

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Vergleich unterschiedlicher Extraktionsmethoden bei der
Bestimmung von Vitamin E und Carotinoiden in Lebensmitteln“

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin:	Marlies Wallner
Matrikel-Nummer:	0303762
Studienrichtung:	Ernährungswissenschaften
Betreuer:	A.o. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner

Wien, im April 2009

Danksagung

Einen großen Dank an A.o. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die Unterstützung während der gesamten Zeit am Department.

Vielen lieben Dank an Mag. Sonja Kanzler für die freundliche und hilfreiche Unterstützung bei dieser Diplomarbeit und für die Einführung in die Thematik.

Meinen Eltern, vor allem meiner Mutter Edith, danke ich für die Ermöglichung des Studiums und die stets hilfreiche, seelische und finanzielle Unterstützung. Danke!

Meinem Freund Marc danke ich dafür, dass er stets für mich da war und für die nötige Abwechslung während der Studienzeit gesorgt hat.

Meiner lieben Schwester Romana möchte ich für den großartigen seelischen Beistand während der Durchführung und Erstellung der Diplomarbeit danken, wobei ihre Unterstützung aber vielmehr über die gesamte Studienzeit verteilt war.

Meiner gesamten restlichen Familie, die allesamt ganz besondere Menschen für mich sind, möchte ich danken, dass sie immer für mich da waren und mich unterstützt haben.

Meiner lieben Studienkollegin und guten Freundin Isolde Wastian danke ich für die schöne Studienzeit und die gemeinsam verbrachten Tage während der Diplomarbeitszeit.

Vielen Dank an alle meine Freunde für die lustigen und abwechslungsreichen Tage, die wir gemeinsam verbracht haben.

Außerdem möchte ich dem technischen Team am Department für die hilfreiche Unterstützung und für die tolle Einführung zur Erstellung dieser Diplomarbeit danken.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
2. Literaturteil.....	2
2.1. Extraktion.....	2
2.1.1. Einordnung der Extraktion.....	2
2.1.2. Grundlagen der Extraktion.....	2
2.1.3. Fest-Flüssig-Extraktion.....	3
2.2. Extraktionsmittel für fettlösliche Vitamine.....	4
2.2.1. Ansprüche an das Extraktionsmittel.....	4
2.2.2. Verteilung eines Stoffes in den Lösungsmittelphasen bei der Fest-Flüssig-Extraktion.....	4
2.2.3. Eigenschaften und toxikologische Bewertung unterschiedlicher Extraktionsmittel	5
2.3. Fettlösliche Vitamine.....	12
2.3.1. Carotinoide	13
2.3.2. Vitamin E.....	14
2.4. Methoden zur Extraktion von Carotinoiden und Vitamin E aus Lebensmitteln - Stand der Wissenschaft	16
2.5. Ziel der vorliegenden Arbeit	19
3. Material und Methoden.....	20
3.1. Probenmaterial.....	20
3.1.1. Lebensmittel	20
3.1.2. Probenaufarbeitung und Probenvorbereitung	21
3.2. Durchführung der Versuche	23
3.2.1. Lösungsmittelversuch 1.....	25
3.2.2. Lösungsmittelversuch 2.....	27

3.2.3. Lösungsmittelversuch 3	27
3.2.4. Gefriertrocknungsversuch mit Maiskeimöl.....	28
3.2.5. Gefriertrocknungsversuch mit Penne Arrabiata	29
3.2.6. Schüttelversuch 1	30
3.2.7. Schüttelversuch 2 und Lösungsmittelversuch.....	31
3.2.8. Versuch mit unterschiedlichen Konzentrationen an Natriumsulfat.....	31
3.2.9. Filterversuch 1.....	33
3.2.10. Filterversuch 2 (mit Natriumsulfat)	33
3.3. Analyse mit HPLC.....	35
3.3.1. High Pressure Liquid Chromatograph 1	35
3.3.2. High Pressure Liquid Chromatograph 2	36
3.3.3. Kalibrationsgerade	36
3.4. Extraktaufbereitung	37
3.5. Reproduzierbarkeit.....	37
3.6. Statistische Auswertung	37
4. Ergebnisse und Diskussion	38
4.1. Lösungsmittelversuch 1	39
4.2. Lösungsmittelversuch 2 (mit internem Standard).....	42
4.3. Lösungsmittelversuch 3	46
4.4. Gefriertrocknungsversuch mit Maiskeimöl	47
4.5. Gefriertrocknungsversuch mit Penne Arrabiata	50
4.6. Schüttelversuch 1	54
4.7. Schüttelversuch 2 an unterschiedlichen Lösungsmitteln.....	57
4.7.1. Vergleich innerhalb der Lösungsmittel.....	57
4.7.2. Vergleich der Extraktionsmittel.....	59
4.8. Versuch mit unterschiedlichen Natriumsulfatkonzentrationen	61
4.8.1. Mit Nachspülen	61
4.8.2. Ohne Nachspülen.....	62

4.9.	Filterversuch 1	64
4.10.	Filterversuch 2 mit Natriumsulfat	66
4.11.	Diskussion	68
5.	Schlussbetrachtung	71
6.	Zusammenfassung	73
7.	Summary.....	74
8.	Literaturverzeichnis	75

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verfahrensweise bei der Fest-Flüssig-Extraktion (Sattler, 1988)	3
Abb. 2: Modifizierte Extraktionsmethode nach Folch et al. (1957)	23
Abb. 3: Fortsetzung modifizierte Extraktionsmethode nach Folch et al. (1957).....	24
Abb. 4: Die Phasentrennung im Scheidetrichter vor (trüb) und nach dem Unterspritzen von Methanol (klar).....	25
Abb. 5: Gefriertrocknungsversuch mit Penne Arrabiata	29
Abb. 6: Ausbeuten dargestellt in % des bisher verwendeten Lösungsmittelgemisches Chloroform/Methanol 2:1 v/v	39
Abb. 7: Ausbeuten dargestellt in % des bisher verwendeten Lösungsmittelgemisches Chloroform/Methanol 2:1 v/v	40
Abb. 8: Ausbeuten dargestellt in % des bisher verwendeten Lösungsmittelgemisches Chloroform/Methanol 2:1 v/v	42
Abb. 9: Ausbeuten dargestellt in % des bisher verwendeten Lösungsmittelgemisches Chloroform/Methanol 2:1 v/v	43
Abb. 10: Extraktionsverluste Vitamin E und Carotinoide aus Penne Arrabiata	44
Abb. 11: Extraktionsverluste Vitamin E und Carotinoide aus Jägerschnitzel.....	45
Abb. 12: Vergleich der Ausbeuten, die mit den Extraktionsmitteln Dichlormethan (100% Linie) und Ethylacetat/Petroleumether erzielt wurden.....	46
Abb. 13: Unterschiedliche Vitaminausbeute bei Tiefgefrieren und Gefriertrocknen.....	47
Abb. 14: Extraktionsverluste beim Tieffrieren und beim Gefrier-trocknen von Öl	48
Abb. 15: Gefriertrocknungsversuch mit Penne Arrabiata	50
Abb. 16: Vergleich Extraktwerte Vitamin E und Carotinoide nach Tiefgefrieren und Gefriertrocknen am wasserreichen Lebensmittel Penne Arrabiata	51
Abb. 17: Verluste durch Gefriertrocknen am wasserreichen Lebensmittel Penne Arrabiata	52
Abb. 18: Einfluss einer unterschiedlich langen Schüttel- und Extraktionsdauer auf die Carotinoid- und Vitamin E-Ausbeute im Vergleich zur derzeit am Department verwendeten Methode (Probe 1)	55
Abb. 19: Ausbeuten und Verluste in % bei unterschiedlicher Schüttel- und Extraktionsdauer	56
Abb. 20: Vitaminausbeuten bei unterschiedliche Schütteldauer mit Dichlormethan	57
Abb. 21: Vitaminausbeuten bei unterschiedliche Schütteldauer mit Chloroform.....	58

Abb. 22: Vitaminausbeuten durch Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel bei einer Schütteldauer von 18 Stunden. Dichlormethan wird als Linie in den Diagrammen als Vergleichswert zu den Chloroformwerten dargestellt. (Dichlormethanwerte = 100%; Linie)	59
Abb. 23: Vitaminausbeuten durch Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel bei einer Schütteldauer von 30 Minuten. Dichlormethan wird als Linie in den Diagrammen als Vergleichswert zu den Chloroformwerten dargestellt. (Dichlormethanwerte = 100%; Linie)	60
Abb. 24: Vitamin E- und Carotinoidkonzentrationen bei unterschiedlichen Natriumsulfatkonzentrationen mit Nachspülen	61
Abb. 25: Vitamin E- und Carotinoidkonzentrationen bei unterschiedlichen Natriumsulfatkonzentrationen ohne Nachspülen.....	62
Abb. 26: Vergleich der Ausbeuten mit und ohne Nachspülen unterschiedlicher Natriumsulfatkonzentrationen. Die Werte „mit Nachspülen“ werden als 100% mit der Linie gekennzeichnet.	63
Abb. 27: Ausbeuten aus Extrakt und Filter. Die Linie entspricht dem Wert an internem Standard, der den Proben zugegeben wurde.	64
Abb. 28: Vergleich der Vitamingehalte im Filter mit und ohne Nachspülen von Natriumsulfat im Filterversuch 2. Mit 100% (Linie) wurden die Extraktgehalte angegeben.	66
Abb. 29: Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Versuchsergebnisse	71

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Beschreibung der verwendeten Lebensmittel	20
Tab. 2: Verwendete Geräte	21
Tab. 3: Verwendete Reagenzien	21
Tab. 4: Bedingungen, Verfahren und Ablauf von Schüttelversuch 1.....	30
Tab. 5: Bedingungen, Verfahren und Ablauf von Schüttelversuch 2.....	31
Tab. 6: Versuch mit unterschiedlichen Konzentrationen an Natriumsulfat	32
Tab. 7: HPLC 1-Beschreibung	35
Tab. 8: HPLC 2-Beschreibung	36
Tab. 9: Mittelwerte und Standardabweichungen der Ausbeute der internen Standards in $\mu\text{g}/100\text{g}$ (siehe Abb. 10)	44
Tab. 10: Mittelwerte und Standardabweichungen der Ausbeute der internen Standards in $\mu\text{g}/100\text{g}$ (siehe Abb. 11)	45
Tab. 11: Mittelwerte und Standardabweichungen der Ausbeuten an internen Standards in $\mu\text{g}/100\text{g}$ (siehe Abb. 14)	48
Tab. 12: Berechnung des ursprünglichen Wassergehaltes der gefriergetrockneten Proben	51
Tab. 13: Mittelwerte in $\mu\text{g}/100\text{g}$ der Gefriertrocknung und Tiefkühlung	52
Tab. 14: Schüttelversuch 1.....	54
Tab. 15: Mittelwerte der Analysenwerte des internen Standards in $\mu\text{g}/100\text{g}$ bei unterschiedliche Schüttel- und Extraktionszeiten	56

Abkürzungsverzeichnis

AGW: Arbeitsplatzgrenzwert

BAT: Biologischer Arbeitsstoff Toleranzwert

BHT: Butylhydroxitoluol

CO₂: Kohlendioxid

DCM: Dichlormethan

GT: Gefriertrocknen

HPLC: High Pressure liquid Chromatography

IS: interner Standard

LC: Letale Konzentration

LD: Letale Dosis

MAK: Maximale Arbeitsplatzkonzentration

TF: Tieffrieren

1. EINLEITUNG

Die Extraktion ist eine häufig eingesetzte Methode um einzelne Bestandteile (z.B. Makro- und Mikronährstoffe) aus unterschiedlichen Probematerialien (z.B. Lebensmittel) zu erhalten. Die erhaltenen Extrakte können danach direkt analysiert werden.

