruppe biologisch aktiver Verbindungen, die verschiedene chemische Strukturen aufweisen, aber drei wichtige Eigenschaften gemeinsam haben:

- Vitamine sind für den menschlichen Körper essentiell
- Der tägliche Vitaminbedarf befindet sich im Bereich von Mikrogramm bis Milligramm
- Vitamine sind organische Substanzen

Vitamine können in zwei Klassen unterteilt werden: den wasserlöslichen (C, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉ und B₁₂) und den fettlöslichen Vitaminen (A, D, E und K). Mittlerweile sind 13 Vitamine bekannt, die innerhalb ihrer Klassen sehr unterschiedliche biologische Aktivitäten aufweisen, die von ihrer chemischen Struktur abhängig sind. Neben den üblichen Vitaminbezeichnungen, werden ihnen auch zusätzlich Zahlen- und Buchstabenkombinationen zugewiesen.

3.2. Wasserlösliche Vitamine

Die wasserlöslichen Vitamine sind sehr leicht in Wasser lösbar und werden im menschlichen Dünndarm mit Hilfe von Carriern oder auch Rezeptoren absorbiert. Die Absorption verläuft außer bei Vitamin B₂ aktiv. Bei den wasserlöslichen Vitaminen

handelt es sich um Vorläufer von Coenzymen oder prosthetischen Gruppen vieler verschiedener Enzyme.

Die tatsächliche quantitative Angabe über den Gehalt der wasserlöslichen Vitamine in Lebensmitteln ist äußerst schwierig zu tätigen. Der Vitamingehalt in Lebensmitteln ist abhängig von der Bodenbeschaffenheit, der Lagerdauer, der Zubereitungstemperatur und Zubereitungsdauer, da die meisten wasserlöslichen Vitamine hitzelabil sind.

Da diese Vitamine nicht in ausreichender Menge im menschlichen Organismus gespeichert werden können, müssen sie durch die Nahrung oder Nahrungsergänzungsmittel zugeführt werden. Jedoch kann der exakte Vitaminbedarf eines Einzelnen nicht genau bestimmt werden und ist abhängig von vielen physiologischen Einflussfaktoren wie Geschlecht, Alter, Stress, Ernährungsgewohnheiten, physischen und psychischen Belastungen. Ebenfalls können Schwangerschaft, Stillzeit, Krankheit, Konsum von Nikotin, Alkohol und Medikamenten den täglichen Vitaminbedarf erhöhen. [Löffler, 2003]

Durch viele Studien stellte sich heraus, dass alle Vitamine in ihrer täglich benötigten Menge durch die gewöhnliche Nahrung aufgenommen werden können. Die einzige Ausnahme ist hier die Folsäure. Diese muss, um etwaige Folgeerkrankungen wie Neuralrohrdefekte beim Neugeborenen zu verhindern, unbedingt vor und während der Schwangerschaft, sowie in der Stillzeit supplementiert werden.

Auf den folgenden Seiten werden nun die sechs in der Arbeit verwendeten wasserlöslichen Vitamine strukturell abgebildet und tabellarisch gelistet. Dabei wird auf ihre wichtigsten chemischen und physiologischen Eigenschaften eingegangen.

Thiamin (Vitamin B₁)

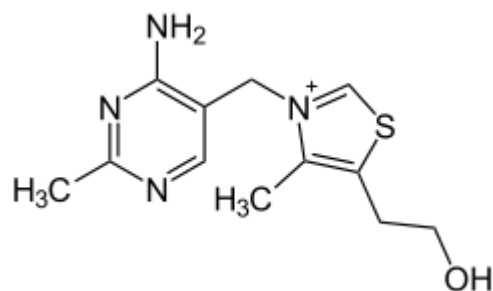


Abbildung 1: Strukturformel Thiamin

Thiamin – Vitamin B ₁	
Biologisch aktive Form	Thiaminpyrophosphat
Molare Masse	337,27 g·mol ⁻¹
Hauptquellen	Fleisch, Erbsen, Weizenkeime, Haferflocken, Kartoffeln, Thunfisch
Biochemische Funktionen	Redoxsystem, Hydroxylierungen (als Coenzym)
Bedarf	1,3-1,8mg
Mangelercheinungen	Beriberi

Tabelle 1: Eigenschaften Thiamin

Riboflavin (Vitamin B₂)

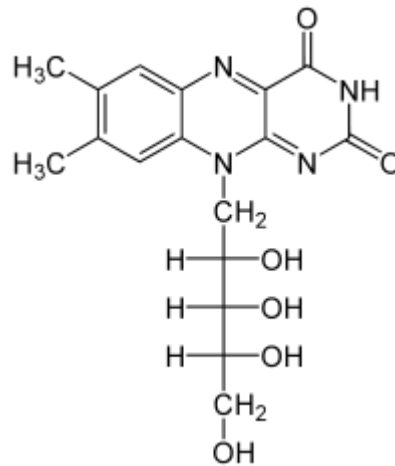


Abbildung 2: Strukturformel Riboflavin

Riboflavin – Vitamin B ₂	
Biologisch aktive Form	FMN, FAD
Molare Masse	376,37 g·mol ⁻¹
Hauptquellen	Schweineleber, Champignons, Fisch, Spinat, fettarme Milch
Biochemische Funktionen	Wasserstoff-Übertragungen (als Coenzym)
Bedarf	1,8-2,0mg
Mangelscheinungen	Pellagra

Tabelle 2: Eigenschaften Riboflavin

Niacin (Vitamin B₃)

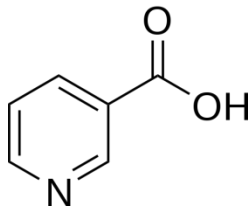


Abbildung 3: Strukturformel Niacin

Niacin – Vitamin B ₃	
Biologisch aktive Form	NAD ⁺ , NADP ⁺
Molare Masse	123,11 g·mol ⁻¹
Hauptquellen	Schweineleber, Rindfleisch, Hering, Milch, Hefe
Biochemische Funktionen	Wasserstoffübertragungen (als Coenzym)
Bedarf	15-20mg
Mangelscheinungen	Pellagra

Tabelle 3: Eigenschaften Niacin

Pyridoxin (Vitamin B₆)

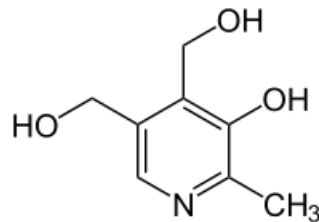


Abbildung 4: Strukturformel Pyridoxin

Pyridoxin – Vitamin B ₆	
Biologisch aktive Form	Pyridoxalphosphat
Molare Masse	169,18 g·mol ⁻¹
Hauptquellen	Fleisch, grüne Bohnen, Kartoffeln, Bananen, Kiwis, Fisch
Biochemische Funktionen	Transaminierung, Decarboxylierung, Transsulfurierung (als Coenzym)
Bedarf	1,6-2,1mg
Mangelscheinungen	Hypochrome Anämie

Tabelle 4: Eigenschaften Pyridoxin

Folsäure (Vitamin B₉)

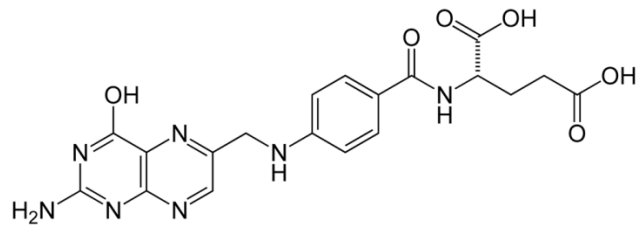


Abbildung 5: Strukturformel Folsäure

Folsäure – Vitamin B ₉	
Biologisch aktive Form	Tetrahydrofolsäure
Molare Masse	441,40 g·mol ⁻¹
Hauptquellen	Leber, Spinat, Spargel, Brokkoli, Weizenkeime, Tomaten, Orangen
Biochemische Funktionen	1-Kohlenstoffatomübertragungen (als Coenzym)
Bedarf	200-400µg
Mangelscheinungen	Perniziöse Anämie, Neuralrohrdefekte

Tabelle 5: Eigenschaften Folsäure

Ascorbinsäure (Vitamin C)

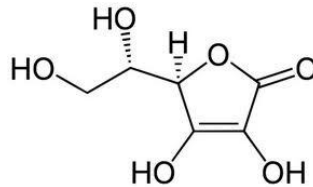


Abbildung 6: Strukturformel Ascorbinsäure

Ascorbinsäure – Vitamin C	
Biologisch aktive Form	Ascorbinsäure
Molare Masse	176,13 g·mol ⁻¹
Hauptquellen	Paprika, Brokkoli, Hagebutte, Acerola-Kirsche, Kiwi, Orange
Biochemische Funktionen	Redoxsystem, Hydroxylierung (als Coenzym)
Bedarf	100mg
Mangelscheinungen	Skorbut

Tabelle 6: Eigenschaften von Ascorbinsäure

[Löffler, 2003]

Wie bereits vorher erwähnt, sind Vitamine eine spezielle Gruppe von organischen Verbindungen, die essentiell für ein normales Wachstum als auch für die Aufrechterhaltung eines normalen Lebens sind. Um eine adäquate Aufnahme von Vitaminen zu sichern, kann die menschliche Ernährung mit einer großen Anzahl an Multivitamintabletten und mit Vitaminen angereicherten Lebensmitteln vervollständigt werden. [Engel Rita, 2010]

Die Anreicherung von Lebensmitteln ist ein wachsender Trend in der Getränke- und Lebensmittelbranche. Während in der Getränkeindustrie der Trend stetig zunimmt, wird die Lebensmittelanreicherung in den anderen Bereichen noch immer generell vom Konsumenten abgelehnt.

Dabei sind angereicherte Mineralwässer, Fruchtsäfte und kohlenensäurehaltige Getränke die Spitzenreiter dieses Trends, während sich Sport und Energy Drinks sich auf die aufputschende Wirkung von B-Vitaminen berufen. Von diesen Getränken werden am meisten Energy Drinks und Fruchtsäfte konsumiert. [S. Pérez Prieto, 2006]

3.3. Obst- und Gemüsesäfte

Dieses Kapitel beinhaltet die rechtlichen Bedingungen der Obst- und Gemüsesäfte hinsichtlich ihrer erlaubten Inhaltsstoffe, ihrer Definition, Deklaration und Weiterverarbeitung. Anschließend wird auf die verschiedenen Herstellungsverfahren eingegangen. Der Verbrauch dieser Säfte in Österreich bildet den Abschluss dieses Kapitels.

3.3.1. Obstsäfte

Unter Obst- bzw.- Fruchtsäften versteht man Erzeugnisse die gären können, jedoch nicht gegoren sind und aus gesunden und reifen Früchten einer oder mehrerer Fruchtarten gewonnen werden. Sie besitzen für den Saft dieser Frucht bzw. dieser Früchte die charakteristische Farbe, das charakteristische Aroma und den charakteristischen Geschmack. Das Produkt muss 100% aus Fruchtsaft oder Fruchtfleisch bestehen. [Bundesministerium für Gesundheit, 2005].

Diese Getränke dürfen ebenso den Alkoholgehalt von 3g/l, das entspricht in etwa 0,3 Volumprozent, nicht überschreiten. [AG Direktvermarktung, 2009]

Falls Aromen und Fruchtfleisch bei der Herstellung verloren gehen, dürfen nur die wieder zugefügt werden, welche im ursprünglichen Obst vorhanden waren.

Zitronensaft und/oder Zitronensaftkonzentrat darf maximal 3g pro Liter enthalten, um den etwaigen zu süßen Geschmack des Saftes zu überdecken. Kohlensäure darf in jedem Fall zugesetzt werden, ist aber deklarationspflichtig. Bei Zuckerzusatz müssen Bezeichnungen, wie „gezuckert“ oder „mit Zuckerzusatz“ angeführt werden. Die höchst zugesetzte Zuckermenge muss als Trockenmasse ausgerechnet, angeführt und in Gramm pro Liter ausgedrückt sein.

Falls das Produkt nur aus einer Fruchtart besteht, muss diese in der Sachbezeichnung angegeben werden. Bei mehreren verwendeten Fruchtarten, müssen diese in absteigender Reihenfolge des Fruchtsaftvolumens angeführt werden. Bei Produkten, die aus mehr als drei verschiedenen Fruchtarten bestehen,

darf die Sachbezeichnung Mehrfrucht verwendet werden. [Bundesministerium für Gesundheit, 2004]

Fruchtsäfte aus Fruchtsaftkonzentrat sind Erzeugnisse, die durch Wasserentzug des vorhandenen Fruchtsaftes konzentriert werden. Anschließend wird Wasser als auch die durch den Prozess verlorengegangenen Aromastoffe, falls vorhanden auch Fruchtfleisch, dem Saft wieder hinzugefügt. Diese müssen ebenfalls auf Verpackungen angeführt werden. [Bundesministerium für Gesundheit, 2004]

Unter dem Begriff Fruchtsaftkonzentrat versteht man den Saft einer bzw. mehrerer Fruchtsorten, der durch physikalischen Entzug eines bestimmten Wassergehalts gewonnen wird. Hier dürfen bestimmte Zuckerarten, die in der Zuckerverordnung zugelassen sind, als auch Fructose Sirup. Dieser Vorgang wird benötigt um den sauren Geschmack, der durch die Herstellung entstehen kann, zu vermeiden. Sie dürfen aber den Wert von 15g pro Liter nicht überschreiten. [Bundesministerium für Gesundheit, 2004]

Fruchtnektare sind verdünnte Säfte, denen sowohl Zucker als auch Wasser zugesetzt wurden und die gewisse Anteile an Fruchtsäften enthalten. Das Produkt muss einen Fruchtsaftgehalt zwischen 25 und 50%, abhängig von der jeweilig verwendeten Frucht, enthalten. [AG Direktvermarktung, 2009]

Die verwendeten Früchte dürfen mit diversen Zuckerarten und/oder Honig zu Fruchtsäften und Fruchtsaftkonzentraten, die zugelassen und in der Zuckerverordnung beschrieben sind, vermengt werden. Ebenso darf noch Fructose Sirup, welcher aus Früchten stammt, verwendet werden. Es dürfen nicht mehr als höchstens 20 % des Gesamtgewichts des fertigen Saftes mit diversen Zuckerarten und/oder Honig versehen sein. Die Säfte müssen mit dem tatsächlich vorhandenen Mindestgehalt an Früchten oder Fruchtmark leserlich und deutlich hervorgehoben, in unmittelbarer Nähe der Produktbezeichnung gekennzeichnet werden.

Unter dem Begriff getrockneter Fruchtsaft (auch als Fruchtsaftpulver bekannt) versteht man Erzeugnisse, denen durch einen physikalischen Entzug das Wasser fast zur Gänze entzogen wurde. [Bundesministerium für Gesundheit, 2004]

3.3.2. Gemüsesäfte

Unter dem Begriff Gemüsesaft versteht man das unverdünnte, zur Gärung fähige, jedoch unvergorene oder durch Milchsäure vergorene, flüssige Produkt aus Gemüse welches zum unmittelbaren Verzehr bestimmt ist. Ebenso darf Gemüsemark verwendet werden. Die Bezeichnung „Gemüsesaft“ darf nur für ein Erzeugnis, welches aus einem 100%igen Anteil von Gemüse besteht, verwendet werden.

Wie auch bei Fruchtsäften, darf der Alkoholgehalt nicht mehr als 3,0g pro Liter enthalten. Produkte aus zwei oder mehreren Gemüsesorten, müssen mit Gemüsesaftcocktail bezeichnet werden. Ebenso müssen die verwendeten Gemüsearten in mengenmäßig absteigender Reihenfolge angegeben werden. Gemüsesaft aus Gemüsesaftkonzentrat ist das Produkt, bei dem Gemüsesaft durch Konzentrierung das Wasser entzogen und anschließend dem Gemüsekonzentrat wieder hinzugefügt wird. Die durch die Herstellungsprozesse verlorengegangenen Aromastoffe dürfen ebenfalls zugesetzt werden.

Konzentrierter Gemüsesaft wird durch physikalisches Abtrennen eines bestimmten Wassergehaltes hergestellt, dabei muss das Produkt eine Trockensubstanz von maximal 14% aufweisen. Das Endprodukt wird auf mindestens die Hälfte des ursprünglich vorhandenen Gemüsesaftvolumens reduziert. Auf den Verpackungen dieser Produkte muss der Hinweis „aus Gemüsesaftkonzentrat“ eindeutig und leserlich angeführt werden.

Unter Gemüsenektar und/ oder Gemüsetrunk versteht man den zum unmittelbaren Verzehr bestimmten Saft, der durch verdünnte Zubereitung aus diversen Gemüsesorten hergestellt wird. Hier muss der genaue bzw. Mindestgemüsegehalt in Prozenten angegeben werden. Ebenso muss der Gemüseanteil zu mindestens 40% vorhanden sein.

Bei allen Produkten darf jede Art von Zucker gemäß der Zuckerverordnung verwendet werden. Ebenso dürfen Zusätze wie zum Beispiel Fructose Sirup, Honig, Salz, Gewürze, sowie andere in vorhandenen Verordnungen angeführte Zutaten zur Herstellung verwendet werden.

Zusätzlich werden alle im Produkt vorkommenden Gemüsesorten nach ihrem Gewichtsanteil in absteigender Reihenfolge aufgelistet. Weitere Produktangaben betreffend dem Inhalt beziehen sich auf den Nährwert, Fett- und Proteingehalt, und die Menge an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. [Bundesministerium für Gesundheit, 2005]

3.3.3. Industrielle Herstellung und Haltbarmachung von Obst- und Gemüsesäften

Bei der industriellen Herstellung von Obst- und Gemüsesäften werden frische oder durch Kälte haltbar gemachte Obst- und Gemüsestücke verwendet. Die Obst- und Gemüsesorten müssen frei von Schädlingen, gewaschen und falls notwendig blanchiert sein. Der Fäulnisanteil darf nicht mehr als 1% betragen.

Die Obst- und Gemüsestücke werden zerkleinert, ausgepresst, zentrifugiert und gefiltert. Der daraus resultierende Saft ist getrübt. Bei Zitrussäften kann die Trübung bestehen bleiben, jedoch bei nationalen Obstsorten muss der Saft klar sein. Das Verfahren für die Aufhebung der Trübung wird Schönung genannt. Dabei werden die enthaltenen Trübstoffe durch Einsatz von Enzymen abgebaut oder durch Fällungsmitteln ausgefällt. Diese Stoffe können nach dem Vorgang über eine Filtration entfernt werden. Nach diesen Prozessschritten werden sie durch Pasteurisierung und Sterilisierung haltbar gemacht. Dabei werden die Säfte einige wenige Sekunden auf ungefähr 85°C erhitzt und dadurch auch ungekühlt 12-18 Monate haltbar. [Berghofer, 2000]

Bei Fruchtsäften die Stein- und Beerenobst enthalten, muss ein spezielles Erwärmungsverfahren angewendet werden. Dabei handelt es sich um ein Maischerhitzungsverfahren, bei dem das Steinobst bei 70°C und das Beerenobst bei 50°C für eine Zeit von ungefähr 3 Stunden erwärmt wird. Bei diesen Temperaturen fällt das hitzelabile Eiweiß, welches in Steinobst enthalten ist, aus. Erst nach der Abkühlung auf etwa 45°C findet eine Enzymierung statt und das Obst wird anschließend ausgepresst. Bei naturtrüben Säften darf nicht überreifes Obst für die Saftproduktion verwendet werden. Um den schnellen Pektinabbau zu verhindern, wird sofort nach dem Zentrifugieren pasteurisiert.

Bei Herstellung von Nektargetränken werden die Lebensmittel auf 80°C erhitzt. Dabei entweichen die pektolytischen und oxydativen Enzyme und die Obst- und Gemüsestücke werden weichgekocht. Danach wird das daraus resultierende Produkt passiert und blanchiert. Beim Passieren werden die festen Obst- und Gemüsebestandteile vom Fruchtmark abgetrennt, um Fremdkörper (z.B.: Kerne) zu eliminieren.

Bei Herstellung von Fruchtsirup kann sowohl ein Warmlöseverfahren als auch ein Kaltlöseverfahren eingesetzt werden. Bei dem Warmlöseverfahren liegt die Temperatur bei 40-60°C, wobei bei dem Kaltlöseverfahren die Temperatur bei unter 25°C liegt, um die enthaltenen Fruchtaromen zu schützen. Dem Sirup wird bei beiden Verfahren, nachdem sich der enthaltene Zucker gelöst hat, 3g/Liter Zitronensäure hinzugefügt. Anschließend wird das Produkt ungefähr 5 Minuten lang gekocht um die Saccharose in Fructose und Glucose zu spalten. Dieser Vorgang ist nötig um ein mögliches Kristallisieren zu verhindern. Hierbei ist noch zu beachten, dass der durch den Kochvorgang entstandene Schaum vor der Abfüllung abgeschöpft werden muss.