Die Methode zum Herauslösen von fettlöslichen Vitaminen, die aktuell am Department für Ernährungswissenschaften angewandt wird, ist eine modifizierte Fest-Flüssig-Extraktionsmethode nach Folch et al. (1957). Um fettlösliche Substanzen aus Lebensmitteln lösen zu können, ist ein organisches Extraktionsmittel notwendig. Das verwendete Lösungsmittel Chloroform ist allerdings im Gespräch, gesundheitlich bedenklich zu sein. Daher wird versucht, von diesem Extraktionsmittel Abstand zu nehmen und eine Alternative zu finden. Das Lösungsmittel sollte die Analyten in quantitativ gleichwertiger Form wie Chloroform herauslösen können und auch gut zu handhaben sein.

Bei der Extraktion muss allerdings auch mit Verlusten des Analyten gerechnet werden. Schon bei der Probenvorbereitung kann es, beispielsweise wie bei Gefriertrocknung der Probe, zu Verlusten kommen. Durch Einsatz von Filtern ist genauso mit Verlusten zu rechnen, wie auch durch die Verwendung von Natriumsulfat. Ebenso soll die Art und Dauer der Einwirkzeit des Lösungsmittels überprüft werden, um eventuelle Verluste aufgrund zu kurzer Einwirkzeiten festzustellen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten eventuelle Vitamin-Verluste während einer Fest-Flüssig-Extraktion und der Probenvorbereitung aufgedeckt werden und eine Alternative zum derzeit verwendeten Lösungsmittel Chloroform gefunden werden.

2. LITERATURTEIL

2.1. Extraktion

„Unter Extraktion versteht man das selektive Herauslösen, Auswaschen oder Auslaugen bestimmter Substanzen aus festen oder flüssigen Stoffgemischen mit Hilfe flüssiger Lösungsmittel“ (zitiert nach Sattler, 1988, S. 395).

2.1.1. Einordnung der Extraktion

Die Extraktion gehört zu den physikalisch-chemischen Trennmethoden ohne Stoffumwandlung. Bei vielen Trennmethoden ist eine systematische Einteilung nicht möglich, da mehrere Vorgänge zur Trennung führen können. Versucht man eine Zuteilung nach physikalisch-chemischen Gesichtspunkten zu treffen, gehört die Extraktion zu den Verteilungsmethoden, genauso wie die Adsorption und der Ionenaustausch (Schwedt, 1995).

2.1.2. Grundlagen der Extraktion

Vor der Bestimmung mittels einer chromatographischen Methode ist bei komplexen Proben eine Auftrennung in einzelne Komponenten nötig (Otto, 2000).

Die Auftrennung ist einerseits von Nutzen, um störende Begleitstoffe für die Bestimmung abzutrennen und andererseits um möglichst viele Einzelkomponenten in einem Arbeitsgang zu erfassen (Schwedt, 1995).

2.1.3. Fest-Flüssig-Extraktion

Bei dieser Extraktionsmethode werden aus festen Bestandteilen die zu untersuchenden Komponenten herausgelöst. Diese Extraktion wird auch als Auslaugen oder Leaching bezeichnet, und dient der Gewinnung von Ölen aus Presskuchen, Genussmitteln und Gewürzen oder von Substanzen aus Gewächsen und Früchten. Dabei ist zu beachten, dass die Probe mit der zu extrahierenden Substanz intensiv mit dem Lösungsmittel in Berührung kommt und ausreichend Kontaktzeit nötig ist, um einen Austausch von Wertstoffen zu ermöglichen (Sattler, 1988). Während des Extraktionsschrittes diffundiert der Wertstoff in das Lösungsmittel (Vauck und Müller, 2000). Danach erfolgt die Trennung der beiden Phasen. Die Extraktphase enthält den Wertstoff, während die Raffinatphase zurück bleibt (Sattler, 1988).

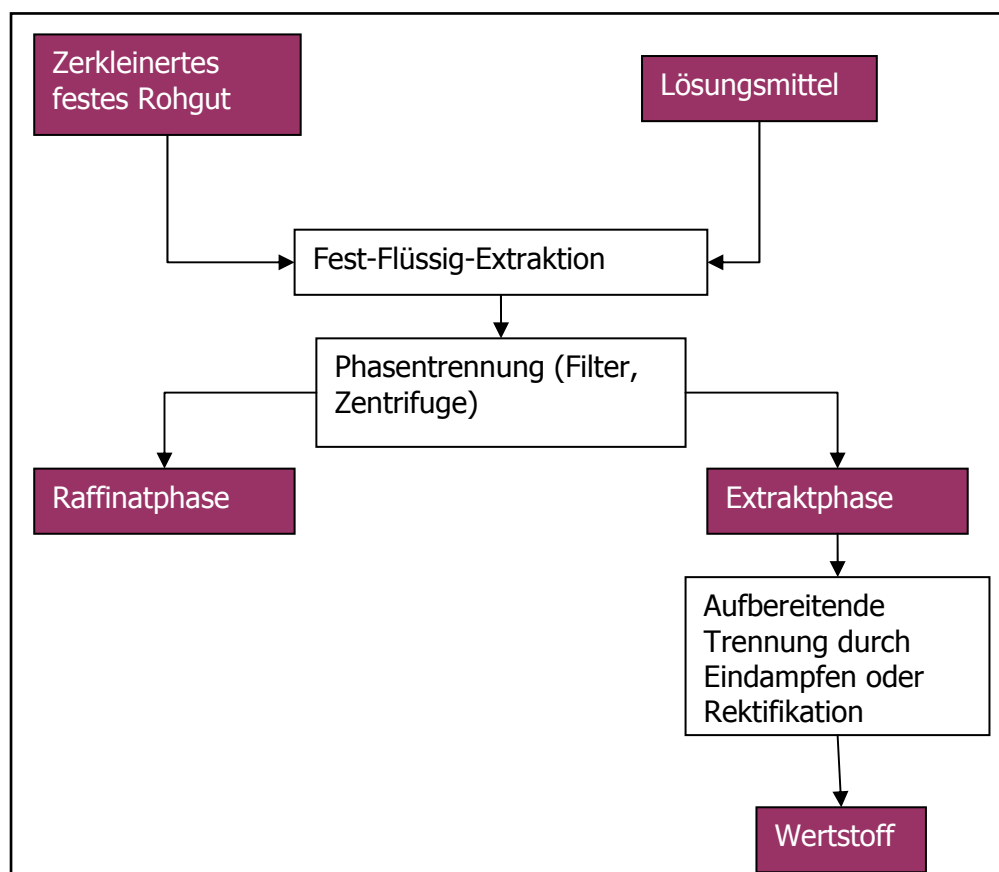


Abb. 1: Verfahrensweise bei der Fest-Flüssig-Extraktion (Sattler, 1988)

2.2. Extraktionsmittel für fettlösliche Vitamine

2.2.1. Ansprüche an das Extraktionsmittel

Die Auswahl des Extraktionsmittels erfolgt nach dem Selektivlösevermögen für den Extraktstoff. Das gewählte Lösungsmittel soll eine hohe Extraktstoffkapazität aufweisen, also eine gute Lösefähigkeit für den gewünschten Wertstoff haben (Vauck und Müller, 2000).

Häufig verwendete Extraktionsmittel sind organisch, wie z. B. Diethylether, Hexan, Chloroform und Dichlormethan. Sie sind mit Wasser nicht mischbar und besitzen eine geringere Dichte als Wasser. Lösungsmittel bilden eigene Phasen, die sich über der wässrigen Phase befinden. Von den 2 Phasen besteht eine überwiegend aus Wasser, wohingegen die andere Phase organisch ist (Harris 1998). Außerdem soll das verwendete Lösungsmittel selektiv für den Extraktstoff wirken, damit nicht gewünschte Bestandteile ungelöst zurückbleiben. Lösungsmittel sollen enge Siedegrenzen und niedrige Siedetemperaturen aufweisen. Es ist wichtig, dass die Verdampfungsenthalpien gering sind, um die vollständige Rückgewinnung des Extraktionsmittels zu gewährleisten (Vauck und Müller, 2000). Unterschiedliche Wirkungsschwellen der Extraktionsmittel ergeben sich aus der Verdampfungszeit und -temperatur, während und nach der Verwendung (Donninger und Vorbach, o.J.).

2.2.2. Verteilung eines Stoffes in den Lösungsmittelphasen bei der Fest-Flüssig-Extraktion

Im Gegensatz zu Flüssig-Flüssig-Extraktionen, wo die Verteilung des Stoffes in 2 Phasen als Nernstscher Verteilungskoeffizient angegeben werden kann, ist dies bei Fest-Flüssig-Extraktionen nicht der Fall. Es ist praktisch nicht möglich, einen Gleichgewichtszustand zu erreichen. Das Festgut enthält nach wie vor ungelösten Wertstoff in den Kapillaren. Ein Teil der Aufnehmerphase bleibt adsorptiv an der Feststoffoberfläche gebunden (Sattler, 1988). Die Verteilung

des Extraktstoffes im Feststoff und im Lösungsmittel folgt dem Diffusionsgesetz (Vauck und Müller, 2000).

2.2.3. Eigenschaften und toxikologische Bewertung unterschiedlicher Extraktionsmittel

Da organische Lösungsmittel bei Exposition, vielfältige Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit haben können, werden die unterschiedlichen Extraktionsmittel im Folgenden toxikologisch bewertet. Dabei wird der Schwerpunkt auf jene Extraktionsmittel gelegt, die für die Versuche dieser Diplomarbeit verwendet wurden.

Maximale Arbeitsplatzkonzentration bzw. Arbeitsplatzgrenzwerte

Die Festlegung von maximalen Arbeitsplatzkonzentrationen (nachfolgend als MAK-Werte bezeichnet) erfolgt durch eine Kommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Stoffe der deutschen Forschungsgemeinschaft. Die Stoffe werden danach in unterschiedliche Gruppen/Kategorien eingeteilt.

MAK-Werte werden als wissenschaftliche Empfehlung herausgegeben. Die MAK-Werte werden seit 2006 durch Arbeitsplatzgrenzwerte (AGW) ersetzt. Der AGW-Wert gibt jene Konzentration an bei der eine akute oder chronische Schädigung der Gesundheit nicht zu erwarten ist. Dabei wird die Luftkonzentration des Stoffes gemessen und in mg/m^3 angegeben (Roth, 2008).

Die Zuordnung der Stoffe erfolgte zu den, für diese Diplomarbeit relevanten, Kategorien bzw. Gruppen krebserzeugend, Schwangerschaftsgruppe/Fruchtschädigende Wirkung und Spitzenbegrenzung. Diese Kategorien werden nachfolgend näher beschrieben.

Einstufung in Kategorien krebserzeugend:

(zit. nach Deutsche Forschungsgemeinschaft, MAK, 30. Lieferung (2000))

- Kategorie 1: „Stoffe, die beim Menschen Krebs erzeugen und bei denen davon auszugehen ist, dass sie einen nennenswerten Beitrag zum Krebsrisiko leisten. Epidemiologische Untersuchungen geben hinreichende Anhaltspunkte für einen Zusammenhang zwischen Exposition beim Menschen und dem Auftreten von Krebs.“
- Kategorie 2: „Stoffe, die als krebserzeugend für den Menschen anzusehen sind, weil durch hinreichende Ergebnisse aus Langzeit-Tierversuchen oder Hinweise aus Tierversuchen und epidemiologischen Untersuchungen davon auszugehen ist, dass sie einen nennenswerten Beitrag zum Krebsrisiko leisten.“
- Kategorie 3: „Stoffe, die wegen möglicher krebserzeugender Wirkung beim Menschen Anlaß zur Besorgnis geben, aber aufgrund unzureichender Informationen nicht endgültig beurteilt werden können.“
3A: „Für die Stoffe liegen jedoch keine hinreichenden Informationen vor, um einen MAK- oder BAT-Wert abzuleiten.“
- Kategorie 4: „Stoffe mit krebserzeugender Wirkung, bei denen genotoxische Effekte keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen. Bei Einhaltung des MAK-Wertes ist kein nennenswerter Beitrag zum Krebsrisiko für den Menschen zu erwarten.“

Schwangerschaftsgruppe / Fruchtschädigende Wirkung

(zit. nach Deutsche Forschungsgemeinschaft, MAK, 26. Lieferung (1998))

- Gruppe A: „Ein Risiko der Fruchtschädigung ist sicher nachgewiesen. Bei Exposition Schwangerer kann auch bei Einhaltung des MAK-Wertes und des BAT-Wertes eine Schädigung der Leibesfrucht auftreten.“
- Gruppe B: „Nach dem vorliegenden Informationsmaterial muß ein Risiko der Fruchtschädigung als wahrscheinlich unterstellt werden. Bei Exposition Schwangerer kann eine solche Schädigung auch bei Einhaltung des MAK- Wertes und des BAT-Wertes nicht ausgeschlossen werden.“

- Gruppe C: „Ein Risiko der Fruchtschädigung braucht bei Einhaltung des MAK-Wertes und des BAT-Wertes nicht befürchtet zu werden.“

Spitzenbegrenzung

(Deutsche Forschungsgemeinschaft, o.J.)

Die Spitzenbegrenzung dient der Absicherung des MAK-Wertes und des BAT-Wertes bei Exposition gegen höhere Konzentrationen. Diese Werte dienen zur Beurteilung von Gefährdungen durch kurzzeitig erhöhte Exposition gegen einen Stoff.

(zit. nach Deutsche Forschungsgemeinschaft, MAK, 35. Lieferung (2002))

- Kategorie I: „Stoffe, bei denen die lokale Wirkung grenzwertbestimmend ist oder atemwegssensibilisierende Stoffe“
- Kategorie II: „Stoffe, die resorptiv wirksam sind.“

Weiters werden nun die für die Durchführung dieser Diplomarbeit verwendeten Lösungsmittel auf ihre Eigenschaften und Gefährlichkeit hin näher beschrieben.

Petroleumether

Auch unter dem Namen Naphta Petroleum bekannt. Es gibt keine einheitliche Strukturformel, da Petroleumether eine Mischung aus unterschiedlichen Kohlenwasserstoffen ist. (The Merck Index, 2006).

Toxizitätsangaben (Deutsche Forschungsgemeinschaft, o.J.):

MAK-Wert

500 mg/m ³

Klare, farblose Flüssigkeit, die leicht entflammbar ist, und einen charakteristischen Geruch aufweist. Nicht löslich in Wasser, aber in Alkohol, Benzen, Chloroform, Ether und Ölen.

Bei hohen Expositionswerten kann es zu Benommenheit, Schläfrigkeit und Irritationen von Auge, Nase und Haut kommen (The Merck Index, 2006).

Ethylacetat

Andere Namen für Ethylacetat sind Essigsäureethylester und Essigester.

Die Strukturformel ist $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ (The Merck Index, 2006).

Toxizitätsangaben (Deutsche Forschungsgemeinschaft, o.J.):

MAK bzw. AGW (Roth, 2008)	LD 50 (Ratten)
1500 mg/m ³	11,3 ml/kg

Klare, brennbare Flüssigkeit, mit fruchtigem Geruch. Sie ist mischbar mit Alkohol, Aceton, Chloroform und Ether. Löst sich auch in Wasser. Es kommt zu Irritationen der Augen, Haut, Nase und Rachen, wenn eine Exposition bei hohen Temperaturen erfolgt. Es kann auch zu einer Dermatitis oder Narkose kommen (The Merck Index, 2006).

n-Hexan

Es ist unter dem Namen Hexan in der Literatur zu finden und hat die Strukturformel $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ (The Merck Index, 2006).

Toxizitätsangaben (Deutsche Forschungsgemeinschaft, o.J.):

MAK bzw. AGW (Roth, 2008)	Fruchtschädigende Wirkung (1991)	LD 50 (Ratten)
180 mg/m ³	Gruppe C	32 g/kg

Hexan ist eine farblose, sehr flüchtige Flüssigkeit und nicht löslich in Wasser, jedoch in Alkohol, Chloroform und Ether.

Bei erhöhter Exposition von Hexan auftretende Symptome sind Benommenheit, Schwindel, Übelkeit, Kopfschmerzen, periphere Neuropathie, Taubheit der

Extremitäten, Muskelschwäche, Nasen- und Augenirritationen, Dermatitis und chemisch bedingte Lungenentzündung (The Merck Index, 2006).

Im Vergleich zu anderen Lösungsmitteln, ist die dermale Aufnahme von gasförmigem n-Hexan, als gering zu bezeichnen. In verschiedenen Studien wurden eben diese niedrigeren Aufnahmeraten gegenüber anderen Lösungsmittel bestätigt (Deutsche Forschungsgemeinschaft, o.J.).

Aceton

Die Strukturformel von Aceton ist CH_3COCH_3 (The Merck Index, 2006).

Toxizitätsangaben: (Deutsche Forschungsgemeinschaft, o.J.)

MAK bzw. AGW (Roth, 2008)	Spitzenbegrenzung	Fruchtschädigende Wirkung
1200 mg/m ³	Kategorie 1	Gruppe C

Aceton ist nur gering toxisch und die dermale Aufnahme ist ebenfalls niedrig. Die Geruchsschwelle liegt bei 100 ml/m³. Am Auge, auf der Schleimhaut und auf der Haut können bei Exposition Schädigungen hervorgerufen werden. Es gibt keine Hinweise auf kanzerogenes oder mutagenes Potenzial (Deutsche Forschungsgemeinschaft, o.J.).

Dichlormethan

Andere Namen für Dichlormethan (DCM) sind Methylenchlorid oder Methylendichlorid. Es besitzt die Strukturformel CH_2Cl_2 .

Dichlormethan ist eine farblose Flüssigkeit, deren Dampf nicht brennbar ist und keine explosive Mischung mit der Luft ergibt.

Symptome bei Überexposition sind Ermüdung, Schwäche, Schläfrigkeit, Kribbeln und Taubheit der Lippen, Übelkeit und Irritationen der Haut und Augen (The Merck Index, 2006).

Toxizitätsangaben (Deutsche Forschungsgemeinschaft, o.J.):

MAK bzw. AGW (Roth, 2008)	Krebserzeugende Wirkung (2000)	LD 50 (Ratten) (Index, 2006)
260 mg/m ³	Kategorie 3A	1,6 ml/kg

Einige Langzeitstudien an drei verschiedenen Tiermodellen zur Kanzerogenese wurden durchgeführt. Die Expositionswerte lagen bei 1000-4000 ml/m³ und Dichlormethan wurde inhalativ aufgenommen. Bei Hamstern kam es zu keiner Tumorbildung, hingegen war bei Ratten und Mäusen Tumorbildung feststellbar. Gefunden wurden bei der Ratte benigne Mammatumore und bei der Maus Lebertumore und Lungenkarzinome (Deutsche Forschungsgemeinschaft, o.J.).

Es gibt 2 Wege zum Abbau von Dichlormethan im Körper, den sättigbaren mikrosomalen (oxidativen) Weg und den cytosolischen nicht sättigbaren Weg. Bei beiden wird Dichlormethan zu CO₂ abgebaut. Eine Sättigung des mikrosomalen Weges kommt bei hohen Dichlormethan Konzentrationen zustande und führt zum Wechsel auf den cytosolischen Stoffwechselweg.

Eine Sättigung des mikrosomalen Metabolismus wurde für alle untersuchten Spezies inklusive des Menschen, bei 500 ml/m³ festgestellt (ECETOC-Statement-No.3 1986). Nur Werte über 1000 ml/m³ bewirkten eine erhöhte Tumorzinzidenz. Daher besteht kein direkter Zusammenhang zwischen dem oxidativen, mikrosomalen Metabolismus und den Tumorbefunden aus den Langzeitstudien. Es wird angenommen, dass erst der cytosolische Weg eine erhöhte Tumorzinzidenz bewirkt. Da die Maus im Gegensatz zur Ratte und zum Hamster viel empfindlicher war, kann davon ausgegangen werden, dass für den Menschen keine Gefahr durch Lebertumore besteht (Deutsche Forschungsgemeinschaft, o.J.).