Die klare oder trübe Fruchtsaftlimonade sollte mindestens 10% Saft enthalten, wobei bei Traubensaft ein Wert von mindestens 30% eingehalten werden muss. Bei der Herstellung ist zwecks des Oxidationsschutzes noch zu beachten, dass 100 bis 150mg/Liter Saft Ascorbinsäure zugesetzt wird. Die Pasteurisation erfolgt bei 74°C und darf eine Temperatur von über 80°C nicht überschreiten.

Falls die Gefahr einer Bräunung der Produkte besteht, wird vor dem Abfüllen durch eine Vakuumentgasung entgegen gewirkt.

Nachdem diese Verfahren durchgeführt wurden, werden die Säfte abgefüllt. Dabei ist zu beachten, dass die Fülltemperatur ähnlich der Pasteurisationstemperatur entspricht und dass der Weg von der Haltbarmachung zur Abfüllung möglichst kurz sein sollte. Dabei können isolierte Leitungen verwendet werden, um das gewünschte Saftvolumen in die ausgewählte Verpackung zu transportieren. Der Verschluss muss dicht sein. Die gefüllte Verpackung muss nach Verschluss umgelegt und bei geeigneten Bedingungen aufbewahrt werden.

Um die Haltbarkeit zu verlängern, werden Zusatzstoffe wie zum Beispiel Amylasen, Pektinasen, Zitronensäure, Calciumcarbonat und Vitamin C eingesetzt. Sie dienen zum Oxidationsschutz des Saftes bzw. der Maische. Diese Zusatzstoffe sind, wie bereits erwähnt, deklarierungspflichtig und müssen auf den Verpackungen der einzelnen Getränke angeführt werden.

Ebenso können Obst- und Gemüsesäfte, aber auch ihr Konzentrat, durch Eindickung erzeugt werden. Dieses Herstellungsverfahren wird sehr gerne genutzt, da es an Lager- und Transportkosten spart. Dabei wird dem Saft die entzogene Wassermenge wieder zugesetzt. Das dabei verwendete Wasser muss zusätzlich Trinkwasserqualität aufweisen. Kommt es bei diesem Vorgang zu einem Verlust an flüchtigen Aromastoffen, müssen diese wieder hergestellt werden und dem Produkt zugefügt werden. Falls eine Eindickung als Herstellungsverfahren verwendet wurde, muss dies in der Saftbeschreibung angeführt werden. [WKO, 2007]

3.3.4. Verbrauch

Laut der Österreichischen Gesellschaft für Ernährung lag der pro Kopf Verbrauch an Obstsäften im Jahre 2009 bei 29,1 Liter. Die dabei zählten Apfelsäfte, Orangensäfte, Multivitaminsäfte und Traubensäfte zu den am meisten konsumierten.

Der Gemüsesaftverbrauch lag im Jahre 2006 etwa bei 1,35 Liter/Kopf. Hierbei waren die beliebtesten Karottensaft, Roter Rübensaft, Tomatensaft und Sauerkrautsaft. [Österreichische Gesellschaft für Ernährung, 2011]

4. Materialien und Methoden

4.1. Chemikalien, Materialien und Geräte

Folgende aufgelistete Chemikalien, Materialien und Geräte wurden bei dieser Diplomarbeit verwendet:

Material	Hersteller
Pipetten	Eppendorf Reference variabel (200µl und 1000µl) Eppendorf AG (Hamburg, D)
Probenröhrchen	Greiner Bio One, Austria
Snap Caps	Agilent Technologies (Deutschland)
SPE C ₁₈ - Kartuschen	Waters Corporation (Milford, USA)
Spritzenfilter	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
Dunkelfarbige Vials	Agilent Technologies (Deutschland)
Waage	Sartorius ISO 9001 Modell KB BA von Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)

Tabelle 7: Verwendete Materialien

Geräte	Hersteller
HPLC	Dionex Austria GmbH, Wien, Österreich
Flugzeit Hybrid Quadrupol ESI Massenspektrometer	Bruker Daltonics GmbH, Deutschland
Zentrifuge	Techno Spin von Sorvall Instruments

Tabelle 8: Verwendete Geräte

Chemikalien	Hersteller
Acetonitril	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
Ameisensäure	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
Ascorbinsäure	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
Folsäure	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
Hippursäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
LC/MS Wasser	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
Methanol	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
Nicotinsäure	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
Pyridoxin	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
Riboflavin	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)
Thiamin	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, D)

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien

Folgende Lösungen wurden zusätzlich hergestellt:

- *Folsäurepuffer für Vorversuch:*

Menge	Substanz
0,34g	Kaliumdihydrogenphosphat
0,44g	Dikaliumhydrogenphosphat

Tabelle 10: Folsäurepuffer

In 250ml Kolben wurden die aufgezählten Substanzen eingewogen und mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden 100ml verwendet.

- *Vitaminmix:*

Menge	Substanz
18,7mg	Thiamin
9,7mg	Riboflavin
14,5mg	Niacin
14,8mg	Pyridoxin
11,1mg	Folsäure
15,7mg	Ascorbinsäure
100ml	Folsäurepuffer

Tabelle 11: Vitaminmix

Diese Substanzen wurden in 500ml Kolben eingewogen und mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

- *Stabilisator Lösung:*

Menge	Substanz
1g	Natriumacetat
9ml	Destilliertes Wasser

Tabelle 12: Stabilisator Lösung

Diese beiden Substanzen wurden zusammen gemischt und von der Lösung wurden 200µl als Stabilisator verwendet.

- *Niacin Lösung:*

Menge	Substanz
10mg	Niacin
100ml	Probe

Tabelle 13: Niacin Lösung

10mg Niacin wurden eingewogen und den 100ml Fruchtsaftproben zugefügt.

- *Hippursäure Lösung:*

Menge	Substanz
10mg	Hippursäure
100ml	Destilliertes Wasser

Tabelle 14: Hippursäure Lösung

Dabei wurden 10mg Hippursäure in 100ml warmen Wasser gelöst. Von dieser Lösung wurden jeweils 200µl für die diversen Probenlösungen verwendet.

- *Vorversuchslösung:*

Menge	Substanz
900µl	Vitaminmix
100µl	Hippursäure Lösung

Tabelle 15: Interne Standardlösung

- *Einzelstandardlösungen:*

Jeweils für Vitamin B₁, B₂, B₃, B₆ und B₉:

Menge	Substanz
10mg	Das jeweilige Vitamin
100ml	Wasser

Tabelle 16: Einzelstandardlösung für B-Vitamine

Für Vitamin C:

Menge	Substanz
100mg	Vitamin C
100ml	Wasser

Tabelle 17: Einzelstandardlösung für Vitamin C

Die Einzelstandards wurden, wie in Kapitel 5.2 genauer beschrieben, weiterbehandelt, um anschließend für jedes Vitamin eine lineare 3-4 Punkt Kalibriergerade zu erstellen.

- *Pufferlösung:*

Menge	Substanz
0,2704g	Kaliumdihydrogenphosphat
0,349g	Dikaliumhydrogenphosphat
200ml	Wasser

Tabelle 18: Pufferlösung

Um Vitamin B₂ und B₉ besser zu lösen, wurden diese in einem Puffer lösbar gemacht.

- *Probenlösung:*

Menge	Substanz
1,6ml	Fruchtsaft
200µl	Stabilisator Lösung
200µ	Interne Standard Lösung

Tabelle 19: Probenlösung

Diese Lösungen wurden zusammen gemischt, um diese anschließend mittels Festphasenextraktion aufzubereiten. Die Auswahl der in dieser Diplomarbeit verwendeten Methoden wurde durch die in einigen Studien bereits erprobte, Herangehensweise erleichtert. [Engel Rita, 2010], [S. Pérez Prieto, 2006]

Die Studien bestätigten, dass für die quantitative Bestimmung der wasserlöslichen B-Vitamine und Vitamin C in Fruchtsäften als Probenvorbehandlung die Festphasenextraktion und anschließend für die Trennung und Auswertung dieser Vitamingruppe die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie besonders geeignet ist. Die Angaben der Einwaage der Vitamine, die im Vitaminmix vorhanden sind, richten sich nach der Löslichkeit des jeweiligen Vitamins.

4.2. Festphasenextraktion

Bei der Festphasenextraktion (SPE, solid phase extraction) handelt es sich um eine Probenvorbereitung, die dem Prinzip der Säulenchromatographie ähnelt. Der zu untersuchende Analyt kann mit diesem Verfahren entweder angereichert, aufgereinigt oder isoliert werden. Bei der Aufkonzentrierung der Analyten werden zu geringe Konzentrationen, falls vorhanden, an die gewünschte Konzentration angepasst. Die Aufreinigung des zu untersuchenden Probenmaterials dient der gezielten Isolierung des Analyten und somit der Abtrennung störender Substanzen.

Die dabei in Kraft tretenden Wechselwirkungen zwischen fester Phase und der flüssigen Phase können polare und unpolare Wechselwirkungen, ionische Wechselwirkungen, Wechselwirkungen über kovalente Bindungen als auch multiple Wechselwirkungen sein. Um die wichtigen Wechselwirkungen zwischen Packmaterial und den Analyten zu ermöglichen, sind verschiedene Phasen notwendig. Bei den Phasen handelt es sich um Normalphasen (NP), Umkehrphasen (RP) oder Ionenaustauschchromatographie.

Einige Vorteile der Festphasenextraktion sind unter anderem die große Selektivität, die Automatisierbarkeit, geringer Verbrauch von Proben und Lösungsmitteln sowie eine hohe Wiederfindungsrate und eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Analyten.

Bei der Normalphase liegt die stationäre Phase als polares Kieselgel vor. Besonders polare Stoffe als auch Heteroatome eignen sich als Analyt. Für die Probenmatrix können unpolare Proben, organische Proben, aber auch feste Proben und Fette verwendet werden. Der Eluent kann in diesem Fall polar, Acetonitril (ACN), Isopropanol oder Methanol sein.

Bei der Umkehrphase eignen sich besonders unpolare, modifizierte Kieselgele als stationäre Phase. Diese Phase sollte bei wässrigen Proben, diversen Extrakten, Seren, Plasma und Urin verwendet werden. Als Eluent können Methanol, Acetonitril, Lösungsmittelgemische als auch Puffer, die unpolar sind, verwendet werden.

Bei dem Ionenaustauschverfahren gibt es zwei verschiedene stationäre Phasen, den Kationenaustauscher sowie den Anionenaustauscher. Bei ersterem werden hauptsächlich basische Lösungen untersucht, beim Anionenaustauscher werden überwiegend Säuren analysiert. Hierbei sollten die Proben in wässriger oder organischer Form vorliegen. Sie dürfen eine geringe Salzkonzentration vorweisen. Zusätzlich können noch biologische Proben und chemische Lösungen mit dieser Methode analysiert werden.

Bei dem Kationenaustauscher muss der Eluent einen höheren pH-Wert aufweisen als die in dem Analyt vorhandene Salzkonzentration. Ebenso sollte für die Elution ein Gegenion verwendet werden. Bei einem Gegenion handelt es sich um ein Ion mit der gegenteiligen Ladung der zu eluierenden Substanz. Bei dem Anionenaustauscher muss der Eluent einen niedrigeren pH-Wert aufweisen, als in der zu untersuchenden Probe vorhandener Salzkonzentration. Auch hier muss ein Gegenion bei der Elution verwendet werden. [Poole, 2003]

Für die Probenaufbereitung werden spezielle Kartuschen, die meistens aus Polypropylen bestehen, verwendet.

Nachdem man sich für die richtige Methode entschieden hat, muss man nun zwischen 3 verschiedenen Festphasenextraktions-Techniken unterscheiden.

1. Analytenretention
2. Fraktionierung
3. Matrixretention

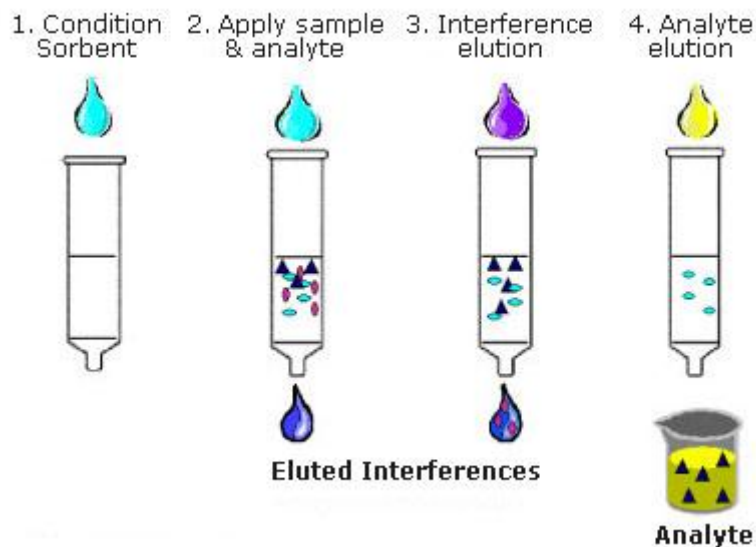


Abbildung 7 Schema der Festphasenextraktion [Crawford Scientific, 2010]

Ad Analytenretention:

Die gebräuchlichste Form der SPE ist in diesem Fall die „Bind and Elute-Technik“. Es erfolgt eine Retention, bei der die Analyten an das Sorbens gebunden werden und dadurch störende Substanzen ausgewaschen werden. Durch die Anreicherung der zu untersuchenden Substanzen innerhalb einer Phase oder auch zwischen zwei Phasen wird ein Stoff absorbiert. Dieser sorbierende Stoff wird Sorbens genannt. Um die Analyten, die an die feste Phase gebunden sind, weiter für diverse Analysen zu verwenden, wird ein weiteres Lösungsmittel hinzugefügt. [Waters, 2002]

Ad Fraktionierung:

Bei der Fraktionierung werden Bestandteile die an verschiedenen Sorbens gebunden sind, nach einander durch Änderung des pH-Wertes des Eluenten oder der organischen Stoffe eluiert. [Beyer, 2010]

Ad Matrixretention:

Bei der Matrixretention werden im Unterschied zur Retention, unerwünschte Stoffe am Sorbens gebunden. Durch ein entsprechendes Lösungsmittel kann der Analyt das Säulensystem entlang fließen. [Poole, 2003]

Nach folgendem Schema wird bei der Festphasenextraktion vorgegangen:

1) Probenvorbehandlung:

Die zu untersuchende Substanz muss für die SPE dementsprechend vorbereitet werden. Dies kann zum Beispiel durch pH-Einstellung, zentrifugieren, filtrieren, verdünnen oder Pufferzugabe geschehen. Nach diesem Schritt liegt sie in gelöster Form, als Isolat, in einem Lösungsmittel vor. [Waters, 2002] [Beyer, 2008]

2) Konditionierung:

Ein Lösungsmittel, wie z.B. Acetonitril oder Methanol im Fall der Umkehrphase wird auf die SPE-Kartuschen aufgetragen. Mit der Konditionierung wird das Sorbens aufnahmefähig gemacht. Das bedeutet, dass durch diesen Vorgang die funktionellen Gruppen des Sorbens mit wässriger Lösung benetzt werden können. Da es sich bei dem Sorbens um ein sehr poröses Teilchen handelt, muss die Oberfläche benetzt sein, um die maximalen Wechselwirkungen zu erzielen.

Bei der Konditionierung sind folgende wichtige Schritte einzuhalten: 1-2 Säulenvolumina Methanol, dieses sollte langsam einwirken. Nach der kurzen Einwirkzeit tropft das Methanol langsam durch die Säule. Wichtig dabei ist noch, dass das Sorbens nicht trocken laufen darf, somit sollte der Vorgang unterbrochen werden, wenn die Flüssigkeit knapp über dem Filter steht. Danach wird 1-2 Säulenvolumina Wasser aufgetragen und wird ebenfalls langsam durch getropft.

Auch hier ist es wichtig, dass das Sorbens nicht trocken läuft, da dadurch eine geringe Wiederfindungsrate der zur untersuchenden Substanz als Folge auftreten könnte. Die Einwirkzeit ist auch wichtig, da das Lösungsmittel eine gewisse Zeit braucht um in alle Poren zu gelangen. Falls die Substanzen zu schnell durchfließen, könnte dies einen Verlust der Leistungsfähigkeit der Kartusche mit sich bringen. [Beyer, 2009]

3) Equilibrierung:

Um eine maximale Adsorption und konstante Wechselwirkungen der Substanz zu bekommen, muss die Auswahl des Sorbens im pH-Wert und der Polarität ähnlich der zu untersuchenden Substanz sein. [Waters, 2002]

4) Probenaufgabe:

Während die Probe durch das Sorbens geführt wird, wird das Isolat in der Sorbensphase angereichert. Dabei kann das Lösungsmittel die feste Phase passieren. Durch diesen Vorgang wird der Analyt adsorbiert. [Beyer, 2009]

5) Waschen:

Das Waschen bewirkt das Entfernen störender Begleitstoffe. Dies wird durch ein sehr stark polares Lösungsmittel hervorgerufen. Der Analyt hingegen wird dabei nicht von der Säule gewaschen. [Beyer, 2009]

6) Elution:

Um die Analyten aus der stationären Phase zu lösen wird hier ein Lösungsmittel mit unpolarer Elutionskraft eingesetzt. Dadurch kann der Analyt schrittweise eluiert werden. Die auftretenden Wechselwirkungen zwischen dem Analyt und dem Lösungsmittel sind stärker als die Wechselwirkung zwischen Analyt und Sorbens. Das Eluat kann nach diesem Schritt weiter verarbeitet und analysiert werden. [Beyer, 2009]

4.2.1. Probenvorbehandlung mittels SPE

Bevor die Proben mittels SPE behandelt wurden, mussten die Dicksäfte (z.B.: Bio Natur Pur Fruchtsaft) noch ab zentrifugiert werden. Dies geschah bei 1000 Umdrehungen/min. ca. 1,5 Minuten lang.

Für die SPE wurden Sep-Pak Säulen Vac C₁₈ von Waters Coporation verwendet. In einem Eprovettenständer wurden Plastikeprouvetten aufgestellt, in denen die SPE-Säulen platziert wurden. Mit Hilfe einer Plastikspritze konnten die Probenlösungen durch die Säulen transportiert werden.

Für die Konditionierung der SPE wurde Methanol und für die Equilibrierung Wasser verwendet. Für die Elution der SPE wurden Methanol und Wasser in einem Verhältnis 85:15 (v/v) gemischt. Die SPE wurde stufenweise durchgeführt und die daraus resultierenden Eluate in dunkelfärbigen Vials gesammelt und bei -20C° bis zur Trennung und Analyse mittels HPLC/MS aufbewahrt.

Jeder durchgeführte Schritt wurde dokumentiert und nach folgendem Schema durchgeführt:

Vorgang	Substanze	Menge	Verhältnis
Konditionierung	Methanol	2ml	
Equibilierung	Wasser	2ml	
Probenaufgabe	Diverse Fruchtsäfte	2ml	
Waschen	Wasser	2ml	
Elution	Methanol : Wasser	2ml	85:15

Tabelle 20: SPE-Schema

4.3. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Chromatographie ist eine physikalische Methode für Trennungen, in welcher die zu trennenden Komponenten zwischen der stationären und der mobilen Phase aufgeteilt werden. Die mobile Phase liegt in flüssiger Form vor, die entweder durch oder entlang einer stationären Phase in eine bestimmte Richtung fließt. Während die stationäre Phase von Festkörpern, Gelen oder Flüssigkeiten passiert werden kann, können dies bei der mobilen Phase nur diverse labile Flüssigkeiten oder Gase. [Ardrey, 2003]

Eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie besteht aus 4 Komponenten:

1. Apparat für die Probeneingabe
2. mobile Phase
3. stationäre Phase
4. Detektor

[Ardrey, 2003]

Die HPLC (High performance liquid chromatography) entwickelte sich in den 60er Jahren aus der Säulenchromatographie. Man erkannte, dass die Trennleistungen einer Säule mit abnehmender Korngröße der stationären Phase stetig zunehmen. Da die Partikelgrößen der Trennmaterialien sehr gering sind, erfordern sie deswegen höhere Drucke bis zu 400 bar.