Die Genotoxizität für Dichlormethan wurde in In-vitro-Systemen festgestellt. Bei Tiermodellen, war die Maus die empfindlichste Spezies und bei Organen zeigte sich die Leber sehr empfindlich (Deutsche Forschungsgemeinschaft, o.J.).

Diethylether

Synonyme sind Ethylether und Ethyloxid mit der Strukturformel $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$.

Diethylether ist eine leichtflüchtige, hochentzündliche und explosive Flüssigkeit, deren Dampf schwerer ist als Luft.

Bei erhöhtem Kontakt mit Diethylether können Symptome wie Schwindel, Kopfschmerzen, Schläfrigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Narkose und Irritation von Augen, Haut und oberen Atemwegen auftreten (The Merck Index, 2006).

Toxizitätsangaben: (Deutsche Forschungsgemeinschaft, o.J.)

MAK bzw. AGW (Roth, 2008)	Krebserzeugende Wirkung (2000)	LC 50 Dosis (Affen)
1200 mg/m ³	Kategorie 2	72000-192500 ml/m ³

Diethylether zeigt eine sehr geringe akute Toxizität und wirkt in hohen Dosen narkotisierend.

Aufnahme von Diethylether erfolgt über Inhalation und nur in sehr geringen Konzentrationen über die Haut. Bis zu 10 000 ml/m³ tolerierten Ratten, ohne dass es zu toxischen Wirkungen kam.

An Tiermodellen führten niedrige arbeitsplatzrelevante Konzentrationen zu keinen eindeutigen Ergebnissen. Nach Inhalation von narkotisierenden Mengen wurde unspezifische Fetotoxizität nachgewiesen. Genotoxizität konnte an Tiermodellen in keinem Testverfahren nachgewiesen werden. Für den Menschen liegen jedoch keine Informationen bezüglich Genotoxizität und Kanzerogenität vor (Deutsche Forschungsgemeinschaft, o.J.).

Chloroform

Eine alternative Bezeichnung für Chloroform ist Trichlormethan. Die Strukturformel ist CHCl_3

Chloroform ist eine lichtbrechende, nichtentzündliche, schwere, hochflüchtige und süßschmeckende Flüssigkeit mit charakteristischem Geruch.

Überexposition kann Symptome wie Schwindel, Übelkeit, Verwirrung, Kopfschmerzen, Ermüdung, Narkose, vergrößerte Leber und Irritation der Augen und Haut hervorrufen (The Merck Index, 2006).

Toxizitätsangaben (Deutsche Forschungsgemeinschaft, o.J.):

MAK bzw. AGW (Roth, 2008)	Krebserzeugende Wirkung (1999)	Fruchtschädigende Wirkung (1999)
2,5 mg/m ³	Kategorie 4	Gruppe C

Die letale Dosis für den Menschen wird mit 45 g angegeben, allerdings kommt es auch sehr auf die Empfindlichkeit der betroffenen Person an, da auch schon Dosen von 270 g überlebt wurden. Früher wurde Chloroform als Anästhetikum eingesetzt, wobei es zu chronischen Nieren- und Leberschäden, sowie akuten Atemstörungen und Arrhythmien während der Narkose kam. In der Medizin findet Chloroform heute keine Anwendung mehr.

Im Tierversuch zeigten sich verschiedene Arten von Tumoren (Niere, Schilddrüse, Leber) nach oraler Applikation. Bei inhalativer Exposition traten nur bei männlichen Mäusen vermehrt Nierentumore auf, im Gegensatz zur Ratte, bei der es zu keinen erhöhten Tumorraten kam. Chloroform zeigt also ein unterschiedliches kanzerogenes Potenzial in Tiermodellen.

In In-vitro-Tests ist Chloroform nicht mutagen. Nieren- und Lebertumore treten aufgrund cytotoxischer Effekte im Tierversuch auf (Deutsche Forschungsgemeinschaft, o.J.).

2.3. Fettlösliche Vitamine

Fettlösliche Vitamine sind essentiell für den menschlichen Organismus. Um sicher zu stellen, dass diese Nahrungsbestandteile ausreichend aufgenommen werden, ist es wichtig, den Gehalt und die Art der Vitamine in den unterschiedlichen Lebensmitteln zu bestimmen (Mathiasson et al. 2002).

Vitamin A, D, E und K zählen zu den fettlöslichen Vitaminen. Alle fettlöslichen Vitamine sind aus Isopreneinheiten aufgebaut, β -Carotin stellt die Vorstufe von Vitamin A dar. Die Strukturen der einzelnen Vitamine sind aber dennoch sehr verschieden (Isler und Brubacher, 1982).

Die fettlöslichen Vitamine sind nicht löslich in Wasser, löslich in Alkohol und sehr gut löslich in organischen Lösungsmitteln, Fetten und Ölen. β -Carotin ist schwerer löslich in Alkohol und organischen Lösungsmitteln als andere fettlösliche Vitamine, es verteilt sich aber gut in Chloroform, Dichlormethan oder Schwefelkohlenstoff (Isler und Brubacher, 1982).

2.3.1. Carotinoide

Einteilung und Struktur

Zu den Carotinoiden zählen Xantophylle (Zeaxanthin, Lutein, β -Cryptoxanthin, Neoxanthin und Violaxanthin) und Carotine (α -Carotin, β -Carotin und Lycopon) (Ball, 2006).

Carotinoide bestehen meist aus 8 Isopreneinheiten und enthalten teilweise einen β -Iononring. Die biologische Aktivität von β -Carotin ist doppelt so groß wie jene von anderen Carotinoiden, da es 2 β -Iononringen enthält (Elmadfa und Leitzman, 1998).

Vorkommen und Stabilität

β -Carotin wird in vielen Pflanzen gebildet, die auch Photosynthese betreiben. Beispiele dafür sind tiefgrünes und tiefgelbes Obst und Gemüse, wie Broccoli, Spinat, Mais, Karotte, Mango, Aprikose. Außerdem findet man auch in Tomaten β -Carotin (Biesalski, 1997). β -Cryptoxanthin ist in größeren Konzentrationen im Süßmais vorhanden (Lee 1981). Lycopon wurde in hohen Mengen in der Tomate gefunden (Tan, 1988; Roldàn-Gutiérrez, 2007; Elmadfa und Leitzman, 1998).

Solange die Umweltbedingungen für die Pflanze stimmen, sind Carotinoide im natürlichen Verband stabil. In isolierter Form kommt es zur Bildung von cis- und trans- Formen, sowie zu Verlusten. Carotinoide sind empfindlich gegen Licht, Hitze, Sauerstoff und aktive Oberflächen, wie z. B. Kieselgel (Ball, 2006).

Verluste an β -Carotin sind zu verzeichnen, wenn Gemüse gekocht wird. In Studien zeigte sich andererseits eine Anreicherung von β -Carotin, bei frittiertem Kohl (Sà de, 2004).

Eine Verminderung des β -Carotin Gehaltes ist auch bei Bohnen in der Dose (baked beans) im Vergleich zu frischen gekochten Bohnen feststellbar (Hart und Scott, 1995).

Von den nachfolgenden Parametern hängt der gemessene Carotingehalt in der Pflanze ab (Rodriguez-Amaya, 2000).

- Kultivierung und Sorte
- Ungleichmäßige Verteilung der Carotinoide in der Lebensmittelprobe
- Reifestadium
- Geographische und klimatische Bedingungen
- Ernte und anschließende Bearbeitung
- Weiterverarbeitung und Lagerung

2.3.2. Vitamin E

Einteilung und Struktur

Zu den Vitamin E-Verbindungen zählen die Tocopherole (α -, β -, γ - und δ -Tocopherol) und die Tocotrienole (α -, β -, γ - und δ -Tocotrienole) (Isler und Brubacher, 1982).

Tocopherole und Tocotrienole sind methylsubstituierte Derivate mit einem Chroman-6-ol Ring und einer Isopren-Seitenkette (Ball, 2006).

Vorkommen und Stabilität

Die wichtigen Pflanzenbestandteile, in denen große Konzentrationen an Vitamin E gefunden werden, sind Nüsse, Bohnen und Samen, die auch über hohe Ölgehalte verfügen. Auch in Produkten wie Fisch, Fleisch, Eiern, Milchprodukten, Getreideprodukten und grünem Gemüse findet sich Vitamin E (Ball, 2006).

Besonders hohe Mengen an Vitamin E finden sich in pflanzlichen Ölen. 49-100% des Gesamttocopherols in Weizenkeim-, Sonnenblumen- und Olivenöl macht der Gehalt an α -Tocopherol aus. Den Hauptanteil am Gesamttocopherolgehalt in Maiskeim-, Soja- und Palmöl stellt γ -Tocopherol dar (Isler und Brubacher, 1982).

Vitamin E wird auch pflanzlichen Ölen zugesetzt, wenn diese hohe Anteile an ungesättigten Fettsäuren enthalten, um deren Oxidation zu verhindern. Die Konzentration von Vitamin E im Fleisch ist abhängig vom Vitamin E-Gehalt des Futters der Tiere. Vor allem γ -Tocopherol ist in Muskeln, Fett und Organen zu finden. Die Konzentration von γ -Tocopherol liegt bei <1 mg/100g Muskel (Ball, 2006).

Vitamin E ist empfindlich gegen Sauerstoff, Licht und Metallionen, aber nicht gegen Wärme (Isler und Brubacher, 1982). Während des Kochvorganges und Frittierens kommt es zu geringen Vitaminverlusten (Ball, 2006).

In gefrorenem Gemüse sind ebenso nur geringe Vitaminverluste auszumachen, wogegen Lebensmittel wie Mais, Bohnen oder Erbsen bei Dosenabfüllung Verluste von 70-90% erleiden (Ames, 1972). Ähnliche Ergebnisse gibt es für β -Carotin in Karotten. Durch Tiefkühlung kommt es nur zu geringen Vitaminverlusten wogegen bei Dosenkarotten hohe Verluste auszumachen sind (Howard et al., 1999).

2.4. Methoden zur Extraktion von Carotinoiden und Vitamin E aus Lebensmitteln - Stand der Wissenschaft

Nachfolgend werden unterschiedliche Studien aufgezeigt, die verschiedene aber aktuelle Methoden zur Extraktion von fettlöslichen Vitaminen und Fetten beschreiben.