Obwohl die HPCL teuer und mit einem höheren technischen Aufwand verbunden ist, hat sie sich auf Grund ihrer hohen Leistungsfähigkeit sehr stark durchgesetzt. [Crawford Scientific, 2010]

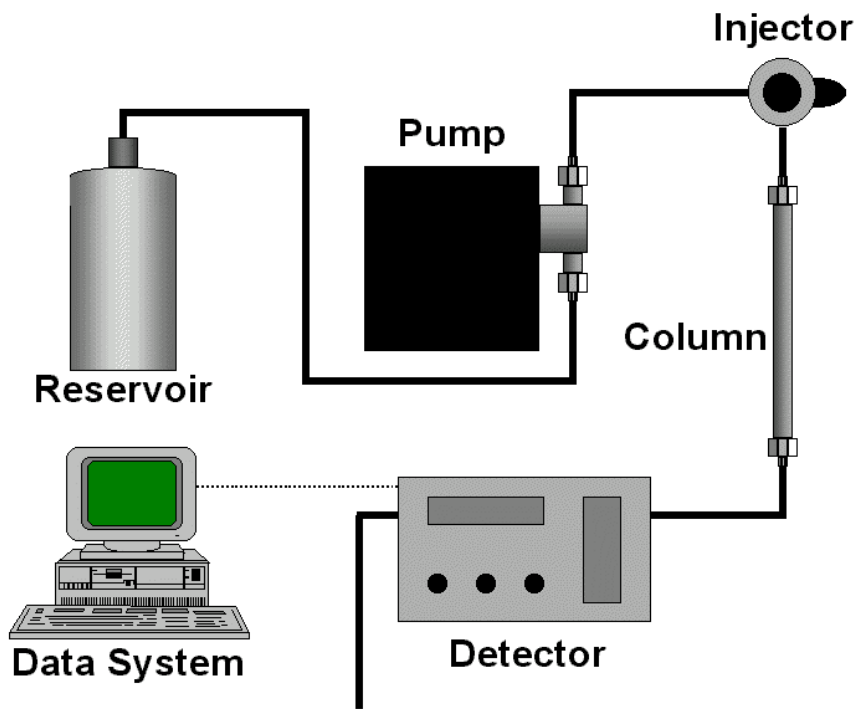


Abbildung 8: Aufbau einer HPLC [LC Ressources Inc., 2001]

Eine HPLC besteht aus folgenden Komponenten:

1. Eluentenmischung
2. Injektor
3. Pumpe
4. Säule
5. Mobile Phase
6. Detektor

[Ardrey, 2003]

Ad 1 Die Eluentenmischung:

Die Eluentenmischung kann entweder aus einem Niederdruckgradienten oder aus einem Hochdruckgradienten bestehen.

Bei dem Niederdruckgradienten wird das Elutionsmittel vor der Pumpe gemischt. Diese Methode ist günstiger und erfordert einen geringeren apparativen Aufwand. Ein Nachteil dieses Gradienten ist aber, dass Luftblasen in der Mischkammer entstehen können.

Bei dem Hochdruckgradienten wird das Elutionsmittel nach der Pumpe gemischt. Hier benötigt jede Komponente eine eigene für sie geeignete Pumpe, die sehr teuer sein kann. Im Gegensatz zu dem Niederdruckgradienten entstehen hier unter hohem Druck kaum Luftblasen. [LC Ressources Inc., 2001]

Ad 2 Der Injektor:

Die Aufgabe des Injektors ist das Auftragen der Proben unter sehr hohem Druck auf die Säulen. Die zu untersuchende Probe wird mit der mobilen Phase auf die Säule aufgetragen. Dabei zu beachten ist, dass das Volumen der Probe genau definiert sein muss, der Eluentenstrom nicht unterbrochen werden darf, es kaum zu einer Bandverbreiterung kommen sollte, das Volumen der Probe veränderbar, als auch für hohen Druck geeignet sein sollte. [Zuern, 2011]

Ad 3 Die Pumpe:

Hier wird der Eluent mit gleichbleibendem Fluss gegen einen höheren Druck befördert. Der vorhandene Druck ist abhängig von der Teilchengröße der stationären Phase und ebenso von der Säulenlänge. [Zuern, 2011]

Ad 4 Die Säule:

Es gibt sowohl analytische Säulen, die 2-4mm Durchmesser haben, als auch präparative Säulen, die 8-50mm Durchmesser besitzen. Je nach Aufgabengebiet und Probengröße werden diese unterschiedlich eingesetzt. Zusätzlich gibt es noch

chemische und physikalische Parameter, um eine geeignete Säule für die Auftrennung auszuwählen.

Unter den chemischen Parametern versteht man die Wechselwirkungen zwischen dem Probenmolekül und den Packungsmaterialien. Bei den physikalischen Parametern handelt es sich um die Partikeldurchmesser, die Porengrößen, die Säulenlänge und den Säulendurchmesser. Diese Parameter haben großen Einfluss auf die Geschwindigkeit, die Auflösung, den Säulendruck, den Lösungsmittelverbrauch und der Detektierbarkeit. [Zuern, 2011]

Ad 5 Die mobile Phase:

Ähnlich wie schon weiter oben bei der SPE beschrieben, gibt es auch bei der HPLC zwei stationäre Phasen, nämlich die Normalphase und die Umkehrphase.

Bei der Normalphase wird Kieselgel oder Aluminiumoxid als polares Säulenmaterial verwendet und dient üblicherweise für die Analyse von polaren Stoffen. Die Eluenten sind unpolar. Die Proben müssen im Eluenten lösbar sein und gleichzeitig polare Molekülbereiche für die Wechselwirkung mit der Säule aufweisen. Diese Methode wird aber kaum mehr verwendet.

Die Umkehrphase ist ein unpolares, also hydrophobes Adsorptions-System. Hier ist die mobile Phase polar, das bedeutet hydrophil. Für die Umkehrphase geeignete Materialien sind meistens Kieselgele, deren Oberflächen meist aus Silanol-Gruppen, die durch chemische Umwandlung mit Dialkyldichlorsilanen gebunden sind, bestehen. Dadurch erhält man stabile Materialien mit Kohlenwasserstoffketten, die 2-18 C-Atome besitzen können. Je länger die Alkylketten sind, desto unpolarer sind sie.

Bei dieser Methode werden unpolare Stoffe stärker zurückgehalten als polare, da eine erhöhte Wechselwirkung mit dem unpolaren Säulenmaterial besteht. Somit gilt, je polarer das Laufmittel ist, umso schneller werden polare Verbindungen eluiert. Je unpolarer das Laufmittel ist, desto besser eignet es sich für die Elution aliphatischer Verbindungen.

Für die mobile Phase werden Gemische aus polaren Lösungsmitteln (Methanol, ACN) und Wasser verwendet. Je mehr organisches Lösungsmittel im Verhältnis zu Wasser verwendet wird, desto höher ist die Elutionskraft. [Ardrey, 2003]

Ad 6 Der Detektor:

Detektoren für die HPLC sollten eine hohe Empfindlichkeit aufweisen um kleinste Mengen nachweisen zu können. Hierbei werden die analytischen Informationen der vorher durchgeführten Trennung messbar und sichtbar gemacht. Dabei werden immer physikalische Informationen in elektrische Signale umgewandelt. Wichtig ist eine kurze Ansprechzeit für steile Peaks und eine hohe Stabilität. Ebenso ist ein kleines Messzellenvolumen für eine niedrige Rückvermischung erforderlich. [Academic.ru, 2011]

Folgende Detektortypen sind im Einsatz:

	Spezifität	Linearer Bereich	Limit of Detection
UV/VIS	selektiv	10^4	ng
Refraktometrischer-Detektor	universell	10^3	μg
Fluoreszenz-Detektor	sehr selektiv	10^3 - 10^4	pg
Elektrochemischer-Detektor	sehr selektiv	10^5	pg
Kopplung mit Massenspektrometrie	universell	10^3 - 10^4	pg

Tabelle: Detektoren der HPLC

UV/VIS: Arbeitet wie ein Photometer und detektiert eine abgeschwächte Form des Lichtstrahles. Somit können mit diesem Detektor alle Teilchen detektiert werden, die im ultravioletten Bereich Licht absorbieren können. Dabei werden die Teilchen pro Volumen der durchströmenden Flüssigkeit bestimmt.

Die Einheit des Signals ist Masseneinheit pro Volumeneinheit. Somit handelt es sich hier um einen konzentrationsabhängigen Detektor. Um mehr Verbindungen zu detektieren, können kurzwellige Detektionswellenlängen ausgewählt werden, da im langwelligen bzw. visuellen Bereich nur wenige Verbindungen detektiert werden können. [Zuern, 2011] [Ardrey, 2003]

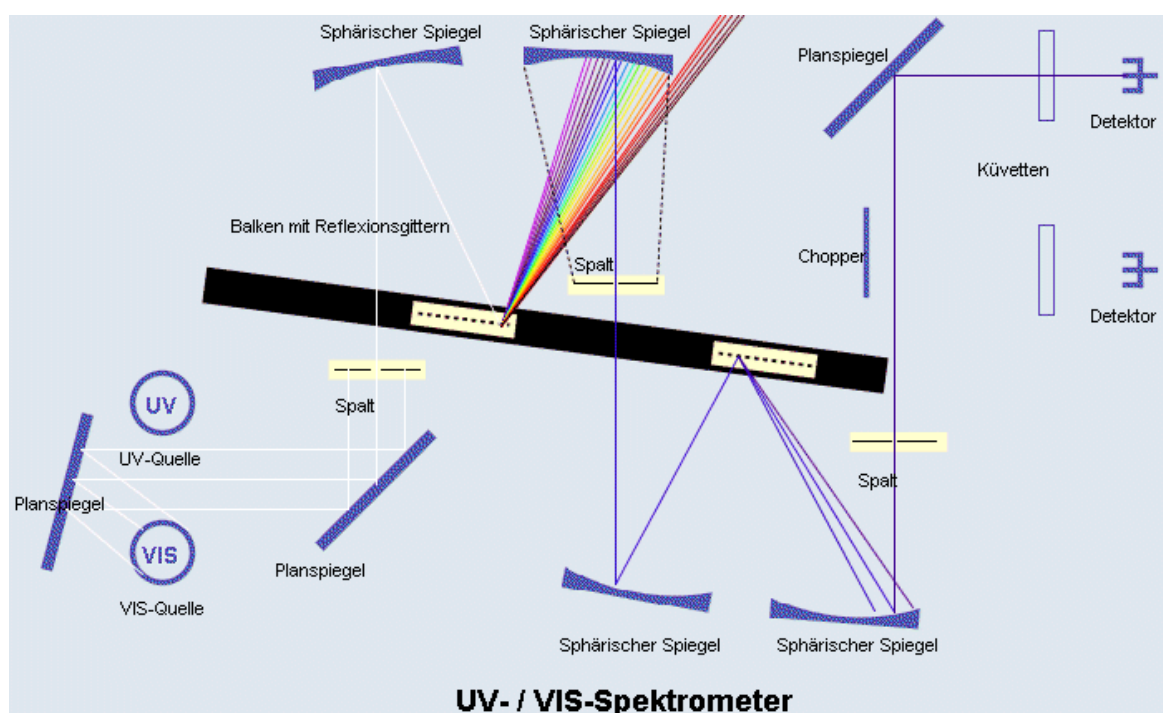


Abbildung 9: Aufbau eines UV-VIS Detektors [Zuern, 2011]

Fluoreszenzdetektor: Durch einen Anregungsstrahl wird Fluoreszenz ausgelöst. Im Gegensatz zum UV/VIS-Detektor ist er sehr empfindlich und kann somit fluoreszierende Substanzen detektieren und gehört dadurch zu den spektroskopischen Detektoren. [Zuern, 2011]

Elektrochemischer Detektor: Hier werden Änderungen des Stromflusses aufgezeichnet, die zwischen zwei Polen stattfinden, die durch die zu untersuchende Substanz verursacht wird. [LC Ressources Inc., 2001]

4.4. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) gehört zu den Analysetechniken, mit denen bestimmte Molekülmassen freier Ionen im Hochvakuum bestimmt werden.

Bei dieser Methode werden die zu untersuchenden Probenmoleküle in der Gasphase ionisiert. Die Probenmoleküle werden anschließend durch ein elektrisches Feld beschleunigt und auf einer Flugbahn, welche unterschiedliche Flugradialen aufweist, gedrängt. Danach werden die Probenteilchen unterteilt.

Mit der Massenspektrometrie kann man das Verhältnis Molekülmasse zu Ionenladung feststellen. Ebenso können einzelne Strukturen von den zu analysierenden Substanzen charakterisiert werden. Sie dient auch der Erkennung bekannter Verbindungen diverser Stoffe, durch einen Vergleich der unterschiedlichen Spektren aus den Proben mit denen, die in der Datenbank vorhanden sind. [Academic.ru, 2011]

Aufbau eines Massenspektrometers:

Der Massenspektrometer setzt sich aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor zusammen. Die Ionenquelle ist für die Ionisation des Analyten verantwortlich. Die Moleküle werden in einem elektrischen Feld aus der Ionenquelle gewonnen und anschließend in den Analysator überführt.

Hier werden die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis aufgetrennt. Je nach Art der Auftrennung gibt es unterschiedliche Analysatoren. Um die getrennten Ionen zu erfassen, wird der Detektor benötigt. Häufig eingesetzte Detektoren sind der Sekundärelektronenvervielfacher, der Faraday - Auffänger, der Daly – Detektor oder auch die Mikrokanalplatten. [Academic.ru, 2011]

Bei dieser Diplomarbeit wurde mit einem Flugzeitmassenspektrometer (Time-of-Flight) gearbeitet. Das Grundprinzip des Flugzeitmassenspektrometers basiert auf der Bestimmung von Masse/Ladung.

In diesem Fall werden Ionen in einem elektrisch geladenen Feld beschleunigt. Danach durchströmen sie eine Flugstrecke. Die beschleunigten Ionen gelangen mit zunehmender Masse zu dem Auffänger, welcher sich am Ende des Flugrohres befindet. Das bedeutet, dass leichtere Ionen zuerst anlangen. Die Massentrennung geschieht auf Grund der unterschiedlich vorhandenen Masse der geladenen Teilchen, welche auch mit unterschiedlicher Geschwindigkeit getrennt werden. Das Auflösungsvermögen kann durch die Flugrohrlänge bestimmt werden. [Universität Stuttgart, Institut für Raumfahrtssysteme, 2011]



Abbildung 10: Flugzeitmassenspektrometer [Daltonics, 2011]

4.5. Kopplung von Massenspektrometrie und HPLC

Bei der Kopplung dieser zwei Geräte ist die HPLC für die Auftrennung und das Massenspektrum für die Bestimmung der Substanzen verantwortlich. [Gay, 2008]

Bei dieser Diplomarbeit wurde der Flugzeitmassenspektrometer mit einer Elektrosprayionisationsquelle (ESI) ausgestattet. Die ESI-Quelle wurde für die Erzeugung der Ionen eingesetzt. Hier werden die Proben in einem elektrischen Feld zerstäubt, die unter Einsatz eines Trägergases bei Atmosphärendruck sowohl die Zerstäubung der vorhandenen Lösung als auch die Verdampfung des Lösungsmittels verursacht.

Bei diesem Vorgang kommt es zu einem Zerfall der Tropfen. Dadurch werden Analytionen freigesetzt. Dies wird als Desolvatisierung bezeichnet. [Die Massenspektrometrie, 2010]

Die Desolvatisierung verursacht den Transport der Ionen aus der vorhandenen Lösung in die Gasphase. [Bahr U, 2002]

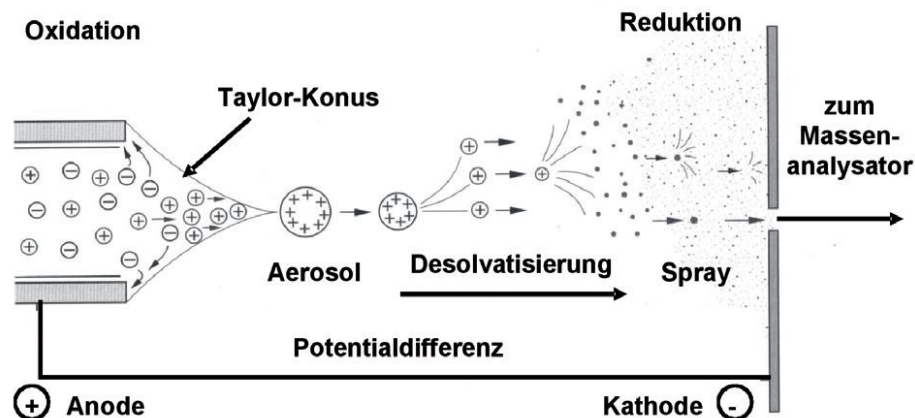


Abbildung 11: Der Prozess der Elektrospray-Ionisation schematisch [Die Massenspektrometrie, 2010]

Mit einem Flugzeitmassenspektrum als Massenanalysator können die erzeugten Ionen, welche verschiedene Massen besitzen, durch ein statisch elektrisches Feld beschleunigt werden. Sie werden durch vier Quadrupol-Stäbe, welche parallel angeordnet sind, transportiert. Die Selektierung kann dadurch gleichzeitig vorgenommen werden. Wichtig dabei ist, dass nur Teilchen mit einer genau

definierten Masse das Flugfeld durchlaufen können. Um die Ionen detektieren zu können, werden sie nacheinander auf den Detektor geschossen und der zu jedem einzelnen Ion passende Ionenstrom gemessen und anschließend aufgezeichnet. [Bahr U, 2002]

Software bei dieser Diplomarbeit:

Folgende Softwareprogramme wurden für die Trennung und Auswertung der Probenlösungen verwendet:

- Für HPLC: Hystar Version 3.2 User Manual von Bruker Daltonics GmbH (Deutschland)
- Für MS: micrOTOF control 2.1 User Manual von Bruker Daltonics GmbH(Deutschland)
- Für HPLC/MS Auswertung: Data Analysis TM 3.4 User Manual von Bruker Daltonics GmbH (Deutschland)

4.6. Herstellung einer Standardlösung für die Etablierung einer HPLC/MS Methodik zur quantitativen Analyse wasserlöslicher B-Vitamine und Vitamin C

Eine Standardlösung wurde mittels Vitaminmix hergestellt. Dieser wurde am gleichen Tag wie die Versuchsmessungen hergestellt und anschließend bei -20°C eingefroren. Hippursäure wurde als interner Standard hinzugefügt. Dabei wurden 100mg Hippursäure in 100ml warmen Wasser aufgelöst. Von dieser Lösung wurden 100 μl verwendet. Somit setzte sich die Standardlösung aus 900 μl Vitaminmix und 100 μl Hippursäure zusammen.

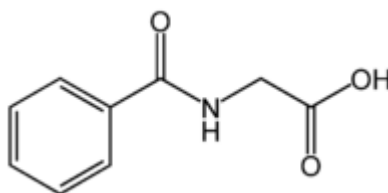


Abbildung 12: Hippursäure [Sigma-Aldrich, 2010]

Bei der Hippursäure handelt es sich um eine organische Carbonsäure, die farb- und geruchlos ist und eine molare Masse von $179,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ besitzt. Ihre wichtigste Aufgabe liegt in der Abtötung von Bakterien im Harn. [Sigma-Aldrich, 2010]

Diese Standardlösung wurde mittels HPLC/MS gemessen. Zusätzlich wurden Messungen mittels Wasser und Hippursäure und Wasser, Hippursäure und Stabilisator durchgeführt, um festzustellen, ob die einzelnen Komponenten untereinander reagieren.

Die erste Lösung setzte sich aus 1,8ml Wasser und 200 μl Hippursäure und die zweite Lösung setzte sich aus 1,6ml Wasser, 200 μl Hippursäure und 200 μl Stabilisator Lösung zusammen. Dabei stellte sich heraus, dass die einzelnen Komponenten keinen Einfluss aufeinander ausüben.

Die Messung der internen Standardlösung diente zur Überprüfung des Einflusses der Hippursäure auf die einzelnen Vitamine. Hier stellte man ebenfalls fest, dass die

Hippursäure keinen Einfluss auf die Auftrennung und Auswertung der einzelnen Vitamine hatte. Sie eignete sich somit sehr gut als interner Standard.

4.7. HPLC/ESI-MS Grundlagen für die Analyse der wasserlöslichen B-Vitamine und Vitamin C

Die Trennung und Analyse der wasserlöslichen B-Vitamine und des Vitamin C erfolgte durch einen UltiMate 3000 Series Hockdruckflüssigkeits-Chromatographen (Dionex Austria GmbH) und einem Flugzeitmassen Hybrid Quadrupol ESI Massenspektrometer (Bruker Daltonics GmbH).