Sojamehl- und Milchpulverproben wurde 50% Natriumhydroxid zugegeben und in einem Wasserbad erhitzt, danach Ethanol und Hydrochinon-Lösung zugefügt, abgekühlt und im Scheidetrichter mit Wasser, Petroleumether und Diethylether gemischt, geschüttelt. Nach der Phasentrennung enthielt die obere Phase Vitamin A und E. Nach Wiederholung des Ausschüttelvorgangs wurden die beiden Phasen miteinander kombiniert. Danach wurde das Extrakt filtriert und im Rotavapor zur Gänze eingedampft und in 2 ml Methanol zur Analyse aufgenommen. Es wurden Stabilitätsversuche mit Standardlösungen, die Retinol, γ -, δ -, β - und α -Tocopherol beinhalten, durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine Lagerung der Lösung bei Raumtemperatur bis 24 Stunden möglich ist ohne einen nennenswerten Abbau der Vitamine festzustellen. Eine Lagerung über 7 Tage bei 4 °C im Dunkeln zeigte ebenfalls keine auffallenden Vitaminverluste. Durch diese Methode konnten Wiederfindungsraten von >90% erreicht werden (Ake et al., 1998).

Mittels Fettextraktion wurden unterschiedliche Milchprodukte extrahiert. Die angewandte Methode nach Röse-Gottlieb wurde modifiziert um Zeit und Chemikalien zu sparen. Den Proben wurde Ammoniak und Ethanol hinzugefügt und diese danach geschüttelt. Diethylether mit BHT wurde als Extraktionsmittel verwendet. Nach Schütteln und Hexanzugabe wurde die Phasentrennung abgewartet. Die Wasserphase wurde entfernt und Calciumchlorid hinzugefügt, anschließend wurde stark geschüttelt, die organische Phase in einen Rundkolben mit dem Rotavapor abgedampft und in Hexan aufgenommen. Die Wiederfindungsraten lagen für Vitamin A, E und β -Carotin zwischen 94 und 99% (Hewavitharana et al., 1996).

Die Proben zur Bestimmung von Carotinoiden in Pesto wurden erst homogenisiert und dann zentrifugiert. Danach wurde die Ölphase abgetrennt. Der feste Rückstand wurde 3 Mal mit Hexan gewaschen und wieder zentrifugiert, um danach den Rückstand ca. 10 Mal mit Aceton zu waschen. Diese Phasen wurden danach vereint und im Rotavapor wurden die Extraktionsmittel abgedampft. Es wurden Pestos von unterschiedlichen Herstellern analysiert. Dabei konnten signifikante Unterschiede bei den β -Carotin-Gehalten der unterschiedlichen Pestoproben ausgemacht werden (Masino, 2008).

Lycopene wurde aus roten Wassermelonen mittels zwei Assay-Methoden bestimmt. Das verwendete Lösungsmittelgemisch war Aceton/Ethanol/n-Hexan (1:1:2). Für die eine Methode wurden je 25 ml Aceton und Ethanol und 50 ml n-Hexan verwendet, während bei der zweiten Assay Methode die Lösungsmittelvolumina auf je 5 ml Aceton und Ethanol und 10 ml n-Hexan reduziert wurden. Die pürierte Wassermelone wurde mit den Lösungsmitteln versetzt und 15 Minuten geschüttelt. Die obere n-Hexanphase wurde abgenommen und bei 503 nm im Photometer gemessen. Die Ergebnisse von der neuen Methode mit weniger Lösungsmittel konnten durchaus mit den Werten der ursprünglichen Methode verglichen werden (Fish et al., 2002).

Als unterschiedliche Extraktionsmittel für die Extraktion von Lycopene wurden Dichlormethan, Aceton/Chloroform, Hexan/Aceton/Ethanol, Ethylacetate, Benzene und Ethylether angegeben. Eine weitere und neue Möglichkeit der Extraktion für Carotinoide ist jene mittels superkritischem CO_2 . Diese Methode nennt man Supercritical fluid extraction (SFE). Um die Polarität dieses Lösungsmittels zu erhöhen wird ein Co-Lösungsmittel wie Ethanol verwendet. Durch diese Methode wird das Extrakt geschont und nicht verunreinigt. Dieses kann in der Pharmazie, Kosmetik und im Essensbereich eingesetzt werden. Die Studie zeigte Vergleiche zwischen SFE und Flüssigextraktion bei unterschiedlichen Temperaturen. Dabei wurde festgestellt, dass die SFE und die Flüssigextraktion bei 50 °C das Gesamt-Lycopene am besten extrahierten, während eine Flüssigextraktion bei 75 °C am wenigsten Ausbeute erbrachte (Roldán-Gutiérrez und de Castro, 2007).

Aus unterschiedlichen pflanzlichen Ölen wurden Tocopherole und Tocotrienole bestimmt. Dazu wurde den Ölproben n-Hexan hinzugefügt, diese danach homogenisiert und filtriert. Die Detektion erfolgte mittels HPLC, wobei die Wiederfindungsraten zwischen 58 – 115 % lagen (Gama et al., 2000).

2.5. Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Diplomarbeit war es, Vitaminverluste während der Probenaufarbeitung und Extraktion von Lebensmitteln festzustellen und das Extraktionsmittel Chloroform aufgrund seiner gesundheitsschädlichen Eigenschaften (siehe 2.2.3.7) durch ein anderes Lösungsmittel zu ersetzen, welches zusätzlich quantitativ gleich oder besser wirkt.

Die Basis für die Untersuchungen bildete eine modifizierte Extraktionsmethode (Folch et al., 1957), die fettlösliche Bestandteile, wie fettlösliche Vitamine (A, D, E, K) und Carotinoide aus Lebensmitteln herauslöst.

Dabei wurden einzelne Schritte der Extraktionsmethode verändert und mit der ursprünglichen Methode verglichen. Dabei wurde auch Augenmerk auf die Probenvorbereitung mittels Gefriertrocknung gelegt.

Die analysierten Parameter waren Carotinoide (α -Carotin, β -Carotin, Lycopene) und Tocopherole (α -Tocopherol, γ -Tocopherol). Als interner Standard für die Carotinoide diente Apo-8- β -Carotenoate und für die Tocopherole Tocol. Die benötigten Parameter wurden simultan analysiert. Dabei wurden die Carotinoide mit dem UV-VIS Detektor und die Tocopherole mit dem Fluoreszenz-Detektor detektiert.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Probenmaterial

3.1.1. Lebensmittel

Tab. 1: Beschreibung der verwendeten Lebensmittel

Bezeichnung	Lebensmittelart	Herkunft
Penne Arrabiata	fleischloses Fertiggericht mit Tomatensauce und pflanzlichem Öl	Feine Küche, Spar-Supermarkt, Österreich
Jägerrindsschnitzel mit Spiralen	fleischhältiges Fertiggericht mit pflanzlichem Öl	Gourmet Küche, Hofer-Supermarkt, Österreich
Maiskeimöl	Pflanzliches Öl	Osana, Hofer-Supermarkt, Österreich

Es wurde ein fleischloses und ein fleischhältiges Lebensmittel ausgewählt, um unterschiedliche Bedingungen darzustellen. Die Analyten sind in den Lebensmitteln in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten, man erwartet im Tomatengericht viel Lycoplen und im Fleischgericht hingegen mehr Tocopherole. Das Maiskeimöl war zweckmäßig für Versuche wie z.B. Gefriertrocknung zur schnelleren Überprüfung einzelner Faktoren. Maiskeimöl hat einen hohen Anteil an γ -Tocopherol.

Es ist zu berücksichtigen, dass bei jedem Lebensmittel eine unterschiedliche Matrix vorliegt und bei sehr komplexen und heterogenen Lebensmitteln wie Fleisch eventuell Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung und bei der Homogenität der Probe auftreten können.

3.1.2. Probenaufarbeitung und Probenvorbereitung

Verwendete Geräte und Reagenzien

Tab. 2: Verwendete Geräte

Geräte	Firma (Produktbezeichnung)
Mikrowelle	Panasonic (Dimension 4)
Homogenisator	Büchi (Mixer B-400)
Präzisionswaage	Mettler (AT 201)
Rotavapor	Heidolph (VV2011/WB 2001)
Mixstab	IKA (T10 basic)
Schüttler	IKA (KS 125 basic)

Tab. 3: Verwendete Reagenzien

Reagenzien	Firma (Produktnummer)
Chloroform	Merck (1024452500)
Dichlormethan	Merck (1060442500)
Diethylether	Fluka (31685)
Ethylacetat	Fluka (45760/33211)
Petroleumether	Merck (1017756010)
Hexan	Merck (1043912500)
Aceton	Merck (/)
Methanol	Merck (1060072500)
Calciumchlorid	Fluka (21079)
Natriumsulfat (entwässert)	Riedel de Haen (13464)
Acetonitril	Merck (1000302500)

Beide Fertiggerichte wurden folgenderweise zubereitet. Die beiden Fertiggerichte wurden nach mehrmaligem Einstechen der Folie mit einer Gabel in einer Mikrowelle bei 600 Watt für 3 Minuten erhitzt und dann kurz ruhen gelassen. Nach dem Abkühlen (ca. 20 min.) auf Eis wurde die Folie entfernt und der Inhalt jeder Schale vollständig homogenisiert. Danach wurde das

homogenisierte Lebensmittel in gleich große Portionen geteilt und tiefgekühlt bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung für den Versuch wurde die Probe für 4-6 h in den Kühlraum (6 °C) gestellt. Anschließend wurde mit einem Mixstab nochmals gut homogenisiert.

Das Maiskeimöl wurde direkt, ohne weitere Vorbereitung, verwendet.

Für den Versuch zum Gefriertrocknen mit Öl, wurde ein interner Standard (eine Mischung aus Tocol und Apo-8-β-Carotenoate) zugegeben. Damit sich dieser gut in der Lebensmittelprobe verteilt, wurde das Gemisch etwa 7 Minuten am Rotavapor gemischt.

3.2. Durchführung der Versuche

Die nachstehende Abbildung zeigt die einzelnen Schritte der Extraktion und die möglichen Optimierungspunkte, die überprüft wurden.

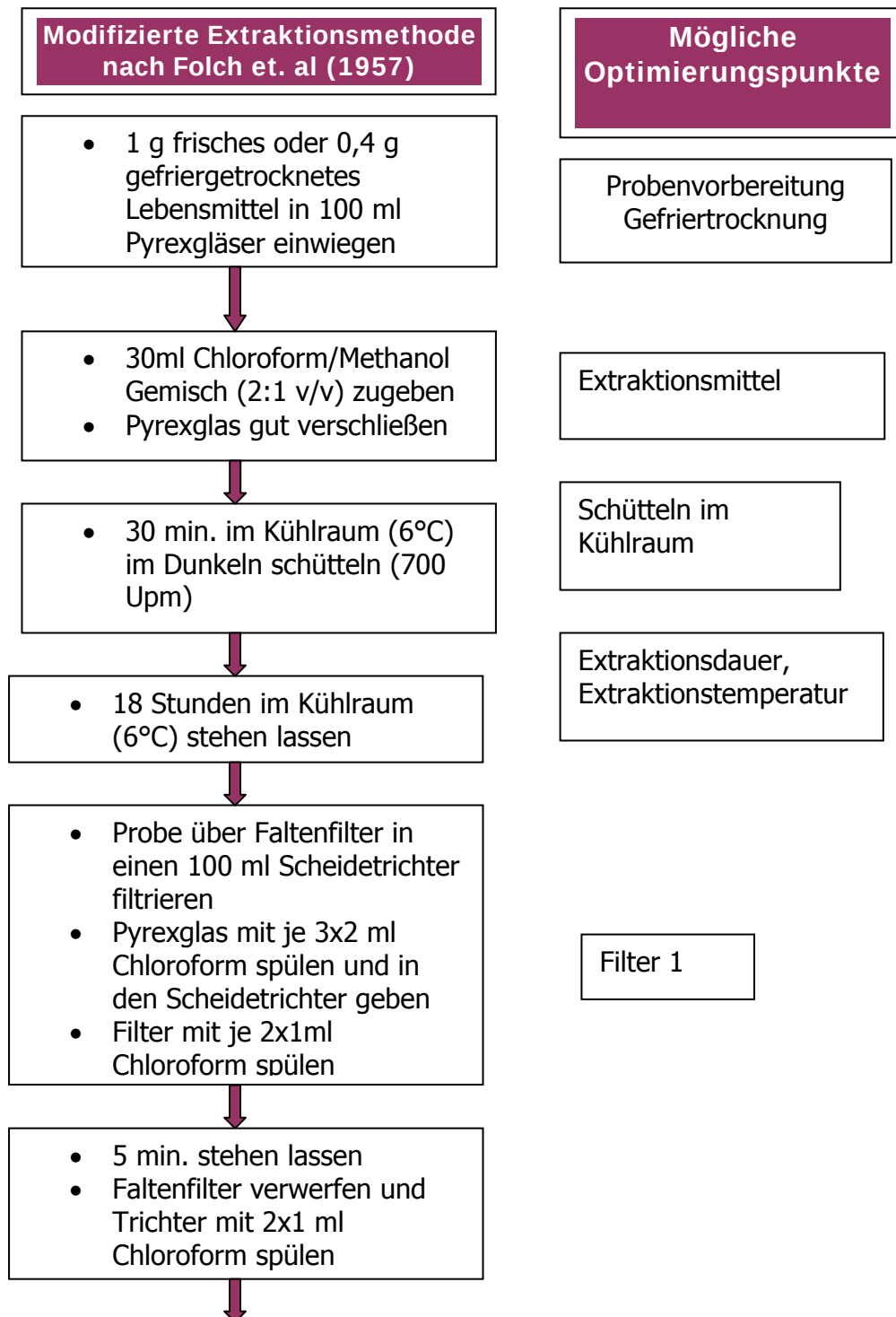


Abb. 2: Modifizierte Extraktionsmethode nach Folch et al. (1957)

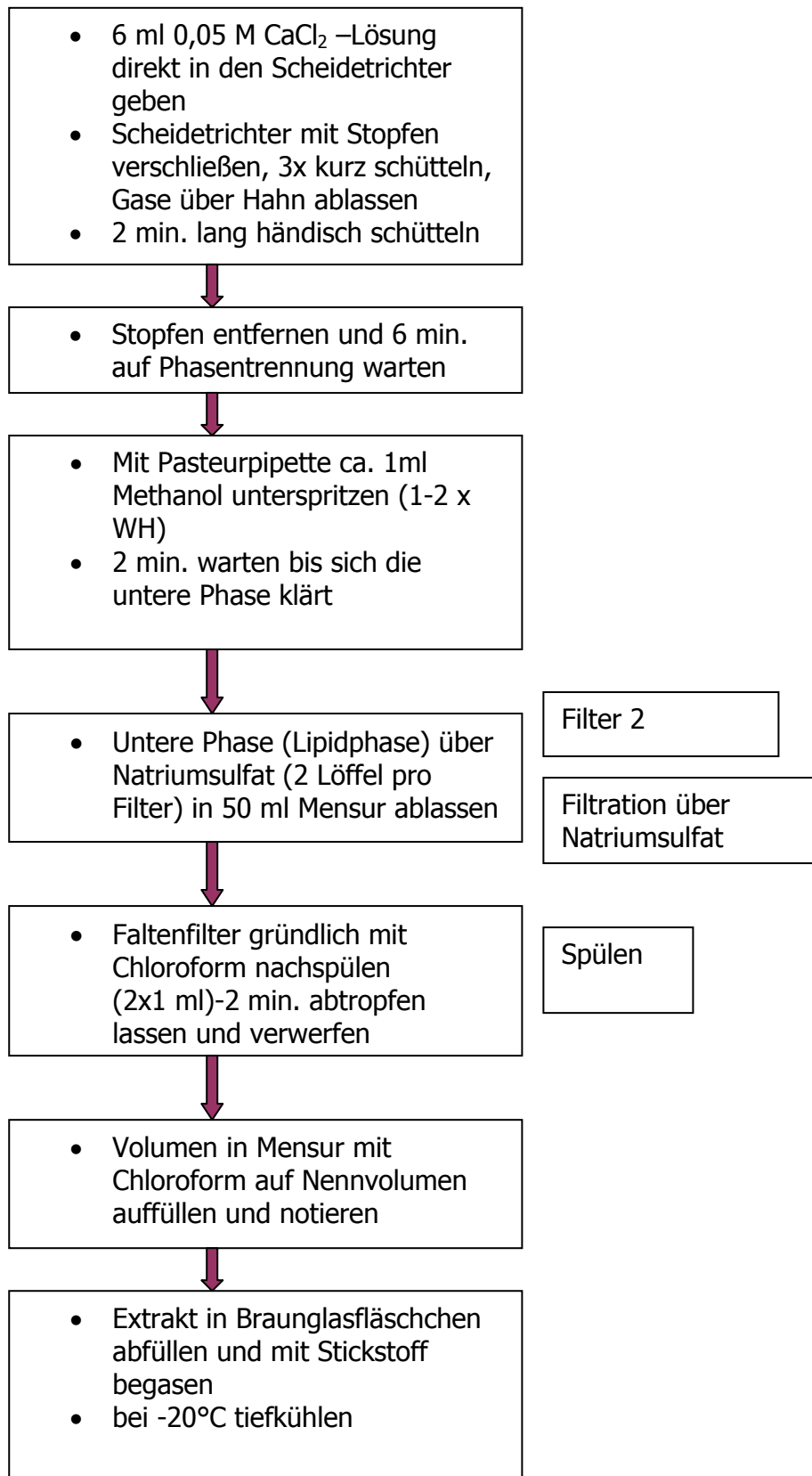


Abb. 3: Fortsetzung modifizierte Extraktionsmethode nach Folch et al. (1957)



Abb. 4: Die Phasentrennung im Scheidetrichter vor (trüb) und nach dem Unterspritzen von Methanol (klar)

3.2.1. Lösungsmittelversuch 1

Fünf unterschiedliche Lösungsmittelgemische wurden durch die Anwendung derselben Methode an 2 verschiedenen Lebensmittelproben (Penne Arrabiata und Jägerschnitzel) verglichen. Die Lösungsmittelgemische wurden der Literatur entnommen und mit der zurzeit angewandten Methode am Department für Ernährungswissenschaften (Folch et al., 1957) verglichen.

Die ausgewählten Extraktionsmittelgemische waren folgende:

1. Chloroform/Methanol (2:1) (Folch et al., 1957)
2. Diethylether/Methanol (2:1) (Roldàn-Gutiérrez und Dolores Luque de Castro, 2007)
3. Dichlormethan/Methanol (3:1) (Reichardt et al., 2003)
4. Ethylacetat/Petroleumether/Methanol (1:1:1) (Breithaupt und Schwack, 2000)
5. Hexan/Aceton/Methanol (2:1:1) (Kaur et al., 2008)

Durchführung

1 g homogenisiertes Lebensmittel wurde in ein 100 ml Pyrexglas eingewogen und die Einwaage notiert. Danach wurden 30 ml des jeweiligen Lösungsmittelgemisches zugegeben und für 30 Minuten im Kühlraum bei 6 °C am Rüttler geschüttelt. Dann wurde 18 Stunden, im Dunkeln, im Kühlraum extrahiert. Nach dem Extraktionsschritt wurden die Proben ausgeschüttelt, indem sie zuerst über einen Faltenfilter (d=150 mm) in einen Scheidetrichter filtriert wurden. Weiters wurde das Pyrexglas mit 2 ml des jeweiligen Lösungsmittel (Ethylacetat/Petroleumether, Aceton, Dichlormethan, Diethylether, Chloroform) ohne Methanol 3 Mal gespült und ebenfalls über den Filter in den Scheidetrichter geleert. Der Filter wurde mittels Glaspipette und dem jeweiligen Lösungsmittel gespült. Nach einer Wartezeit von 5 Minuten wurde der Filter verworfen und der Glastrichter mit 1 ml des entsprechenden Lösungsmittels gespült. Anschließend wurde zur Probe in den Scheidetrichter 6 ml 0,05 M CaCl_2 – Lösung gegeben. Das Gemisch wurde durch langsames Schwenken und Öffnen des Hahnes entgast und 2 Minuten lang händisch geschüttelt. 6 Minuten lang wurde die Phasentrennung abgewartet und danach wurde die organische Phase durch Unterspritzen mit Methanol geklärt (1-2 ml) (siehe Abb. 3). Die benötigte organische Phase (gefärbt) wurde über einen Faltenfilter mit 2 Löffel Natriumsulfat in eine 50 ml Mensur abgelassen. Der Filter wurde mit 2 ml des jeweiligen Lösungsmittels gespült und nach 2 Minuten verworfen. Die Extraktmenge wurde bis zu einem Nennvolumen mit dem entsprechenden Extraktionsmittel aufgefüllt und das Volumen notiert. Anschließend wurden die Extrakte geschüttelt, in Braunglasflaschen gefüllt, mit Stickstoff begast, mit Parafilm umwickelt und bei -20 °C tiefgekühlt. Auch von den Methanolphasen (wässrige Phase) wurden Proben genommen und tiefgekühlt.

3.2.2. Lösungsmittelversuch 2

Der nächste Versuch wurde aufgrund der erzielten Ergebnisse des 1. Versuches realisiert. Dabei wurden Lösungsmittel 1 bis 3 vom Lösungsmittelversuch 1 verwendet, aber die Proben zusätzlich mit einem internen Standard (Tocol/Apo-8- β Carotinal) versetzt. Die Durchführung zur Extraktgewinnung und die Aufarbeitung der Extrakte, waren ident mit dem ersten Versuch.