Die HPLC-Grundlagen zur Analyse der Proben waren wie folgend aufgelistet:

- Injektion: Programmdauer 30 Minuten, Injektionsvolumen: 0,3ml/min.
- HPLC-Säule: C₁₈ Säule mit einem Durchmesser von 5µm
- Mobile Phase: Gradienten Elution, Eluent A: Methanol, Eluent B: Wasser mit 0,1% Ameisensäure
- Wellenlänge: 266nm und 290nm
- Ofentemperatur: 4C°
- Flussrate: 0,3ml/min.

Die MS-Grundlagen wurden wie folgt für die ESI-Detektion verwendet:

- RF Start Masse: 220,0 Vpp
- RF Step Masse: 110,0 Vpp
- Timing: 50:50
- Kollisionsgas: Argon
- Scan-Bereich: 100-1000 m/z
- Drying Gas Flussrate: 1,6l/min.
- Drying Gas Temperatur: 15°C
- Nebulizergasdruck: 8bar

5. Ergebnisse

5.1. Auswertung des Vorversuchs

Ein Vorversuch wurde mittels einer internen Standardlösung unternommen. Dabei sollte herausgefunden werden, ob die einzelnen zu untersuchenden Vitamine mittels der ausgewählten Methode detektierbar sind, diese sich gegenseitig beeinflussen und zu welcher Minute welches Vitamin angezeigt wird.

Vitamin	Molekulare Masse im positiven Bereich	Einwaage pro 500ml	Errechneter Wert pro 100ml	mAU
Vitamin C	177	15,7mg	3,14mg	260671,64
Folsäure	442	11,1mg	2,22mg	51185,86
Niacin	124	14,5mg	2,9mg	21354,64
Thiamin	265	18,7mg	3,74mg	14082,10
Riboflavin	377	9,7mg	1,94mg	20792,06
Pyridoxin	170	14,8mg	2,96mg	5102,53

Tabelle 21: Ergebnisse interne Standardlösung

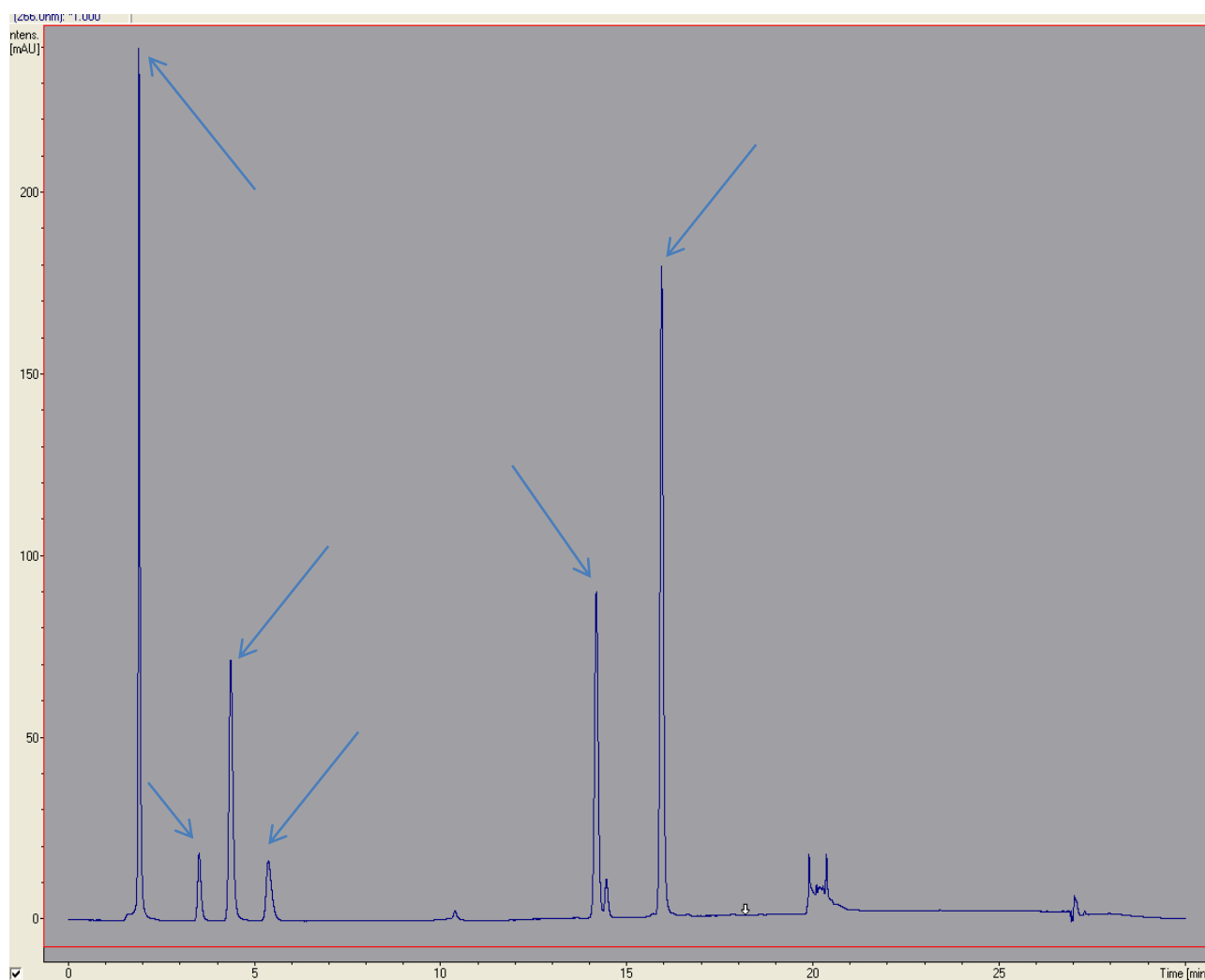


Abbildung 13: Auswertung des Vorversuchs mittels UV/VIS-Detektor

Die Auftrennung und Peak-Darstellung der einzelnen Vitamine werden in Abbildung 13 genau dargestellt. Hier wird die genaue Reihenfolge der zu untersuchenden Vitaminpeaks gezeigt. Die Vitamine erscheinen in dieser Reihenfolge: Thiamin, Vitamin C, Niacin, Pyridoxin, Riboflavin und Folsäure.

5.2. Auswertung und Ergebnisse der Einzelstandardlösungen:

Alle Messungen fanden im positiven Bereich statt.

Die Einzelstandards wurden, wie im Kapitel 4.1 dargestellt, vorbereitet. Diese wurden dann anschließend in mehreren Schritten verdünnt, um für das jeweilige Vitamin eine Mehrpunkt Kalibriergerade zu erstellen. Diese wurden für die Auswertungen der Proben benötigt, um feststellen zu können, wie viel der des jeweiligen Vitamins in den untersuchten Getränken tatsächlich enthalten ist.

Verdünnungsschritte:

Vitamin B ₁ , B ₂ , B ₃ und B ₆	
1) Ausgangslösung	10mg Vitamin pro 100ml Wasser
2) 1:2 Verdünnung	500µl Ausgangslösung und 500µl Wasser
3) 1:10 Verdünnung	100µl Ausgangslösung und 900µl Wasser
4) 1:100 Verdünnung	10µl Ausgangslösung und 990µl Wasser

Tabelle 22: Verdünnungsschritte für Vitamin B₁, B₂, B₃ und B₆

Vitamin C	
1) Ausgangslösung	100ml Vitamin auf 100ml Wasser
2) 1:2 Verdünnung	500µl Ausgangslösung und 500µl Wasser
3) 1:10 Verdünnung	100µl Ausgangslösung und 900µl Wasser
4) 1:20 Verdünnung	50µl Ausgangslösung und 950µl Wasser
5) 1:100 Verdünnung	10µl Ausgangslösung und 990µl Wasser

Tabelle 23: Verdünnungsschritte für Vitamin C

Vitamin B ₉	
1) Ausgangslösung	10mg Vitamin auf 100ml Wasser
2) 1:10 Verdünnung	100µl Ausgangslösung und 900µl Wasser
3) 1:100 Verdünnung	10µl Ausgangslösung und 990µl Wasser
4) 1:10 Verdünnung	100µl Lösung 3 und 900µl Wasser

Tabelle 24: Verdünnungsschritte für Vitamin B₉

5.2.1. Kalibriergerade der UV/VIS Messungen

Die folgenden Kalibriergeraden wurden aus den Ergebnissen der Verdünnungsschritte erstellt. Auf der X-Achse sind die Konzentrationen in mg und auf der Y-Achse die mAU dargestellt.

In der rechten oberen Ecke der Grafik findet sich die Gleichung der Regressionsgeraden inklusive dem R^2 .

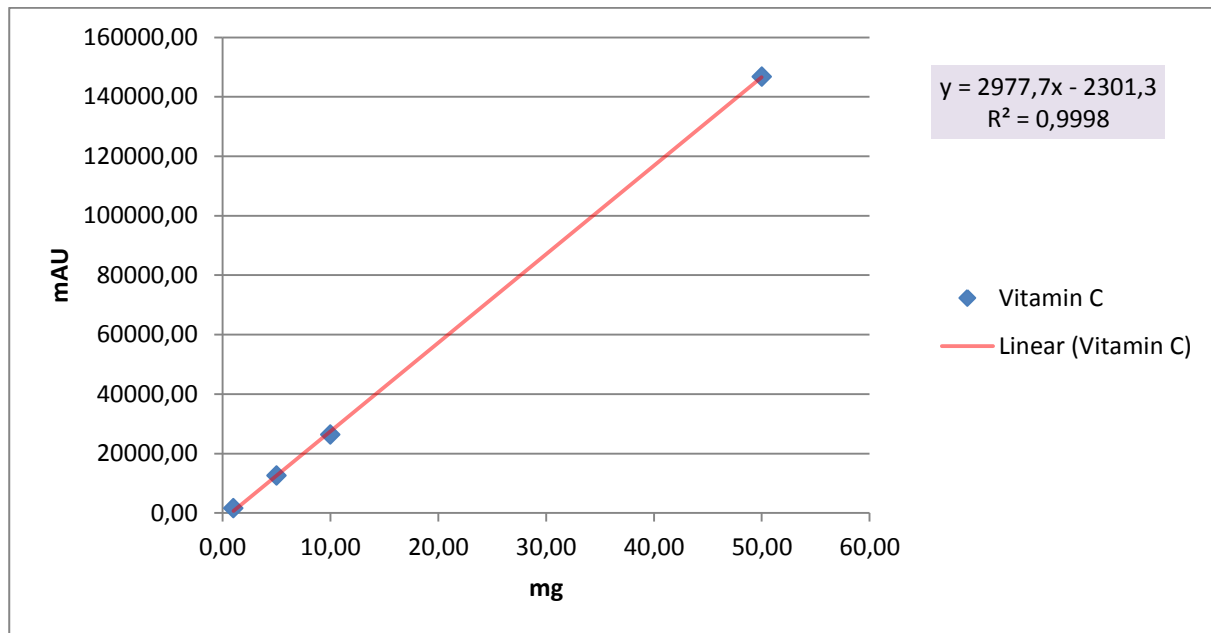
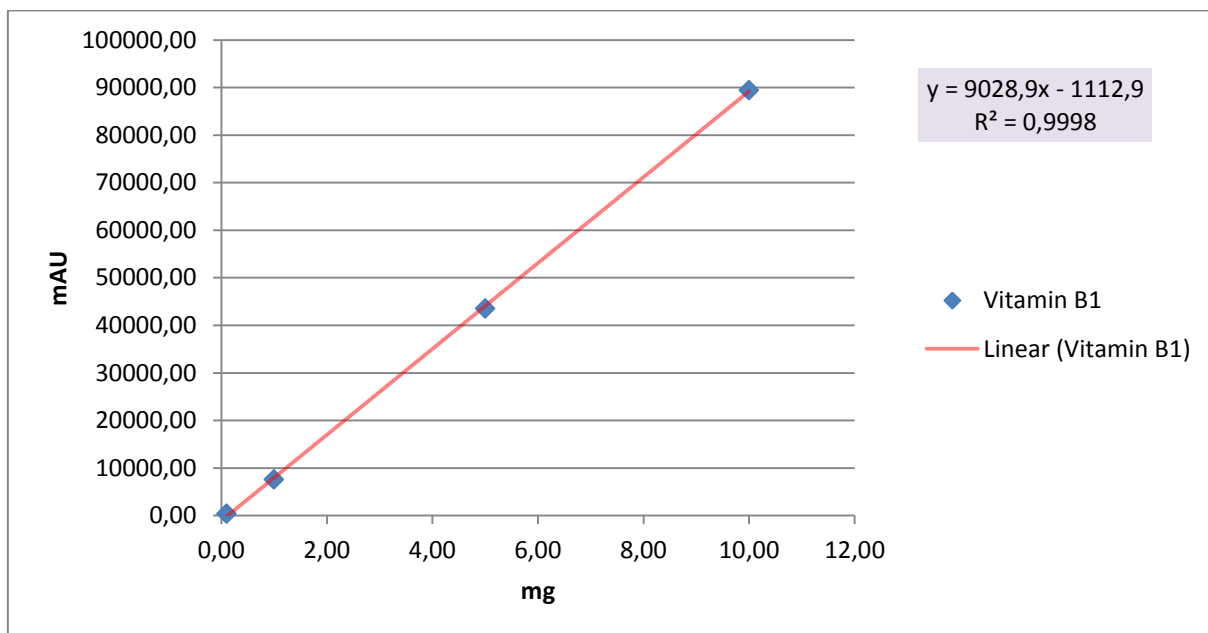
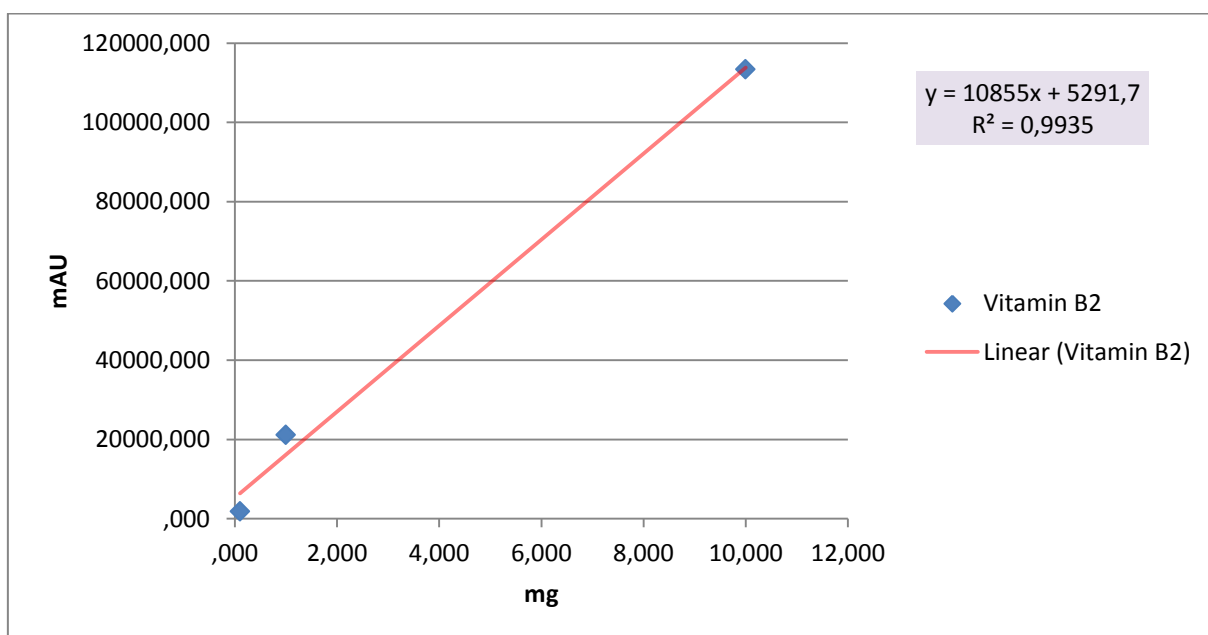


Abbildung 14: Kalibriergerade Vitamin C mittels UV/VIS

Abbildung 15: Kalibriergerade Vitamin B₁ mittels UV/VISAbbildung 16: Kalibriergerade Vitamin B₂ mittels UV/VIS

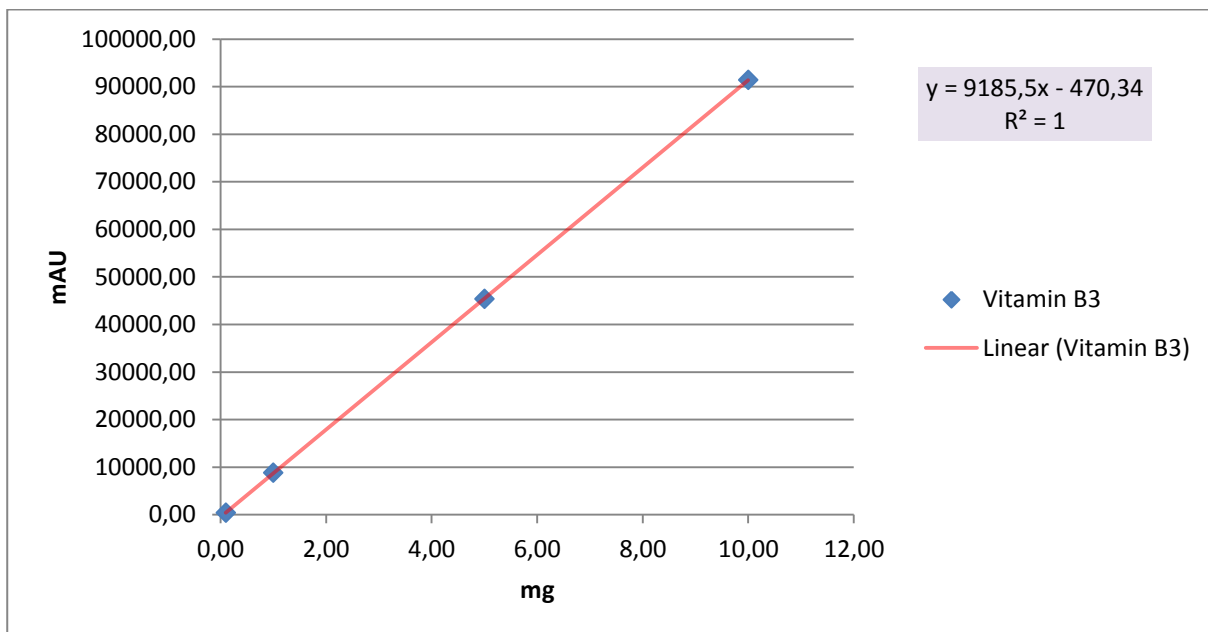


Abbildung 17: Kalibriergerade Vitamin B₃ mittels UV/VIS

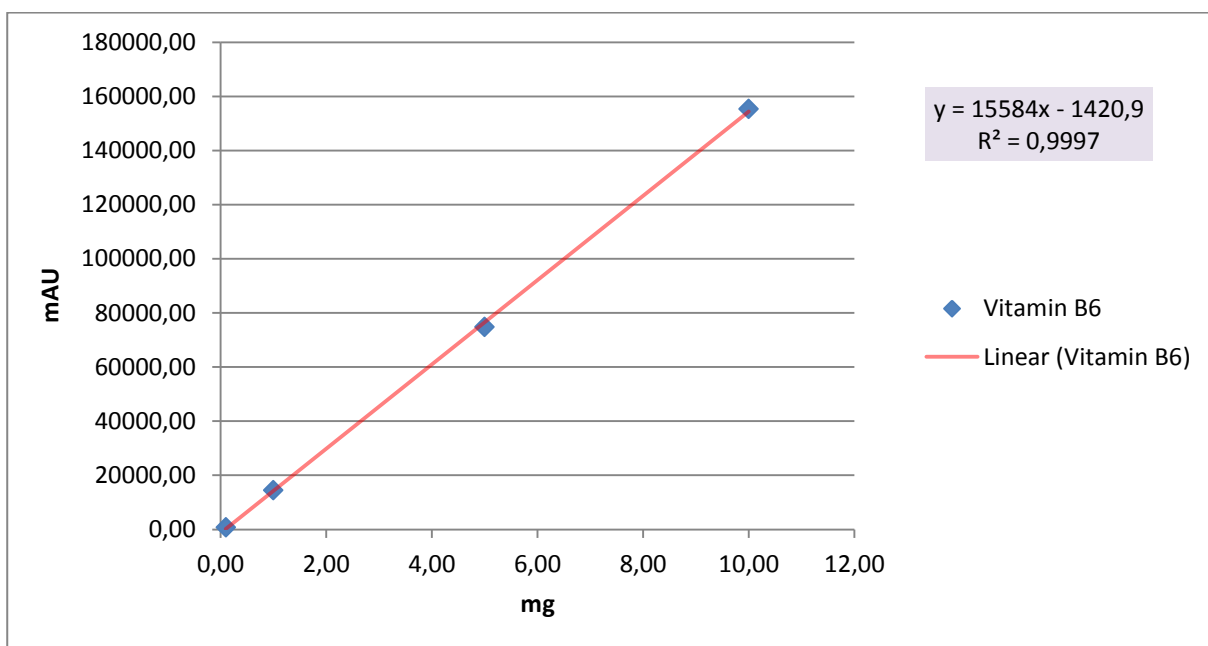


Abbildung 18: Kalibriergerade Vitamin B₆ mittels UV/VIS

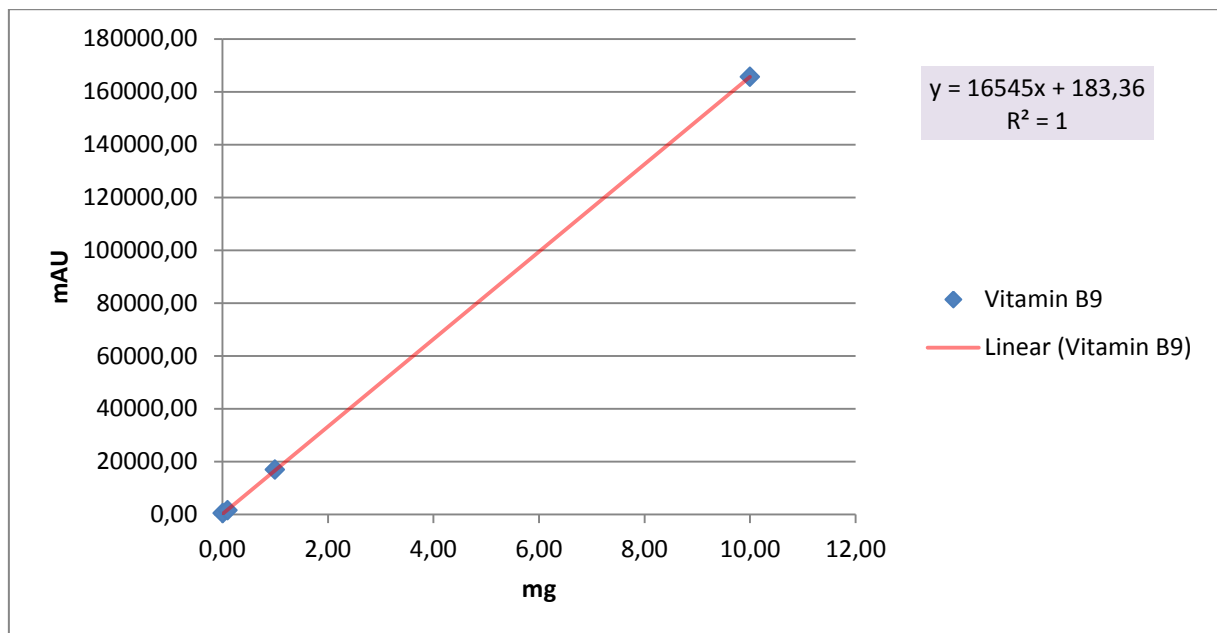


Abbildung 19: Kalibriergerade Vitamin B₉ mittels UV/VIS

5.2.2. Kalibriergerade der MS Messung

Die folgenden Kalibriergeraden wurden aus den Ergebnissen der Verdünnungsschritte erstellt. Auf der X-Achse sind die Konzentrationen in mg und auf der Y-Achse die Masse durch Ladung (m/z) dargestellt.

In der rechten oberen Ecke der Grafik findet sich die Gleichung der Regressionsgeraden inklusive dem R^2 .

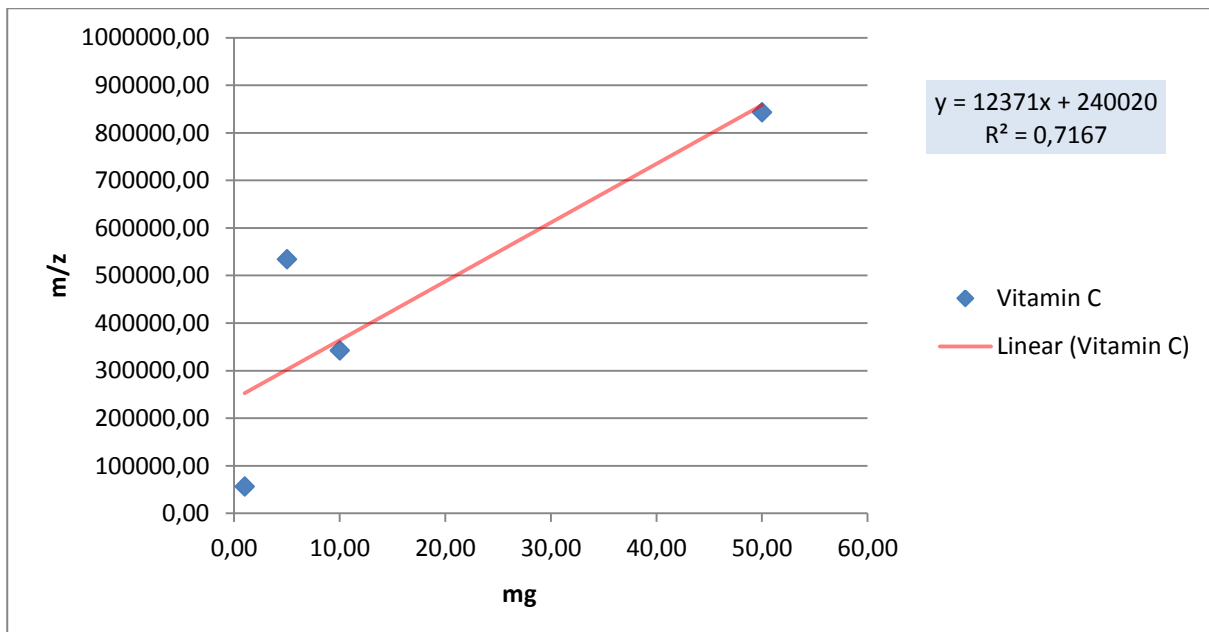


Abbildung 20: Kalibriergerade Vitamin C mittels MS

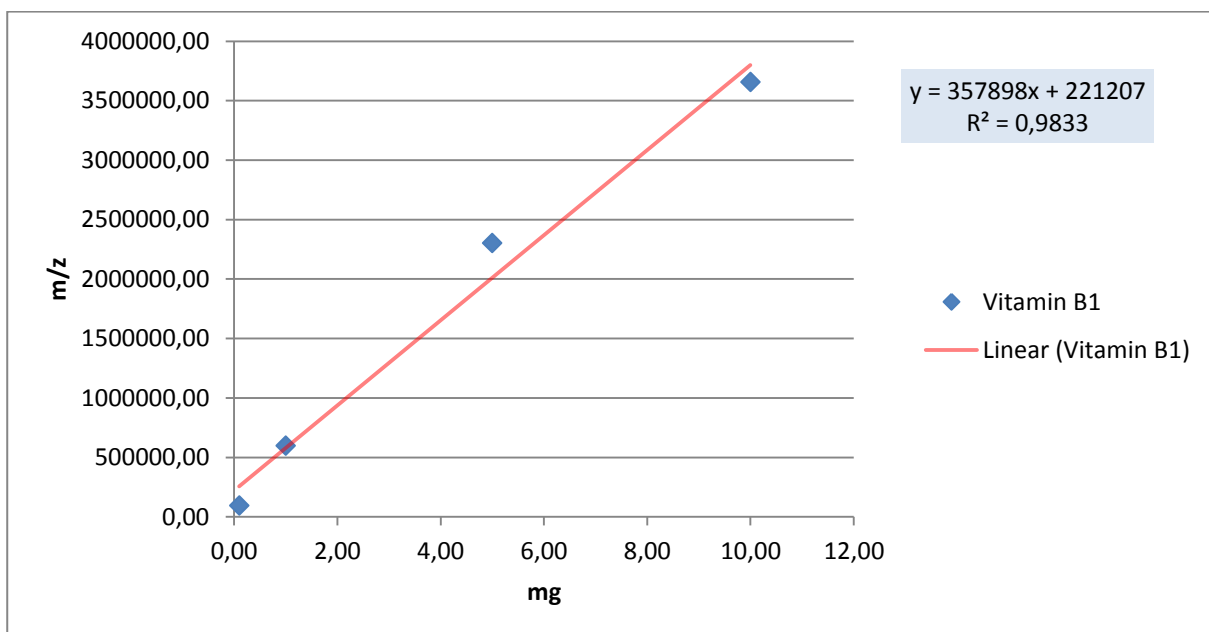
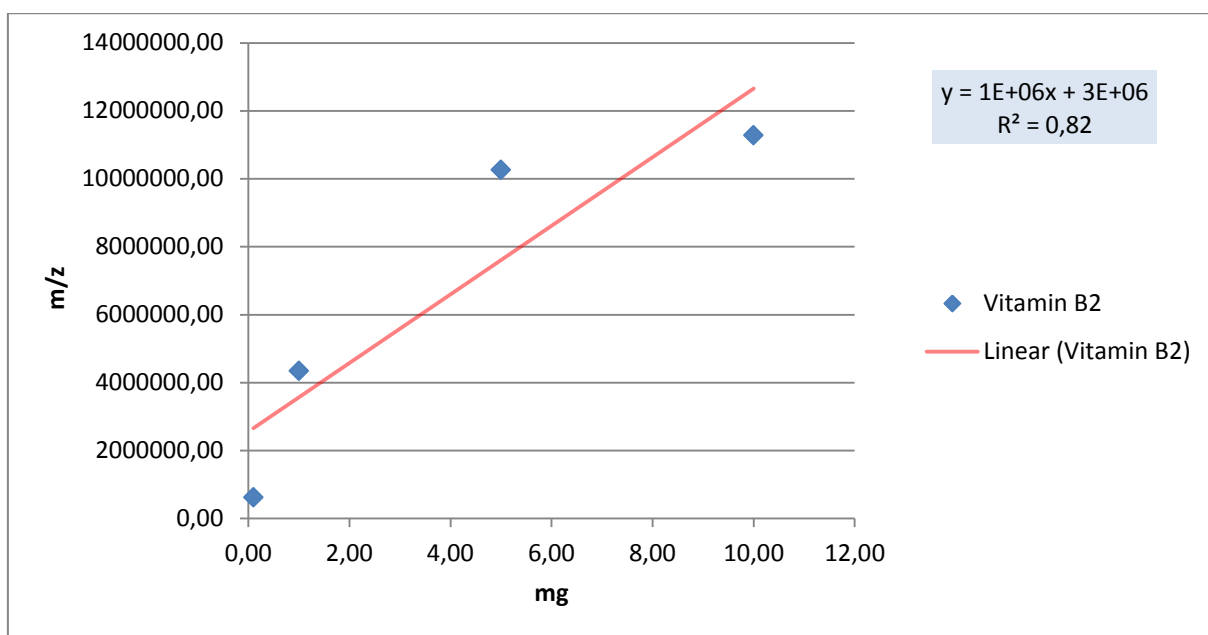
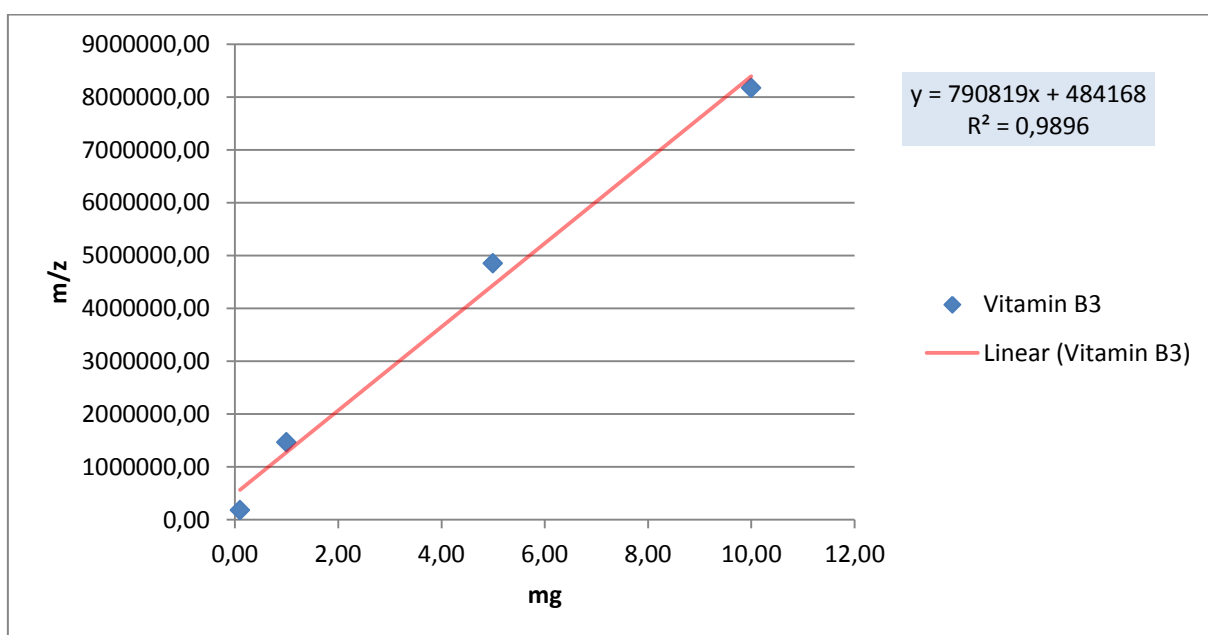


Abbildung 21: Kalibriergerade Vitamin B₁ mittels MS

Abbildung 22: Kalibriergerade B₂ mittels MSAbbildung 23: Kalibriergerade Vitamin B₃ mittels MS

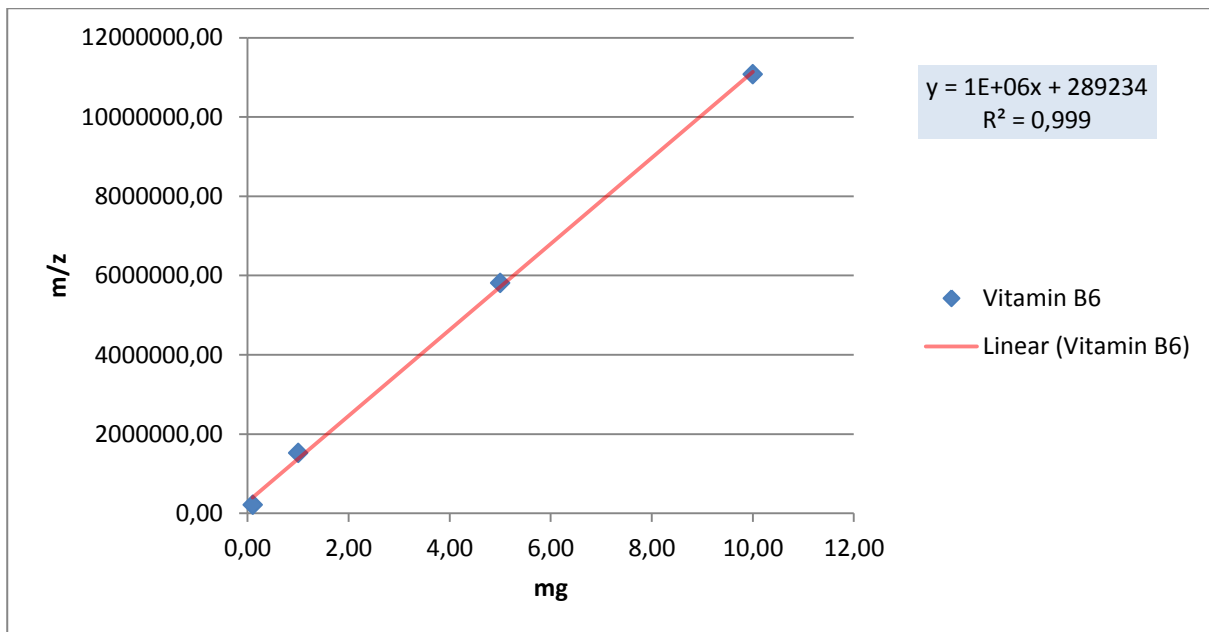


Abbildung 24: Kalibriergerade Vitamin B₆ mittels MS

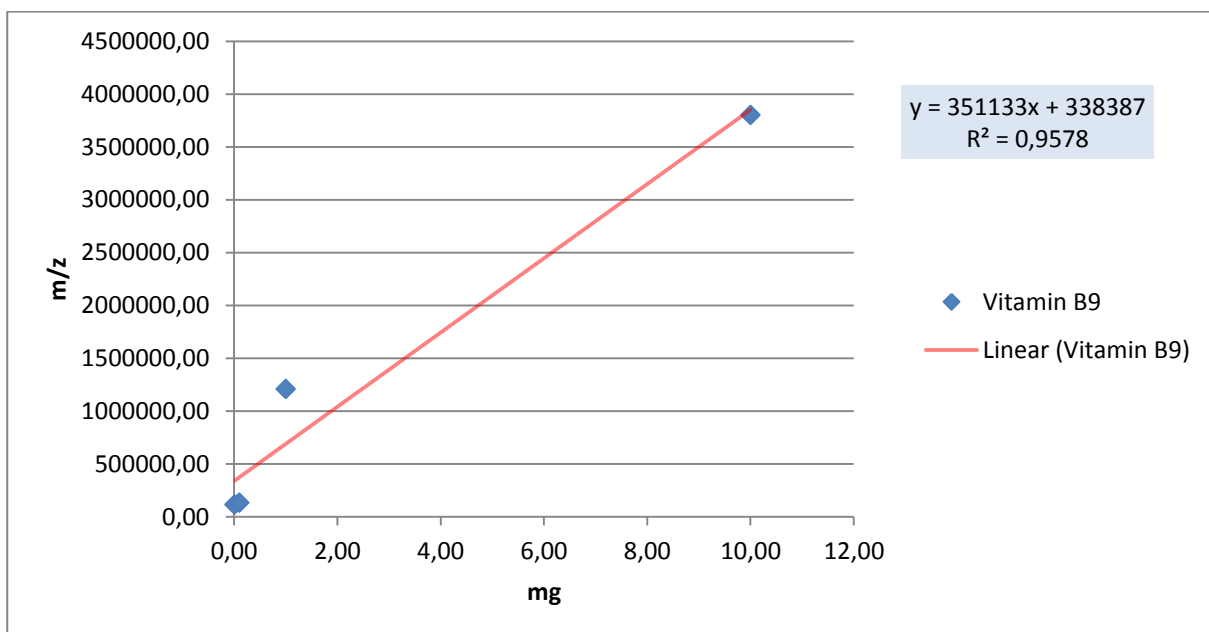


Abbildung 25: Kalibriergerade B₉ mittels MS

5.3. Korrelation der UV/VIS mit der MS Standards

Bei der UV/VIS und MS werden die Vitamine auf unterschiedliche Weise gemessen. In den folgenden Diagrammen werden die beiden Einheiten in Relation gesetzt, bei der die gleichen Vitaminkonzentrationen einen Punkt bilden. Auf der X-Achse befinden sich somit die Werte der MS und auf der Y-Achse die Werte der UV/VIS.

Dabei sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass bei jedem Vitamin die im Kapitel 5.2 durchgeführten Konzentrationen verwendet werden.