3.2.3. Lösungsmittelversuch 3

Dafür wurde ein Standardreferenzmaterial der Firma NIST (National Institute of Standard Technology) namens BCR 485 verwendet. Dieses Referenzmaterial enthielt eine bekannte Konzentration an Carotinoiden und Tocopherolen. Zur Verifizierung der Versuche 1 und 2 wurde jeweils ein Lösungsmittel mit guten (Dichlormethan) und eines mit schlechten Analysewerten (Etylacetat/Petroleumether) verwendet. Ca. 0,1 g des Referenzmaterials wurden eingewogen und die Einwaage genau notiert. Dann wurde interner Standard und 10 ml Extraktionsmittelgemisch zugegeben und am Rüttler im Kühlraum geschüttelt. Die Extrakte wurden in einem Messkolben gesammelt und auf das gleiche Nennvolumen gebracht, danach wie bei Lösungsmittelversuch 1 (siehe 3.2.1) beschrieben, aufgearbeitet und analysiert.

3.2.4. Gefriertrocknungsversuch mit Maiskeimöl

Um eventuelle Verluste der Carotinoid- und Tocopherolkonzentrationen im Lebensmittel durch Gefriertrocknung zu erkennen, wurde dieser Versuch mit unterschiedlichen Gefriertrocknungszeiten angelegt. Für diesen Versuch wurde nur Maiskeimöl verwendet.

Durchführung

Das mit dem internen Standard versetzte Maiskeimöl wurde auf die entsprechende Anzahl an Behältern aufgeteilt und im Tiefkühlschrank bei -80°C aufbewahrt. Nachdem die Proben gefroren waren, wurde ein Teil im Gefriertrockner (Lyophilisator) gestellt und an unterschiedlichen Zeitpunkten wieder entnommen. Als erstes wurden die tiefgefrorenen Proben analysiert. Die gefriergetrockneten Proben wurden nach folgendem Zeitintervall wieder entnommen, aufgetaut und sofort analysiert: 18 Stunden, 25 Stunden und 41 Stunden.

Für das Öl war keine andere Probenvorbereitung mehr nötig und es konnte sofort direkt analysiert werden. Ca. 20 mg Probe (Einwaage notieren) wurden mit 5 ml Hexan versetzt und gevortext. Davon wurden 2 ml entnommen und 3 ml Hexan dazugegeben und wieder gevortext. Aus diesem Gemisch wurden 0,5 ml entnommen und im Wasserbad bei 40°C unter Stickstoffbegasung abgedampft. Der Rückstand wurde, wie bei den anderen Versuchen in 200 µl Dichlormethan und Acetonitril (0,2 g/l BHT) aufgenommen.

3.2.5. Gefriertrocknungsversuch mit Penne Arrabiata

Nachdem die Ergebnisse des 1. Gefriertrocknungsversuches mit Öl keine eindeutigen Ergebnisse zeigten, wurde ein 2. Versuch mit einem wasserhältigen Lebensmittel Penne Arrabiata durchgeführt.

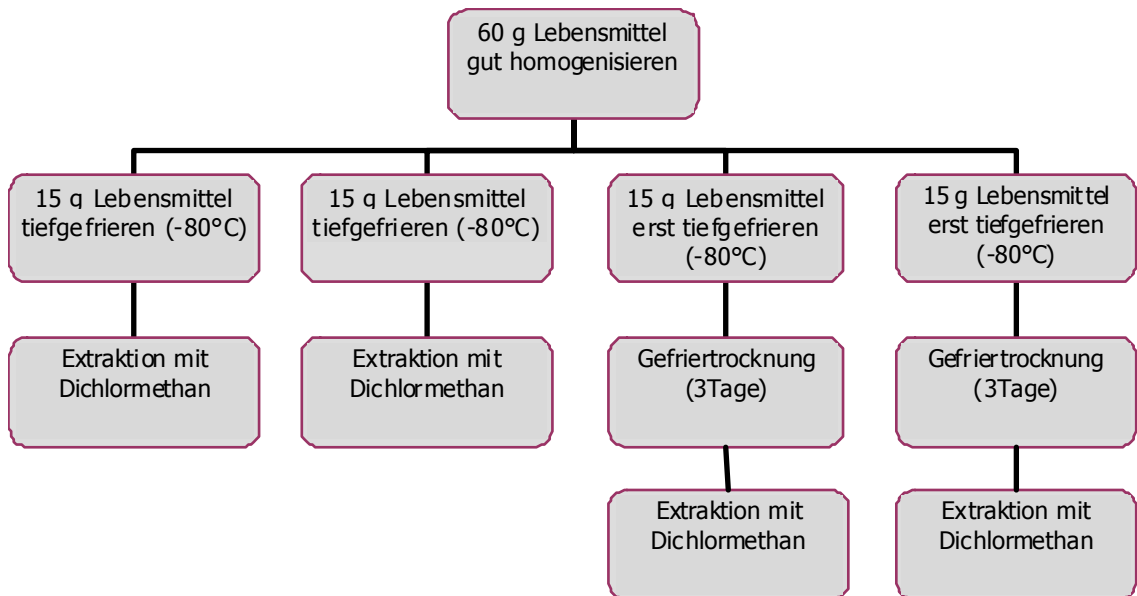


Abb. 5: Gefriertrocknungsversuch mit Penne Arrabiata

Die Behälter und der Inhalt wurden vor und nach dem Gefriertrocknen gewogen, um den Wasserverlust festzuhalten. Die Lebensmittelproben wurden für die Dauer von 18, 25 oder 41 Stunden gefriergetrocknet. Die Extrakte wurden nach gewohntem Schema hergestellt und analysiert.

3.2.6. Schüttelversuch 1

Bei diesem Versuch wurde die Auswirkung der Schütteldauer auf das Extraktionsvermögen des Lösungsmittels unter verschiedenen Bedingungen getestet. Das verwendete Lösungsmittel war Dichlormethan/Methanol (3:1) und das Lebensmittel Penne Arrabiata. Zusätzlich zu den Proben mit normaler Extraktionsdauer wurden auch Proben angesetzt die kürzer extrahiert wurden, um festzustellen ob der Wertstoff in kurzer Zeit bereits vollständig im Lösungsmittel enthalten ist.

Tab. 4: Bedingungen, Verfahren und Ablauf von Schüttelversuch 1

Probe	Schütteldauer in Minuten	Extraktionsdauer in Stunden	Bedingungen
1	30	2	Raumtemperatur
2	30	18	Kühlraum
3	60	18	Kühlraum
4	120	18	Kühlraum

Die Extrakte wurden wie bereits beschrieben (siehe 3.2.1) hergestellt und analysiert.

3.2.7. Schüttelversuch 2 und Lösungsmittelversuch

Bei diesem Versuch wurde die Auswirkung der Schütteldauer auf das Extraktionsvermögen des jeweiligen Lösungsmittels unter verschiedenen Bedingungen getestet. Als Lösungsmittel wurde einerseits Dichlormethan/Methanol (3:1) und andererseits Chloroform/Methanol (2:1) verwendet. Durchgeführt wurde dieser Versuch mit dem Lebensmittel Penne Arrabiata.

Tab. 5: Bedingungen, Verfahren und Ablauf von Schüttelversuch 2

Probe	Schütteldauer in Minuten (1, 2) in Stunden (3, 4)	Extraktionsdauer in Stunden	Extraktionsmittel
1	30	18	Dichlormethan/Methanol
2	30	18	Chloroform/Methanol
3	18	Keine zusätzliche Extraktion	Dichlormethan/Methanol
4	18	Keine zusätzliche Extraktion	Chloroform/Methanol

Die Proben wurden anschließend extrahiert und analysiert.

3.2.8. Versuch mit unterschiedlichen Konzentrationen an Natriumsulfat

Dieser Versuch wurde mit Maiskeimöl durchgeführt. Dabei wurde ca. 30 mg Öl in ein Pyrexglas eingewogen und die Einwaage notiert. Anschließend mit internem Standard für Carotinoide und Tocopherole versetzt und 30 ml Lösungsmittelgemisch hinzugegeben. Die Proben wurden 20 Minuten am Rüttler geschüttelt und dann nach demselben Schema wie bei den anderen Ansätzen ausgeschüttelt.

Natriumsulfat wurde zur Trocknung des Extraktes verwendet, dieser Schritt wurde modifiziert, indem einerseits verschiedene Konzentrationen an Natriumsulfat eingewogen wurden, und andererseits wurde bei der Hälfte der Proben auf das Spülen verzichtet.

Tab. 6: Versuch mit unterschiedlichen Konzentrationen an Natriumsulfat

Filter Nummer	Ohne Nachspülen	Mit Nachspülen	Menge in Löffel
	Natriumsulfatmenge	Natriumsulfatmenge	
	in g	in g	
1	0	0	0
2	2	2	0,5
3	5	5	1
4	7	7	1,5
5	10	10	2

3.2.9. Filterversuch 1

Bei diesem Versuch wurden eventuell vorhandene Rückstände von Carotinoiden und Tocopherolen im Faltenfilter untersucht. Dabei wurde jener Faltenfilter verwendet, der auch dazu diente, das Lebensmittel (in diesem Fall Penne Arrabiata) in den Scheidetrichter zu filtrieren. Außerdem sollte versucht werden ohne Natriumsulfat zu arbeiten, um eine weitere mögliche Fehlerquelle ausschließen zu können. Verwendetes Lösungsmittel war Dichlormethan.

Durchführung

Der Filter vom Schüttelversuch 1 (Kapitel 3.2.6.) wurde nach dem Spülen nicht verworfen, sondern in ein Pyrexglas überführt und mit 20 ml Dichlormethan versetzt. Danach wurden die Proben 3 Stunden im Kühlraum inkubiert, und anschließend wurde der gesamte Inhalt des Pyrexglases in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Das Pyrexglas wurde 2 Mal mit 2 ml Dichlormethan gespült. Anschließend wurde bei 3000 Upm 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Volumen notiert. Nach Abfüllung der Proben in Braunglasfläschchen und Stickstoffbegasung wurden diese bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

3.2.10. Filterversuch 2 (mit Natriumsulfat)

Ausgehend vom Versuch mit unterschiedlichen Natriumsulfatkonzentrationen, wurden im Anschluss die Filter mit Natriumsulfat, nochmals extrahiert.

Die Filter enthielten kein, 2 g, 5 g, 7 g oder 10 g Natriumsulfat. Nur die Hälfte der Filter wurden mit Dichlormethan nachgespült.