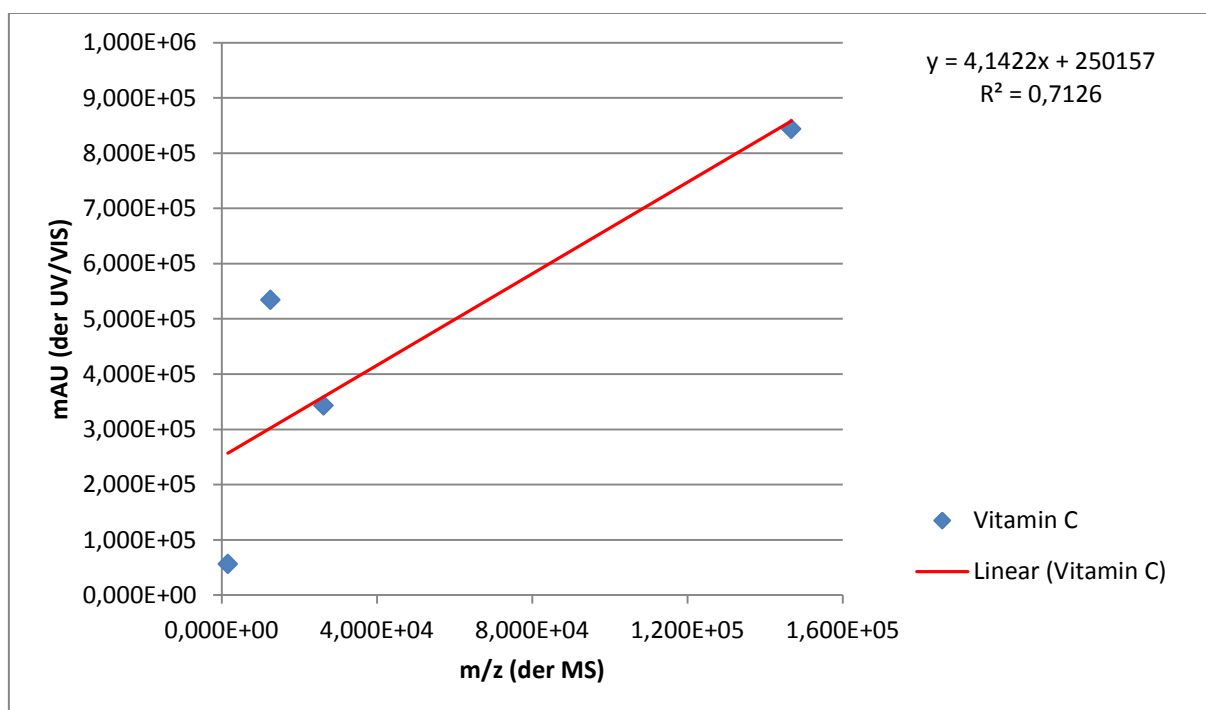


Abbildung 26: Korrelation zwischen UV/VIS und MS des Vitamins C

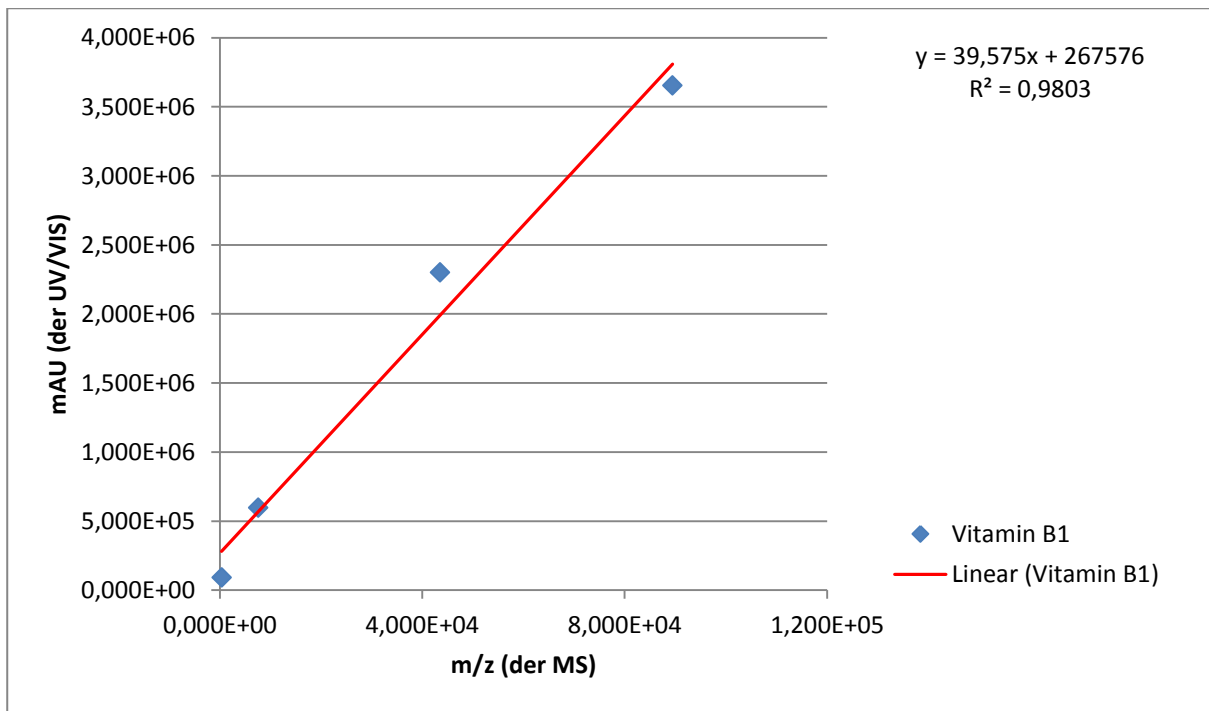


Abbildung 27: Korrelation zwischen UV/VIS und MS des Vitamins B₁

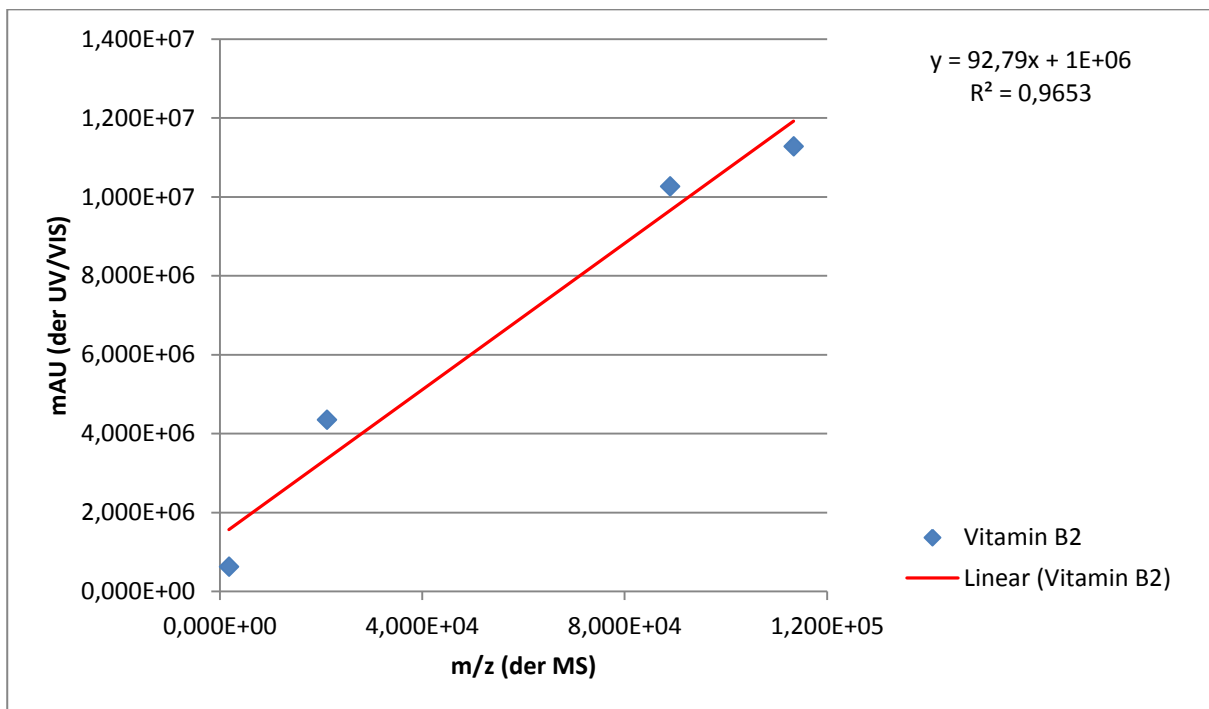
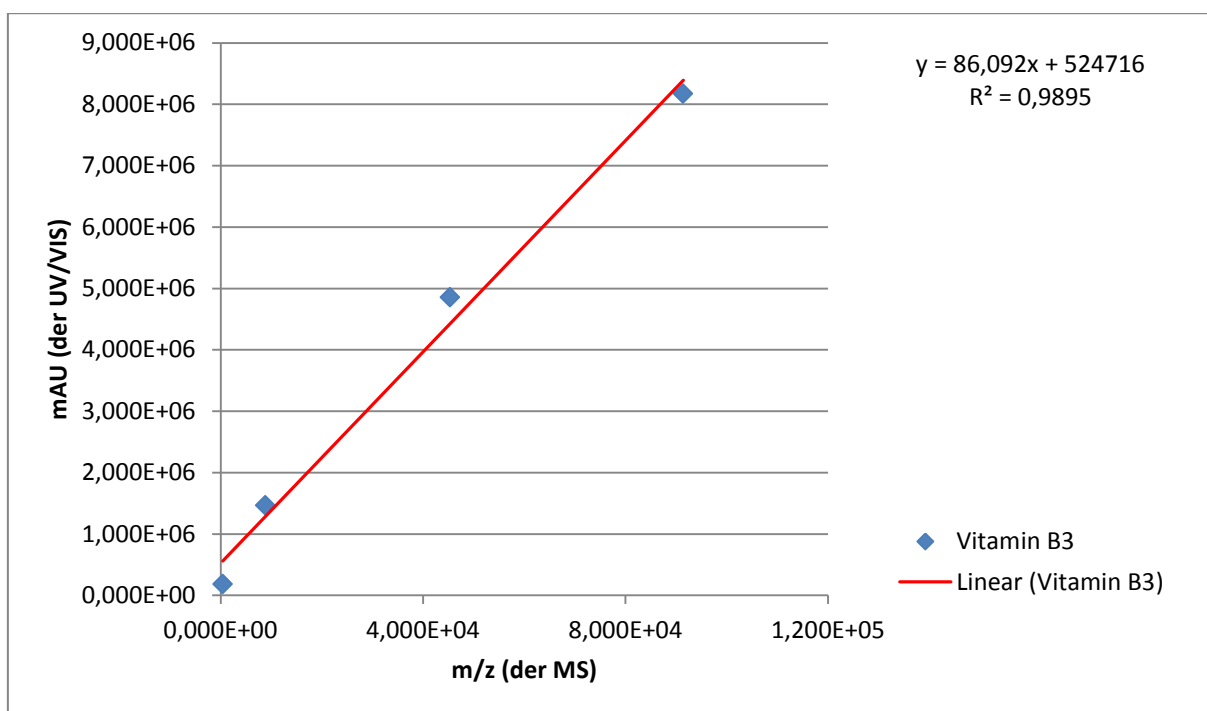
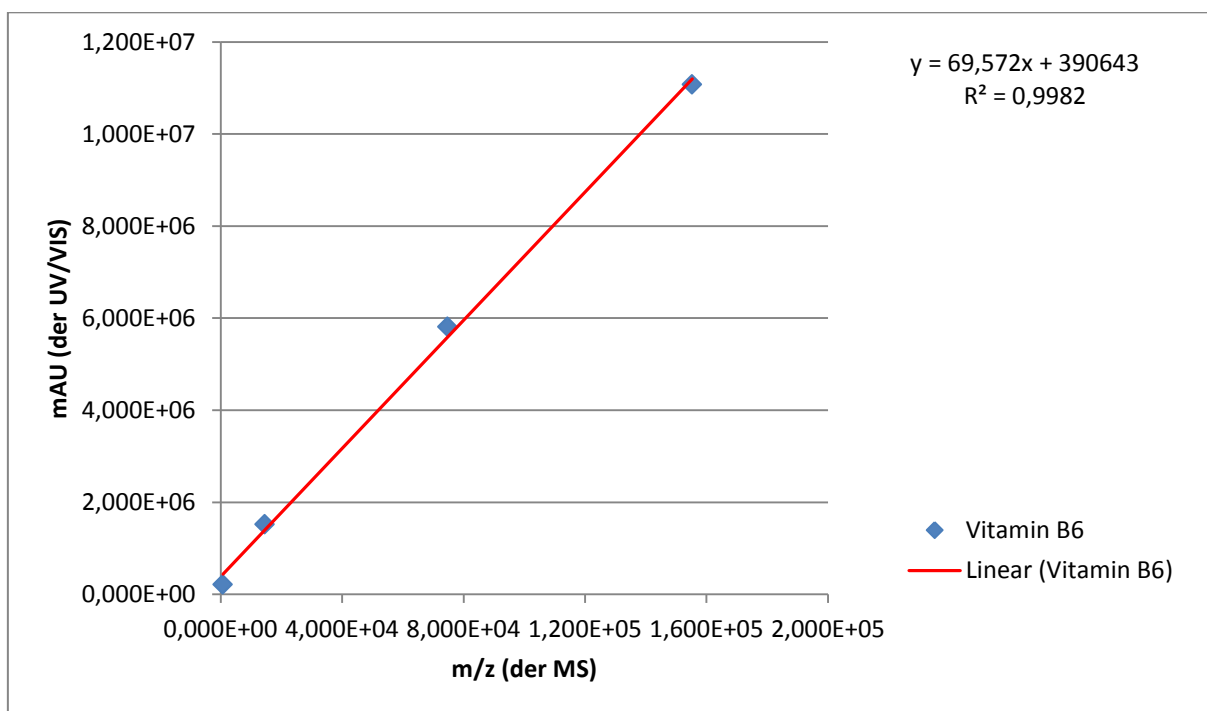


Abbildung 28: Korrelation zwischen UV/VIS und MS des Vitamins B₂

Abbildung 29: Korrelation zwischen UV/VIS und MS des Vitamins B₃Abbildung 30: Korrelation zwischen UV/VIS und MS des Vitamins B₆

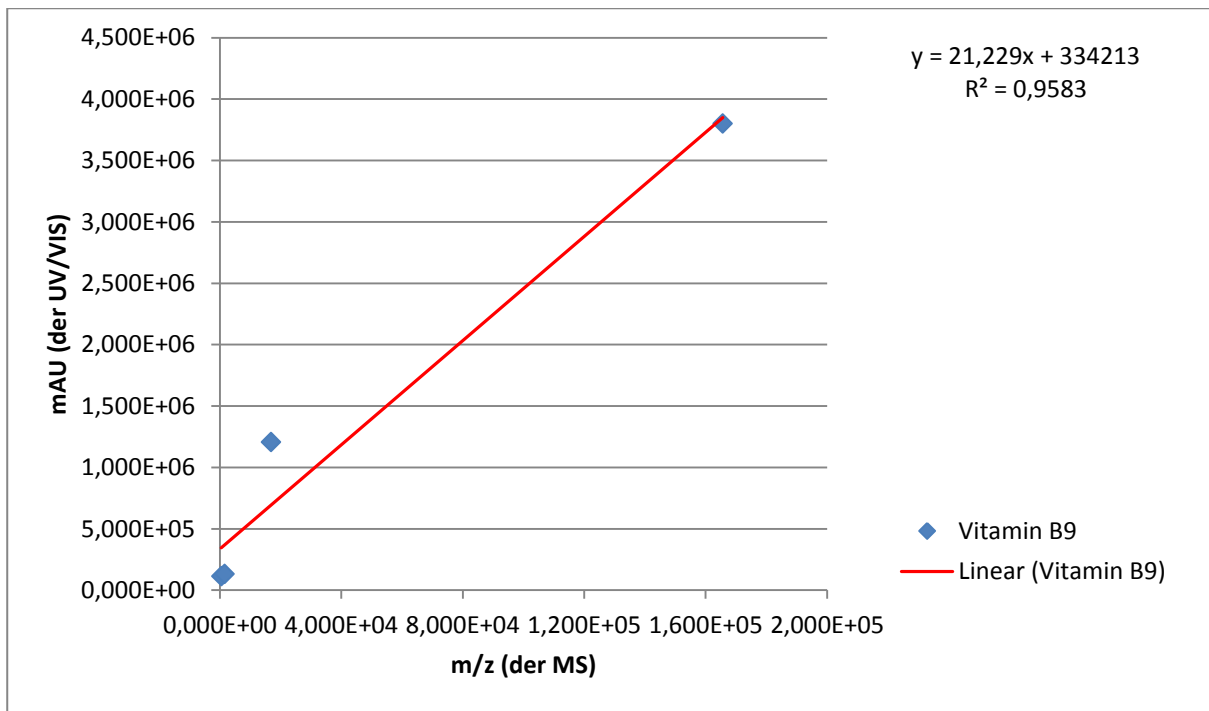


Abbildung 31: Korrelation zwischen UV/VIS und MS des Vitamins B₉

5.4. Ergebnisse der Auswertung von Obst- und Gemüsesäften mittels HPLC/UV-MS

Durch die Auswertung der internen Standardlösung konnten die zu analysierenden Proben und die enthaltenen Vitaminmengen mit den Verpackungsangaben rückgerechnet und verglichen werden. Die Produkte wurden in folgende Kategorien eingeteilt:

- Kindergetränke
- Kohlensäurehaltige Getränke
- Multivitaminsäfte
- Brausetabletten
- Bio-Säfte
- Tee

5.4.1. Ergebnisse der Auswertung von Kindergetränken mittels UV/VIS-Detektor

Bezeichnung	Vitamin	errechneter Wert pro 100ml	Verpackungsangabe pro 100ml
Fruchtsaft 1			
	Vitamin C	k.A.	9mg
	Folsäure	27,75µg	30µg
	Niacin	k.A.	2,7mg
	Thiamin	0,41mg	0,21mg
	Riboflavin	k.A.	k.A.
	Pyridoxin	1,20mg	0,3mg
Fruchtsaft 2			
	Vitamin C	k.A.	21mg
	Folsäure	3360,75µg	30µg
	Niacin	0,52mg	k.A.
	Thiamin	0,23mg	k.A.
	Riboflavin	k.A.	k.A.
	Pyridoxin	0,22mg	k.A.

Fruchtsaft 3		
Vitamin C	k.A.	k.A.
Folsäure	1181,05µg	30µg
Niacin	0,68mg	k.A.
Thiamin	k.A.	k.A.
Riboflavin	k.A.	k.A.
Pyridoxin	k.A.	0,3mg

Tabelle 25: Ergebnisse der Auswertung von Kindergetränken mittels UV/VIS-Detektor

5.4.2. Ergebnisse der Auswertung von kohlenensäurehaltigen Getränken mittels UV/VIS-Detektor

Bezeichnung	Vitamin	errechneter Wert pro 100ml	Verpackungsangabe pro 100ml
Fruchtsaft 4			
	Vitamin C	k.A.	k.A.
	Folsäure	30,41µg	30µg
	Niacin	k.A.	k.A.
	Thiamin	k.A.	k.A.
	Riboflavin	k.A.	k.A.
	Pyridoxin	k.A.	k.A.
Fruchtsaft 5			
	Vitamin C	k.A.	9mg
	Folsäure	8,41µg	30µg
	Niacin	1,41mg	0,023mg
	Thiamin	0,36mg	0,21mg
	Riboflavin	k.A.	0,15mg
	Pyridoxin	1,09mg	0,3mg

Tabelle 26: Ergebnisse der Auswertung von kohlenensäurehaltigen Getränken mittels UV/VIS-Detektor

5.4.3. Ergebnisse der Auswertung von Multivitaminsäften mittels UV/VIS-Detektor

Bezeichnung	Vitamin	errechneter Wert pro 100ml	Verpackungsangabe pro 100ml
Fruchtsaft 6			
	Vitamin C	5,26mg	35mg
	Folsäure	225,85µg	100µg
	Niacin	0,89mg	9mg
	Thiamin	0,24mg	0,7mg
	Riboflavin	k.A.	0,8mg
	Pyridoxin	0,45mg	1mg
Fruchtsaft 7			
	Vitamin C	k.A.	9mg
	Folsäure	2830,34µg	30µg
	Niacin	1,65mg	2,7mg
	Thiamin	0,48mg	0,21mg
	Riboflavin	k.A.	k.A.
	Pyridoxin	1,96mg	0,3mg

Fruchtsaft 8			
Vitamin C	k.A.	6,24mg	
Folsäure	88,57µg	20,8µg	
Niacin	k.A.	k.A.	
Thiamin	k.A.	k.A.	
Riboflavin	k.A.	k.A.	
Pyridoxin	k.A.	0,208mg	
Fruchtsaft 9			
Vitamin C	k.A.	30mg	
Folsäure	2251,09µg	100µg	
Niacin	k.A.	9mg	
Thiamin	0,8mg	0,7mg	
Riboflavin	0,8mg	0,8mg	
Pyridoxin	3,35mg	1mg	

Tabelle 27: Ergebnisse der Auswertung von Multivitaminsäften mittels UV/VIS-Detektor

5.4.4. Ergebnisse der Auswertung von Brausetabletten mittels UV/VIS-Detektor

Bezeichnung	Vitamin	errechneter Wert pro 100ml	Verpackungsangabe pro 100ml
Brausetablette 1			
	Vitamin C	k.A.	60mg
	Folsäure	0,22mg	5mg
	Niacin	k.A.	k.A.
	Thiamin	k.A.	k.A.
	Riboflavin	k.A.	k.A.
	Pyridoxin	k.A.	k.A.
Brausetablette 2			
	Vitamin C	k.A.	60mg
	Folsäure	23,07µg	100µg
	Niacin	k.A.	15mg NE
	Thiamin	0,7mg	1,1mg
	Riboflavin	k.A.	1,5mg
	Pyridoxin	2,34mg	1,6mg

Brausetablette 3			
Vitamin C	k.A.	60mg	
Folsäure	219,78µg	200µg	
Niacin	k.A.	15mg NE	
Thiamin	1,02mg	1,4mg	
Riboflavin	1,7mg	1,6mg	
Pyridoxin	4,17mg	2mg	
Brausetablette 4			
Vitamin C	k.A.	80mg	
Folsäure	245,92µg	200µg	
Niacin	k.A.	16mg NE	
Thiamin	0,96mg	1,1mg	
Riboflavin	k.A.	1,4mg	
Pyridoxin	4,42mg	1,4mg	

Tabelle 28: Ergebnisse der Auswertung von Brausetabletten mittels UV/VIS-Detektor

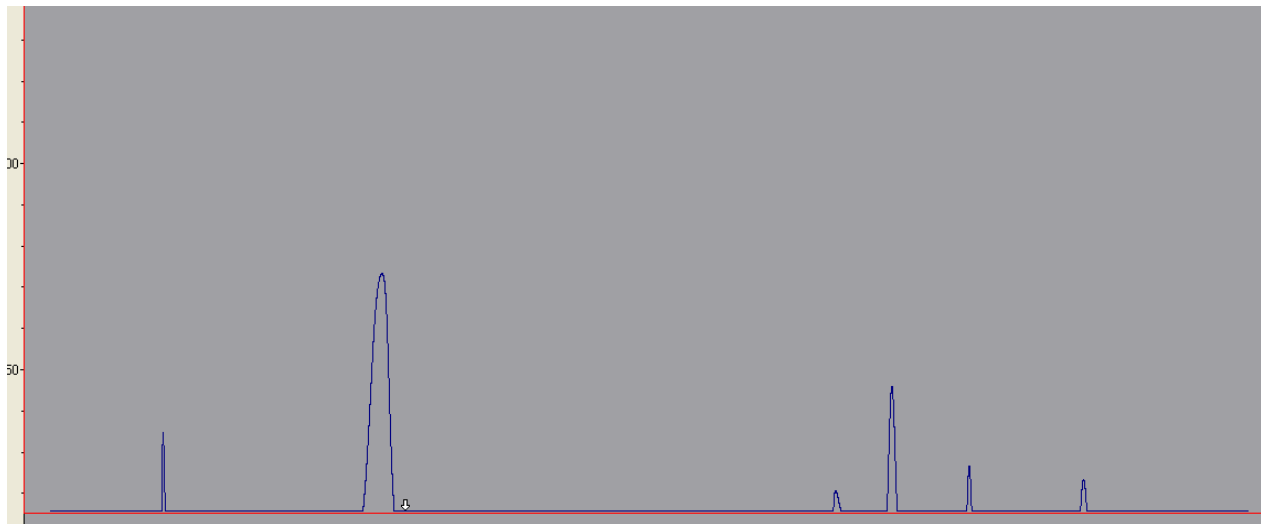


Abbildung 32: Auflösung Brausetablette 4 mittels UV/VIS-Detektor

Bei Abbildung 32 handelt es sich um ein Beispiel der Auswertung der zu untersuchenden Vitamine in den vorhandenen Proben. Alle aufbereiteten Proben wiesen Peaks in unterschiedlicher Intensität auf, die im Vergleich mit der internen Standard Auswertung interpretiert wurden und anschließend auf die Verpackungsangaben rückgerechnet wurden.

5.4.5. Ergebnisse der Auswertung von Bio-Säften mittels UV/VIS-Detektor

Bezeichnung	Vitamin	errechneter Gehalt pro 100ml	Verpackungsangabe pro 100ml
Fruchtsaft 10			
	Vitamin C	k.A.	k.A.
	Folsäure	4704,64µg	k.A.
	Niacin	k.A.	k.A.
	Thiamin	k.A.	k.A.
	Riboflavin	k.A.	k.A.
	Pyridoxin	k.A.	k.A.
Fruchtsaft 11			
	Vitamin C	k.A.	k.A.
	Folsäure	3768,69µg	k.A.
	Niacin	0,96mg	k.A.
	Thiamin	k.A.	k.A.
	Riboflavin	k.A.	k.A.
	Pyridoxin	k.A.	k.A.

Fruchtsaft 12		
Vitamin C	k.A.	k.A.
Folsäure	402,12µg	k.A.
Niacin	k.A.	k.A.
Thiamin	k.A.	k.A.
Riboflavin	k.A.	k.A.
Pyridoxin	k.A.	k.A.

Tabelle 29: Ergebnisse der Auswertung von Bio-Säften mittels UV/VIS-Detektor

5.4.6. Ergebnisse der Auswertungen von Tees mittels UV/VIS-Detektor

Bezeichnung	Vitamin	Gemessener Wert pro 100ml	Verpackungsangabe pro 100ml
Tee 1			
	Vitamin C	k.A.	k.A.
	Folsäure	1132,53µg	50µg
	Niacin	k.A.	k.A.
	Thiamin	k.A.	k.A.
	Riboflavin	k.A.	k.A.
	Pyridoxin	k.A.	k.A.
Tee 2			
	Vitamin C	k.A.	10mg
	Folsäure	366,66µg	25µg
	Niacin	k.A.	3,0mg
	Thiamin	0,42mg	0,14mg
	Riboflavin	k.A.	0,18mg
	Pyridoxin	1,36mg	0,18mg

Tee 3			
	Vitamin C	k.A.	k.A.
	Folsäure	276,76µg	k.A.
	Niacin	k.A.	k.A.
	Thiamin	0,22mg	k.A.
	Riboflavin	-4,19mg	k.A.
	Pyridoxin	k.A.	k.A.

Tabelle 30: Ergebnisse der Auswertung von Tees mittels UV/VIS-Detektor

5.4.7. Ergebnisse der Auswertung von Kindergetränken mittels MS

Bezeichnung	Vitamin	errechneter Wert pro 100ml	Verpackungsangabe pro 100ml
Fruchtsaft 1			
	Vitamin C	k.A.	9mg
	Folsäure	a.R.	30µg
	Niacin	a.R.	2,7mg
	Thiamin	0,96mg	0,21mg
	Riboflavin	k.A.	k.A.
	Pyridoxin	0,14mg	0,3mg

Fruchtsaft 2			
Vitamin C	k.A.	21mg	
Folsäure	a.R.	30µg	
Niacin	3,96mg	k.A.	
Thiamin	a.R.	k.A.	
Riboflavin	a.R.	k.A.	
Pyridoxin	a.R.	k.A.	
Fruchtsaft 3			
Vitamin C	a.R.	k.A.	
Folsäure	a.R.	30µg	
Niacin	3,32mg	k.A.	
Thiamin	k.A.	k.A.	
Riboflavin	a.R.	k.A.	
Pyridoxin	0,3mg	0,3mg	

Tabelle 31: Ergebnisse der Auswertung von Kindergetränken mittels MS

5.4.8. Ergebnisse der Auswertung von kohlenensäurehaltigen Getränken mittels MS

Bezeichnung	Vitamin	errechneter Wert pro 100ml	Verpackungsangabe pro 100ml
Fruchtsaft 4			
	Vitamin C	k.A.	k.A.
	Folsäure	a.R.	30µg
	Niacin	0,87mg	k.A.
	Thiamin	k.A.	k.A.
	Riboflavin	a.R.	k.A.
	Pyridoxin	0,39mg	k.A.
Fruchtsaft 5			
	Vitamin C	a.R.	9mg
	Folsäure	a.R.	30µg
	Niacin	7,66mg	0,023g
	Thiamin	0,34mg	0,21mg
	Riboflavin	a.R.	0,15mg
	Pyridoxin	0,36mg	0,3mg

Tabelle 32: Ergebnisse der Auswertung von kohlenensäurehaltigen Getränken mittels MS

5.4.9. Ergebnisse der Auswertung von Multivitaminsäften mittels MS

Bezeichnung	Vitamin	errechneter Wert pro 100ml	Verpackungsangabe pro 100ml
Fruchtsaft 6			
	Vitamin C	132,03mg	35mg
	Folsäure	a.R.	100µg
	Niacin	3,46mg	9mg
	Thiamin	a.R.	0,7mg
	Riboflavin	k.A.	0,8mg
	Pyridoxin	0,01mg	1mg
Fruchtsaft 7			
	Vitamin C	a.R.	9mg
	Folsäure	a.R.	30µg
	Niacin	8,97mg	2,7mg
	Thiamin	0,33mg	0,21mg
	Riboflavin	a.R.	k.A.
	Pyridoxin	0,47mg	0,3mg

Fruchtsaft 8			
Vitamin C	a.R.	6,24mg	
Folsäure	k.A.	20,8µg	
Niacin	k.A.	k.A.	
Thiamin	k.A.	k.A.	
Riboflavin	k.A.	k.A.	
Pyridoxin	0,01mg	0,208mg	
Fruchtsaft 9			
Vitamin C	k.A.	30mg	
Folsäure	a.R.	100µg	
Niacin	1,33mg	9mg	
Thiamin	1,67mg	0,7mg	
Riboflavin	1,06mg	0,8mg	
Pyridoxin	0,76mg	1mg	

Tabelle 33: Ergebnisse der Auswertung von Multivitaminsäften mittels MS

5.4.10. Ergebnisse der Auswertung von Brausetabletten mittels MS

Bezeichnung	Vitamin	errechneter Wert pro 100ml	Verpackungsangabe pro 100ml
Brausetablette 1			
	Vitamin C	k.A.	30mg
	Folsäure	a.R.	5mg
	Niacin	a.R.	k.A.
	Thiamin	a.R.	k.A.
	Riboflavin	a.R.	k.A.
	Pyridoxin	a.R.	k.A.
Brausetablette 2			
	Vitamin C	k.A.	60mg
	Folsäure	a.R.	100µg
	Niacin	1,60mg	15mg NE
	Thiamin	2,71mg	1,1mg
	Riboflavin	a.R.	1,5mg
	Pyridoxin	0,76mg	1,6mg

Brausetablette 3			
Vitamin C	k.A.	60mg	
Folsäure	a.R.	200µg	
Niacin	2,32mg	15mg NE	
Thiamin	5,07mg	1,4mg	
Riboflavin	6,41mg	1,6mg	
Pyridoxin	1,34mg	2mg	
Brausetablette 4			
Vitamin C	k.A.	80mg	
Folsäure	a.R.	200µg	
Niacin	2,59mg	16mg NE	
Thiamin	4,53mg	1,1mg	
Riboflavin	a.R.	1,4mg	
Pyridoxin	0,95mg	1,4mg	

Tabelle 34: Ergebnisse der Auswertung von Brausetabletten mittels MS

5.4.11. Ergebnisse der Auswertung von Bio-Säften mittels MS

Bezeichnung	Vitamin	errechneter Gehalt pro 100ml	Verpackungsangabe pro 100ml
Fruchtsaft 10			
	Vitamin C	k.A.	k.A.
	Folsäure	a.R.	200µg
	Niacin	a.R.	k.A.
	Thiamin	a.R.	k.A.
	Riboflavin	a.R.	k.A.
	Pyridoxin	a.R.	k.A.
Fruchtsaft 11			
	Vitamin C	k.A.	k.A.
	Folsäure	a.R.	k.A.
	Niacin	6,65mg	k.A.
	Thiamin	a.R.	k.A.
	Riboflavin	a.R.	k.A.
	Pyridoxin	k.A.	k.A.

Fruchtsaft 12		
Vitamin C	k.A.	k.A.
Folsäure	a.R.	k.A.
Niacin	a.R.	k.A.
Thiamin	a.R.	k.A.
Riboflavin	a.R.	k.A.
Pyridoxin	a.R.	k.A.

Tabelle 35: Ergebnisse der Auswertung von Bio-Säften mittels MS

5.4.12. Ergebnisse der Auswertung von Tees mittels MS

Bezeichnung	Vitamin	Gemessener Wert pro 100ml	Verpackungsangabe pro 100ml
Tee 1			
	Vitamin C	k.A.	k.A.
	Folsäure	a.R.	50µg
	Niacin	a.R.	k.A.
	Thiamin	k.A.	k.A.
	Riboflavin	a.R.	k.A.
	Pyridoxin	k.A.	k.A.
Tee 2			
	Vitamin C	k.A.	10mg
	Folsäure	a.R.	50µg
	Niacin	0,78mg	2mg
	Thiamin	0,59mg	0,14mg
	Riboflavin	a.R.	0,18mg
	Pyridoxin	0,08mg	0,18mg

Tee 3		
Vitamin C	k.A.	k.A.
Folsäure	a.R.	k.A.
Niacin	1,91mg	k.A.
Thiamin	a.R.	k.A.
Riboflavin	a.R.	k.A.
Pyridoxin	a.R.	k.A.

Tabelle 36: Ergebnisse der Auswertung von Tees mittels MS

6. Diskussion

In diesem Kapitel wird auf die Interpretation der Messwerte eingegangen. Dabei werden die negativen Vitaminangaben in den Berechnungen erklärt sowie die Messfehler der Massenspektrometrie.

Ebenso wird allgemein auf die Messfehler und deren Ursachen bei ausgewählten Vitaminen eingegangen, und dann schlussendlich auch noch auf die Vitaminverluste und mögliche dadurch zustande kommende Unterschiede zwischen der Packungsangabe und dem tatsächlichen Vitamingehalt im Produkt.

6.1. Werte außerhalb der Regressionsgeraden

Bei den Auswertungen der Vitamine sind einige Angaben mit „außerhalb der Regressionsgerade“ (a.R.) gekennzeichnet. Diese nicht näher angegebenen Werte entstanden durch eine unpassende Angleichung der gemessenen Werte an die Regressionsgerade.

Da diese Abweichungen nur in der massenspektrometrischen Auswertung vorkommen, wird im Kapitel 6.2 auf mögliche Ursachen genauer eingegangen.

6.2. Messfehler der Massenspektrometrie

In dieser Arbeit werden zwar auch die Ergebnisse der Massenspektrometrie veröffentlicht, jedoch sind die Ergebnisse leider nicht aussagekräftig und somit nicht vergleichbar mit den Packungsangaben der Getränkehersteller.

Die Fehlerquellen dafür können vielfältig sein, jedoch wird davon ausgegangen, dass diese an der Überempfindlichkeit des Messgerätes auszumachen sind.

Diese Aussage wird dadurch unterstützt, dass die Korrelationsgeraden (siehe Kapitel 5.3) ein sehr hohes R^2 in den für jedes Vitamin erstellten Regressionsgeraden aufweist. Dieses hohe R^2 zeigt eine hohe Korrelation der UV/VIS Standards zu den MS Standards und weist damit auf eine eindeutige Beziehung zwischen diesen

Werten hin. In diesen Standards waren nur die reinen Vitamine gelöst und damit frei von jeglichen anderen Nährstoffen, die die Messergebnisse hätten beeinflussen können.

Die Werte bei den Produkten wichen allerdings sehr stark von den Verpackungsangaben ab und ergaben keine repräsentativen Ergebnisse. Daher kann rückgeschlossen werden, dass diese zusätzlich in den Säften vorhandenen Nährstoffe, eventuell vorhandene Stabilisatoren und weitere künstlich zugesetzte Inhaltsstoffe, eine grobe Verunreinigung der Proben im Sinne der Vitaminauswertung darstellen und somit keine repräsentativen Ergebnisse liefern.

Unabhängig davon können auch Messfehler durch die Konzentrationen entstanden sein, da gerade beim Vitamin B₉ sehr niedrige und beim Vitamin C sehr hohe Konzentrationen in den zu untersuchenden Proben vorzufinden waren. Hier existieren vom Gerät abhängige Nachweisgrenzen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit damit überschritten wurden.

Die aktuelle Messstellung lässt allerdings nicht eindeutig erkennen, welcher Fehler hier am meisten Einfluss auf die Auswertung hatte. Schlussendlich musste auf die Messwerte der MS für weitere Aussagen verzichtet werden und alleine auf die UV/VIS Datenreihe zurückgegriffen werden.

6.3. Bei der Auswertung von ausgewählten Vitaminen aufgetretene Messfehler

In diesem Kapitel wird auf das ausgewertete Vitamin C und die Folsäure eingegangen, da speziell bei diesen beiden Vitaminen die Abweichungen am signifikantesten im Vergleich zur Packungsangabe waren.

6.3.1. Messfehler bei der Auswertung des Vitamin C-Gehalts

Bei der Auswertung des Vitamin C-Gehalts lieferte die Versuchsstellung unzureichende Ergebnisse, sowohl bei der MS als auch bei der HPLC. Da dieses Vitamin weder von dem einen noch von dem anderen Detektor angezeigt wurde, muss der genaue Grund dafür in der Probenvorbereitung liegen.

Eine Aufgabenstellung dieser Diplomarbeit war es die Proben gleich aufzubereiten und mit so wenig wie möglich Fremdstoffen zu versehen, um etwaige dadurch auftretende Interaktionen mit diesen zu vermeiden. Die dadurch auftretenden Wechselwirkungen wären eine potentielle Fehlerquelle für die Auswertungen der Messergebnisse.

Daher ist die Aufbereitung der Proben in „LC Simultaneous Determination of the Free Forms of B Group Vitamins and Vitamin C in Various Fortified Food Products“, im Gegensatz zu der Aufbereitung in dieser Arbeit, auf den pH Wert 7 gebracht worden. Zusätzlich wurde auch noch Metaphosphorsäure dem Vitamin C zugesetzt um die Oxidation zu verhindern.

Diese Maßnahmen hätten womöglich zu Stabilisierung des Vitamins beigetragen und hätten somit zu repräsentativeren Werten geführt.

[Engel Rita, 2010]

6.3.2. Messfehler bei der Auswertung des Folsäure -Gehalts

Bei einigen berechneten Folsäurewerten, liegt die Menge weit über der Packungsangabe. Dabei wird nicht nur der angegebene Wert, sondern auch die empfohlene Tagesdosis teils um das doppelte überschritten.

Da dies eine massive Überschreitung der Ernährungsrichtlinien darstellt, wird davon ausgegangen, dass die tatsächliche Menge an Folsäure nicht dem Ergebnis der Messwerte entspricht.

In diesem Fall ist es daher sehr wahrscheinlich, dass Derivate der Folsäure, aber möglicher Weise auch Riboflavin und seine Derivate, in den Messvorgang Einfluss hatten und das Messergebnis damit verfälschten.

6.4. Vitaminverluste durch Umwelteinflüsse

Da Vitamine sehr von Umwelteinflüssen betroffen sind, ist dies auch als zusätzliche Fehlerquelle bei den Messungen zu betrachten. In Tabelle 37 werden daher alle für

die Arbeit relevanten Vitamine mit der Ursache und dem dazugehörigen Verlustprozentsatz dargestellt.

Vitamin	Verlust	Ursache
Thiamin	30%	Hitze, Oxidation, Einsatz von schwefligen Säuren, Lagerung
Riboflavin	20%	Licht, Lagerung
Niacin	10%	Hitze, Lagerung, Bioverfügbarkeit
Pyridoxin	20-50%	Hitze, direkte Sonnenbestrahlung, Lagerung
Folsäure	35%	Licht, Hitze, Lagerung
Vitamin C	30-100%	Lagerung, Oxidation, Enzyme, Hitze, Licht, Lagerung

Tabelle 37: Vitaminverluste [Kasper, 2004], [Deutsche Gessellschaft für Ernährung, 2001]

Diese Vorgänge werden natürlich von den Herstellern in der Vitaminanreicherung berücksichtigt, um die rechtlichen Vorgaben des Lebensmittelgesetzes zu erfüllen. Jedoch ist es ein weiter Weg vom Produzenten zum Konsumenten und auf diesem Weg muss deshalb mit Umwelt- und anderen äußeren Einflüssen (Lagerung, Kühlung, Transport und Aufbewahrung) gerechnet werden.

7. Schlussbetrachtung

7.1. Conclusio

Die Arbeit hat gezeigt, dass die HPLC mittels UV/VIS-Detektors für die quantitative Bestimmung der wasserlöslichen Vitamine repräsentative Ergebnisse hervorbrachte. Die Ausnahmen hierbei stellen das Vitamin C und die Folsäure dar.

Über das Massenspektrum waren die Auswertungsergebnisse jedoch leider nicht aussagekräftig, obwohl die Probenvorbereitung mittels SPE erfolgreich war. Der wahrscheinlichste Grund dafür sind auftretende Interaktionen der in den Frucht- und Gemüsesäften enthaltenen Nähr- und Inhaltsstoffe, die die Auswertungsergebnisse negativ beeinflussen haben.

Die sehr detaillierten Vitaminangaben der in dieser Arbeit untersuchten Säfte, ermöglichten den genauen Vergleich mit den Messergebnissen. Abgesehen vom Vitamin C- und Folsäuregehalt, entsprachen die Vitamingehalte, mit natürlich vorkommenden Abweichungen, den Packungsangaben der einzelnen Frucht- und Gemüsesäfte.

7.2. Ausblick

Wie aus der Arbeit hervorgegangen ist, sind repräsentative Ergebnisse über diese Versuchsstellung sehr gut möglich. Jedoch stellt die Probenvorbereitung den wichtigsten Einflussfaktor für die Exaktheit der Vitaminbestimmung dar. Möchte man diese verbessern, ist daher folgend anzusetzen:

Durch zusätzliche Vorbereitungsschritte wie zum Beispiel Filterung der Saftinhaltsstoffe, könnte eine Interaktion dieser vermieden werden. Ein weiterer Schritt könnte das Zusetzen eines weiteren Stabilisators zum Vitamin C sein. Dadurch könnte das Vitamin C vor der Oxidation besser geschützt werden und damit zu aussagekräftigen Ergebnissen führen.

Zusätzlich zeigten sich in anderen Studien bessere Ergebnisse bei einer Probenaufbereitung auf den pH-Wert 7. Dies könnte man zukünftig auch als Verbesserungsschritt versuchen, wenngleich die Probenvorbereitung dann nicht mehr für jedes Vitamin gleich ablaufen könnte.

Kurzfassung

Die Anreicherung an Vitaminen und zusätzlichen Nährstoffen von Obst- und Gemüsesäften ist in den letzten Jahren gestiegen. Produkthersteller werben gezielt mit hohem, reichhaltigem Vitamingehalt ihrer Produkte. Auch Packungsangaben werden immer detaillierter.

Ob dieser Vitamingehalt überhaupt beim Endkunden ankommt, ist für diesen nicht überprüfbar. Deswegen ist eine diesbezügliche Überprüfung das Ziel dieser Arbeit. Die gewählte Methode ist die HPLC/MS, welche die SPE als Probenvorbereitung nutzt.

In der Literaturübersicht wird auf den derzeitigen wissenschaftlichen Stand bezüglich der wasserlöslichen Vitamine sowie die rechtliche Situation betreffend den Obst- und Gemüsesäften im Sinne der Definition, Deklaration und der industriellen Herstellung in Österreich eingegangen.

In darauffolgenden Ausführungen sollen die Probenvorbereitung und Probenbehandlung sowie die Messergebnisse dargelegt werden.

Es stellte sich heraus, dass die HPLC ein geeignetes Mittel für die Untersuchung war. Der kritische Punkt für die Vitaminauswertung lag an der Vorbereitung der einzelnen Proben. Der Vorbereitung sollte zukünftig mehr Beachtung geschenkt werden. Damit könnte erreicht werden, dass die massenspektrometrische Auswertung ebenso repräsentative Werte wie der UV/VIS-Detektor liefert.

Das Vitamin C in den Proben oxidierte jedoch zu schnell und konnte deswegen nicht mit den gewählten Messmethoden analysiert werden. Die zu hohen Werte der Folsäure spiegelten eine Interaktion mit dessen Derivaten wider. Abgesehen von diesen Vitaminen konnte allerdings gezeigt werden, dass die Vitamingehalte den Packungsangaben der Getränkehersteller entsprechen.

Abstract

The commercial of vitamins in fruit- and vegetable beverages is rising. Also the quantity of healthy ingredients is more than before. The information of the ingredients is very detailed but not able to proof for customers.

Because of that fact one aim is to proof the content of water soluble vitamins in fruit- and vegetable beverages. The other main point is the usage of LC/MS for the determination of this kind of vitamins. SPE is used within this procedure.

The first chapter sums up the scientifically issues of water soluble vitamins, the legal situation for the glossary and the production of fruit- and vegetable beverages in Austria.

The following chapters contain the preparation of the samples and the results based on the usage of LC including the UV/VIS detector and MS.

It shows the LC as a possible method to analyze the vitamins. The UV/VIS showed more representative results than the MS, so there should be a more exact focus on the treatment of the samples before taking the measurement of it.

Even there are no exact matches between the measurement and the information of the product, the work shows the correctness of the vitamin contents in each product. These differences are based on environmental influences and other errors in measurement.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel Thiamin	10
Abbildung 2: Strukturformel Riboflavin	11
Abbildung 3: Strukturformel Niacin	12
Abbildung 4: Strukturformel Pyridoxin	13
Abbildung 5: Strukturformel Folsäure	14
Abbildung 6: Strukturformel Ascorbinsäure	15
Abbildung 7 Schema der Festphasenextraktion [Crawford Scientific, 2010]	31
Abbildung 8: Aufbau einer HPLC [LC Ressources Inc., 2001].....	36
Abbildung 9: Aufbau eines UV-VIS Detektors [Zuern, 2011]	40
Abbildung 10: Flugzeitmassenspektrometer [Daltonics, 2011]	42
Abbildung 11: Der Prozess der Elektrospray-Ionisation schematisch [Die Massenspektrometrie, 2010]	43
Abbildung 12: Hippursäure [Sigma-Aldrich, 2010].....	45
Abbildung 13: Auswertung des Vorversuchs mittels UV/VIS-Detektor	49
Abbildung 14: Kalibriergerade Vitamin C mittels UV/VIS.....	52
Abbildung 15: Kalibriergerade Vitamin B ₁ mittels UV/VIS.....	53
Abbildung 16: Kalibriergerade Vitamin B ₂ mittels UV/VIS.....	53
Abbildung 17: Kalibriergerade Vitamin B ₃ mittels UV/VIS.....	54
Abbildung 18: Kalibriergerade Vitamin B ₆ mittels UV/VIS.....	54

Abbildung 19: Kalibriergerade Vitamin B ₉ mittels UV/VIS	55
Abbildung 20: Kalibriergerade Vitamin C mittels MS	56
Abbildung 21: Kalibriergerade Vitamin B ₁ mittels MS	56
Abbildung 22: Kalibriergerade B ₂ mittels MS	57
Abbildung 23: Kalibriergerade Vitamin B ₃ mittels MS	57
Abbildung 24: Kalibriergerade Vitamin B ₆ mittels MS	58
Abbildung 25: Kalibriergerade B ₉ mittels MS	58
Abbildung 26: Korrelation zwischen UV/VIS und MS des Vitamins C	59
Abbildung 27: Korrelation zwischen UV/VIS und MS des Vitamins B ₁	60
Abbildung 28: Korrelation zwischen UV/VIS und MS des Vitamins B ₂	60
Abbildung 29: Korrelation zwischen UV/VIS und MS des Vitamins B ₃	61
Abbildung 30: Korrelation zwischen UV/VIS und MS des Vitamins B ₆	61
Abbildung 31: Korrelation zwischen UV/VIS und MS des Vitamins B ₉	62
Abbildung 32: Auflösung Brausetablette 4 mittels UV/VIS-Detektor	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften Thiamin	10
Tabelle 2: Eigenschaften Riboflavin	11
Tabelle 3: Eigenschaften Niacin	12
Tabelle 4: Eigenschaften Pyridoxin	13
Tabelle 5: Eigenschaften Folsäure	14
Tabelle 6: Eigenschaften von Ascorbinsäure	15
Tabelle 7: Verwendete Materialien	23
Tabelle 8: Verwendete Geräte.....	23
Tabelle 9: Verwendete Chemikalien	24
Tabelle 10: Folsäurepuffer.....	25
Tabelle 11: Vitaminmix	25
Tabelle 12: Stabilisator Lösung	26
Tabelle 13: Niacin Lösung	26
Tabelle 14: Hippursäure Lösung	26
Tabelle 15: Interne Standardlösung	27
Tabelle 16: Einzelstandardlösung für B-Vitamine.....	27
Tabelle 17: Einzelstandardlösung für Vitamin C.....	27
Tabelle 18: Pufferlösung	28
Tabelle 19: Probenlösung	28

Tabelle 20: SPE-Schema.....	34
Tabelle 21: Ergebnisse interne Standardlösung	48
Tabelle 22: Verdünnungsschritte für Vitamin B ₁ , B ₂ , B ₃ und B ₆	50
Tabelle 23: Verdünnungsschritte für Vitamin C.....	51
Tabelle 24: Verdünnungsschritte für Vitamin B ₉	51
Tabelle 25: Ergebnisse der Auswertung von Kindergetränken mittels UV/VIS-Detektor	64
Tabelle 26: Ergebnisse der Auswertung von kohlesäurehaltigen Getränken mittels UV/VIS-Detektor.....	65
Tabelle 27: Ergebnisse der Auswertung von Multivitaminsäften mittels UV/VIS-Detektor	67
Tabelle 28: Ergebnisse der Auswertung von Brausetabletten mittels UV/VIS-Detektor	69
Tabelle 29: Ergebnisse der Auswertung von Bio-Säften mittels UV/VIS-Detektor	72
Tabelle 30: Ergebnisse der Auswertung von Tees mittels UV/VIS-Detektor.....	74
Tabelle 31: Ergebnisse der Auswertung von Kindergetränken mittels MS	75
Tabelle 32: Ergebnisse der Auswertung von kohlensäurehaltigen Getränken mittels MS.....	76
Tabelle 33: Ergebnisse der Auswertung von Multivitaminsäften mittels MS	78
Tabelle 34: Ergebnisse der Auswertung von Brausetabletten mittels MS.....	80
Tabelle 35: Ergebnisse der Auswertung von Bio-Säften mittels MS	82
Tabelle 36: Ergebnisse der Auswertung von Tees mittels MS.....	84
Tabelle 37: Vitaminverluste [Kasper, 2004], [Deutsche Gesselschaft für Ernährung, 2001]	88

Abkürzungsverzeichnis

a.R.	Außerhalb der Regressionsgerade
ACN	Acetonitril
ESI	Elektrosprayionisationsquelle
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononucleotid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
k.A.	Keine Angabe
MS	Massenspektrometrie
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NP	Normalphase
PCA	Principal Component Analysis
RP	Reversed Phase
SPE	Solid Phase Extraction
UV/VIS	Ultraviolett/sichtbares Licht

Literaturverzeichnis

Academic.ru. 2011. Quadruopol-Massenspektrometer. *Academic dictionaries and encyclopedias*. [Online] 5. Februar 2011. [Zitat vom: 5. Februar 2011.] <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1145666>.

AG Direktvermarktung. 2009. *Fruchtsaft/-nektar*. Stuttgart : s.n., 2009. 34.

Ardrey, Bob. 2003. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*. England : Wiley, 2003.

Bahr U, Karas M. 2002. Massenspektrometrie Tutorial. *Pharmazie Goethe Univeristät*. [Online] 22. Mai 2002. [Zitat vom: 13. März 2011.] www.pharmazie.uni-frankfurt.de/PharmChem/Lehrveranstaltungen/4_Semester/Dokumente/MS_Tutorial.doc.

Berghofer, Dipl.-Ing. Dr. Emmerich. 2000. *Produktion und Verarbeitung von Lebensmitteln*. [PDF] Wien : Arbeiterkammer Wien, 2000.

Beyer, Dr. Ute. 2008. Unpolare SPE/Probenvorbehandlung: pH-Wert Einstellung. *analytik-news.de*. [Online] 7. Oktober 2008. [Zitat vom: 11. Jänner 2011.] http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC_Probenvorbereitung_1.pdf.

—. **2009.** Unpolare SPE: Konditionierung. *analytik-news.de*. [Online] 13. Jänner 2009. [Zitat vom: 11. Jänner 2011.] http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC_Probenvorbereitung_4.pdf.

—. **2009.** Unpolare SPE: Probenaufgabe und Waschen. *analytik-news.de*. [Online] 10. Februar 2009. [Zitat vom: 11. Jänner 2011.] http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC_Probenvorbereitung_5.pdf.

—. **2010.** Polare SPE zur Fraktionierung. *analytik-news.de*. [Online] 19. März 2010. [Zitat vom: 11. Jänner 2011.] http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC_Probenvorbereitung_13.pdf.

—. 2009. Unpolare SPE: Elution. *analytik-news.de*. [Online] 31. März 2009. [Zitat vom: 11. Jänner 2011.] http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC_Probenvorbereitung_7.pdf.

Bundesministerium für Gesundheit. 2004. *Fruchtsaftverordnung*. Wien : s.n., 2004. 83.

—. 2005. *Österreichisches Lebensmittelbuch*. Wien : s.n., 2005. 4.

Crawford Scientific. 2010. Chromatography_every step of the way. [Online] 2010. [Zitat vom: 5. Februar 2011.] http://www.crawfordscientific.com/Silicycle_SPE.htm.

Daltonics, Bruker. 2011. Bruker Daltonics. *Bruker Daltonics*. [Online] Bruker, 2011. [Zitat vom: 11. März 2011.] <http://www.bdal.com/products/lc-ms/o-tof/microtof-q-ii/details.html>.

Deutsche Gesellschaft für Ernährung. 2004. *Die Nährstoffe Bausteine für Ihre Gesundheit*. Deutschland : Deutsche Gesellschaft für Ernährung, 2004.

Deutsche Gessellschaft für Ernährung. 2001. *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*. Frankfurt am Main : Umschau Braus GmbH, 2001.

Die Massenspektrometrie. **Trommer, Dr. Hagen. 2010.** Hamburg : Storckverlag, 2010.

Engel Rita, et al. 2010. LC Simultaneous Determination of the Free Forms of B Group Vitamins and Vitamin C in Various Fortified Food Products. *Chromatographia*. 2010, Bd. 11/12, 71.

Gay, M.H. 2008. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. Verlin : Springer Verlag, 2008.

Kasper, Prof.Dr.med. Heinrich. 2004. *Ernährungsmedizin und Diätetik*. München : Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 2004.

LC Ressources Inc. 2001. Getting Started in HPLC. [Online] 30. März 2001. [Zitat vom: 5. Februar 2011.] <http://www.lcresources.com/resources/getstart/1c01.htm>.

Löffler, Professor Dr. Georg. 2003. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.* Deutschland : Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 2003.

Österreichische Gesellschaft für Ernährung. 2011. OEGE. *Österreichische Gesellschaft für Ernährung.* [Online] 21. März 2011. [Zitat vom: 21. März 2011.] <http://www.oege.at/>.

Poole, Colin F. 2003. New trends in solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry.* 2003, Bd. 6, 22.

S. Pérez Prieto, et al. 2006. Screening for folic acid content in vitamin-fortified beverages. *Food Control.* 2006, 17.

Sigma-Aldrich. 2010. Sigma-Aldrich. *Hippuric Acid.* [Online] Sigma-Aldrich, 26. Juni 2010. [Zitat vom: 1. April 2011.] http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=53280|FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC.

Universität Stuttgart, Institut für Raumfahrtsysteme. 2011. *Kapitel 5 Massenspektrometrie.* [PDF] Stuttgart : s.n., 2011.

Waters, V., Graham G.A. 2002. Solid-phase extraction in clinical biochemistry. *Annals of Clinical Biochemistry.* 2002, 39.

WKO. 2007. *Herstellung von Fruchtsäften .* [PDF] Wien : WKO, 2007.

Zuern, Dr. Astrid. 2011. Die stationäre Phase - HPLC-Säulen. *Chemgaroo ChemgaPedia.* [Online] Fachinformationszentrum Chemie GmbH, 13. März 2011. [Zitat vom: 13. März 2011.] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc_detail1.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc/stat_phase/statphase_hplc1.vscml.html.

—. 2011. Fluoreszenz-Detektor in der HPLC. *Chemgaroo ChemgaPedia.* [Online] Fachinforamtionszentrum Chemie GmbH, 13. März 2011. [Zitat vom: 13. März 2011.] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc_detail1.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc/detektoren/fluoresz/fluor1m75ht0201.vscml.html.

—. **2011.** Injektion in der HPLC. *Chemgaroo ChemgaPedia*. [Online] Fachinformationszentrum Chemie GmbH, 13. März 2011. [Zitat vom: 13. März 2011.] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc_detail1.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc/injektion/injekti_hplcm63ht0600.vscml.html.

—. **2011.** Pumpen in HPLC. *Chemgaroo ChemgaPedia*. [Online] Fachinformationszentrum Chemie GmbH, 13. März 2011. [Zitat vom: 13. März 2011.] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc_detail1.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc/pumpen/pumpm63ht0900.vscml.html.

—. **2011.** UV/VIS - Detektoren in der HPLC. *Chemgaroo ChemgaPedia*. [Online] Fachinformationszentrum Chemie GmbH, 13. März 2011. [Zitat vom: 13. März 2011.] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc_detail1.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc/detektoren/uv_vis/uv1m75ht0201.vscml.html.

Anhang

Lebenslauf

Curriculum Vitae

► Sophie-Marie Wagner

Adresse Linke Wienzeile 90-92/5
1060 Wien
Telefon +43 (676) 6298626
E-Mail sophie-marie.wagner@neysor.net
Geburtsdaten 27.02.1985, Wien
Staatsbürgerschaft Österreich
Führerschein Klasse B
Ausbildung Studium der
Ernährungswissenschaften



Ausbildung

Schulbildung (1991 – 2003)

- **1991-1995:** Volksschule, Wien 7
- **1995-2003:** Neusprachliches Gymnasium, Wien 8
- **Abschluss:** Matura

Studium (2003-lfd.)

- **2003-lfd:** Ernährungswissenschaften an der Universität Wien

Berufliche Erfahrung

Praktika

- **Februar 2007/08:** Aktionsgesellschaft für klinische Ernährung (AKE) - Krankenhaus Hietzing, Abteilung Onkologie - Befragung zur Ernährungssituation von Patienten im Rahmen des Nutritiondays
- **August 2007:** Ströck Brot GmbH - Produktion - Herstellung von Ströck Produkten
- **September 2007:** Ströck Brot GmbH - Zentrale, Abteilung Hygiene und Qualitätsmanagement - Erstellung HACCP-Konzeptes für Ströck Brot GmbH
- **Februar 2008:** Universität Wien - Institut für Ernährungswissenschaften - Mithilfe bei der Erstellung des Ernährungsberichtes für Österreich 2004
- **Sommer 2008/09:** Vroni's Sommercamp für übergewichtige Kinder - Kinder- und Sportbetreuung
- **Seit Dezember 2009:** Universität Wien, Institut für Nutrigenomics – Vorbereitungen für Analysen zum Thema „Folatbindendes Protein“
- **Seit Juni 2010:** Universität Wien, Institut für Nutrigenomics Univ. Prof. Dr. Jürgen König – Diplomarbeit: „Chemisches Profil verschiedener Obst- und Gemüsesäfte mittels Hauptkomponentenanalyse massenspektrometrischer Daten“

Jobs

- ▶ **Winter 2004-06:** Kreitner&Partner Werbegesellschaft m.b.H. - Rathausplatz Wien im Rahmen des Wiener Adventszauber - Kinderbetreuung
- ▶ **September 2004-Dezember 2007:** Ströck Brot GmbH - Filiale Westbahnhof - Filialbetreuung für Samstagnachmittag
- ▶ **Winter 2008/09:** Punschwelt - Christkindlmarkt Belvedere - Ausschenkraft
- ▶ **Seit Mai 2010:** Aerobic Trainerin in Club Danube und Columbus Fitness & Health

Besondere Kenntnisse

Sprachen

- ▶ Englisch und Französisch in Wort und Schrift
- ▶ Sprachkurse
 - ▶ Sommer 1996: Oxford
 - ▶ Sommer 1998: New York
 - ▶ Sommer 1999: Los Angeles

EDV

- ▶ Microsoft Office, SPSS

Hobbies

- ▶ Aerobic, Skifahren, Lateinamerikanische und Standard Tänze, Tennis, Badminton, Gitarre, Lesen

Social Skills

- ▶ Langjährige Erfahrung im Unterrichten von Kindern, sowohl einzeln als auch in Gruppen.
- ▶ Arbeiten mit sowohl verhaltensauffälligen als auch essgestörten Kinder.
- ▶ Teamfähigkeit
- ▶ Führungskraft