Durchführung

Die Filter mit Natriumsulfat aus dem Versuch mit unterschiedlichen Konzentrationen an Natriumsulfat (Kapitel 3.2.8.), wurden nicht verworfen, sondern in ein Pyrexglas überführt und mit 20 ml Dichlormethan versetzt. Nach einer Inkubation von 3 Stunden im Kühlraum wurde der gesamte Inhalt des

Pyrexglases in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Das Pyrexglas wurde 2 Mal mit 2 ml Dichlormethan gespült. Danach wurde bei 3000 Upm 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Volumen notiert. Nach Abfüllung der Proben in Braunglasfläschchen und Stickstoffbegasung wurden diese bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

3.3. Analyse mit HPLC

Alle Proben wurden mittels High Pressure Liquid Chromatography analysiert. Verwendet wurden die zwei nachfolgend beschriebenen Geräte.

3.3.1. High Pressure Liquid Chromatograph 1

Tab. 7: HPLC 1-Beschreibung

<u>Pumpe:</u> Ultimate 3000 Pump, Dionex	<u>Laufmittel:</u> A-Acetonitril B-Methanol C-Acetonitril/Dichlormethan (58:62) D-2-Isopropanol
<u>Autosampler:</u> Ultimate 3000 Autosampler, Dionex	
<u>Detektor und Wellenlänge:</u> <u>UV Detektor:</u> Ultimate 3000 Variable Wavelength Detector, Dionex <u>Wellenlänge:</u> 450 nm <u>Fluoreszenzdetektor:</u> RF 2000 Fluorescence Detector, Dionex <u>Wellenlänge:</u> Ex 295 nm/Em 330 nm	<u>Elution:</u> Gradientenelution In den ersten 3 Minuten, der Analyse wurde eine Mischung aus 60% A und 40% B verwendet. Bis zur Minute 22 wurde auf 40% B und 60% C gewechselt. Anschließend 80% D und 20% A. Ab der Minute 31 bis zur Minute 45 wurde wieder der Ausgangszustand erreicht (40% A + 60% B).
<u>Flow:</u> 0,5 ml/min	
<u>Säule:</u> Synergi 4y Hydro RP 80 A, Phenomenex, 150x3 mm	

Mit diesem Gerät wurden die Analysen für Versuch 1 und 2 durchgeführt. Die Proben der restlichen Versuche wurden mit nachfolgend beschriebener HPLC analysiert. (siehe 3.3.2.)

3.3.2. High Pressure Liquid Chromatograph 2

Tab. 8: HPLC 2-Beschreibung

<u>Pumpe:</u> La Chrom L-7110 isocratic pump, Hitachi Merck	<u>Säule:</u> Vydac Säule kurz mit externer RP18-Vorsäule RP-C18, 150x4,6 mm
<u>Autosampler:</u> La Chrom L-7200 Autosampler, Hitachi Merck	<u>Laufmittel:</u> alles LiChrosolv 85% Methanol 10% Acetonitril 5% Dichlormethan
<u>Detektor und Wellenlänge</u> UV-Detektor: L-4250 UV-VIS, Hitachi Merck <i>Wellenlänge:</i> 450 nm <i>Fluoreszenzdetektor:</i> F-1050 <i>Fluorescence Spectrometer, Hitachi Merck</i> <i>Wellenlänge:</i> Ex 295 nm/Em 330 nm	<u>Elution:</u> Isokratenelution <u>Flow:</u> 0,8 ml/min

3.3.3. Kalibrationsgerade

Die Kalibrationsgeraden für HPLC 1 und HPLC 2 wurden aus den gleichen Mischstandards hergestellt. Für die HPLC 1 lagen die Werte im Bereich von 0,005 µg/g bis 0,4 µg/g für Carotinoide und 0,05 µg/g bis 8 µg/g für Tocopherole, mit einem durchschnittlichen Bestimmtheitsmaß von 0,9905 für Tocopherole und 0,9865 für Carotinoide außer Lycopon, welches bei 0,9584 lag. Die Konzentrationen für die HPLC 2 lagen im Bereich von 0,005 µg/g bis 0,25 µg/g für Carotinoide und 0,05 µg/g bis 5 µg/g für Tocopherole, mit einem durchschnittlichen Bestimmtheitsmaß von 0,9962 für Tocopherole und 0,9973 für Carotinoide außer Lycopon, welches bei 0,9660 lag.

Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte über die Kalibrationsgerade unter Berücksichtigung eines Verdünnungsfaktors (siehe 3.4).

3.4. Extraktaufbereitung

Die Extrakte wurden aus dem Tiefkühler genommen und aufgetaut. Je 1 ml Extrakt wurde in eine Epprovette pipettiert und im 40 °C heißen Wasserbad unter Begasung mit Stickstoff abgedampft. Der Rückstand der Probe wurde in 40 µl Dichlormethan und 160 µl Acetonitril mit 0,2 g/l Butylhydroxytoluol aufgenommen und gevortext. Anschließend wurden 170 µl des Gemisches entnommen, in ein Vial mit Inlett pipettiert und mit dem jeweiligen Gerät analysiert.

3.5. Reproduzierbarkeit

Der Variationskoeffizient für die Methode betrug für Apo-8-β Carotenoate 2,03% und für Tocol 1,54% bei der Verwendung von Maiskeimöl.

3.6. Statistische Auswertung

Der arithmetische Mittelwert, dessen Standardabweichung und der Variationskoeffizient wurden mit Excel berechnet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (Statistical Package for the Social Science, SPSS Incorp., Chicago, USA) 14.0. Die Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov Test, der zu den nichtparametrischen Tests gehört, überprüft und waren normalverteilt. Danach wurden die Mittelwerte mittels einfaktorieller ANOVA auf signifikante Unterschiede überprüft, welche mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% definiert und im Ergebnisteil mit * ($p < 0,05$) angegeben wurden.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit den Verlusten fettlöslicher Vitamine während der Probenvorbereitung und Extraktion von Lebensmitteln. Die statistischen Vergleiche auf dem Level von $p < 0,05$ wurde jeweils auf die modifizierte Methode am Department für Ernährungswissenschaften bezogen die in den Diagrammen mit 100% angegeben oder farblich gekennzeichnet wurde. Die aktuelle Methode am Department für Ernährungswissenschaften ist die Methode nach Folch et. al (1957) mit dem Lösungsmittelgemisch Chloroform/Methanol. Signifikante Ergebnisse werden mit * gekennzeichnet und beziehen sich auf die aktuelle Methode am Department.

4.1. Lösungsmittelversuch 1

In diesem Versuch wurde das zurzeit verwendete Chloroform mit anderen derzeit üblichen Lösungsmitteln verglichen.

Die ausgewählten Extraktionsmittel waren aus der Literatur. Das aktuelle Extraktionsmittelgemisch, das derzeit am Department für Ernährungswissenschaften verwendet wird, ist Chloroform/Dichlormethan (Folch et al. 1957). Penne Arabiata waren das erste Lebensmittel, welches für diesen Versuch mit unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen verwendet wurde. Aufgrund der erhaltenen Vitamin E- und Carotinoidkonzentrationen mit den verschiedenen Lösungsmittelgemischen war erkennbar, dass die Extraktionsmittel Ethylacetat/Petroleumether und Hexan/Aceton signifikant niedrigere Gehalte an Carotinoiden und Tocopherolen lieferten als das bisher verwendete Chloroform. Die Extraktionen mit den Lösungsmitteln Dichlormethan und Diethylether lieferten ähnliche Vitamin E- und Carotinoideausbeuten wie jene mit Chloroform. Jedoch waren bei den Extraktionsversuchen mit Diethylether hohe Standardabweichungen erkennbar. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Ausbeuten mit den unterschiedlichen Extraktionsmitteln sind in Abb. 6 in % des bisher verwendeten Lösungsmittelgemisches Chloroform/Methanol (2:1 v/v) (=100%)

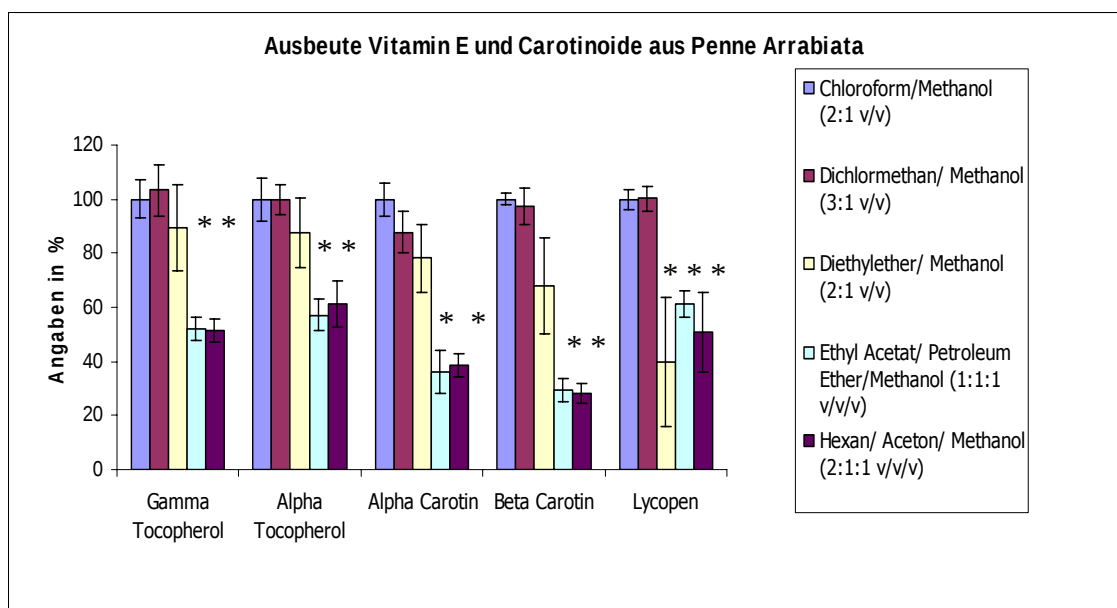


Abb. 6: Ausbeuten dargestellt in % des bisher verwendeten Lösungsmittelgemisches Chloroform/Methanol 2:1 v/v

Als zweites Lebensmittel wurde für diesen Versuch das Jägerschnitzel verwendet. Beim Jägerschnitzel zeigten sich im Gegensatz zu Penne Arrabiata hohe Standardabweichungen. Durch Matrixunterschiede zwischen fleischlosen Produkten (Penne Arrabiata) und fleischhaltigen Produkten (Jägerschnitzel) könnte es zu höheren Standardabweichungen und der unterschiedlichen Löslichkeit der Vitamine gekommen sein.

Chloroform zeigte signifikant höhere Werte bei der Ausbeute von α -Tocopherol als alle anderen Lösungsmittel. Bei Lycoplen und β -Carotin war es umgekehrt, bis auf Diethylether lösten die anderen Lösungsmittel β -Carotin signifikant besser und bei Lycoplen waren die Werte von Ethylacetat und Hexan/Aceton höher. Bei γ -Tocopherol gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lösungsmittelgemischen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der unterschiedlichen Ausbeuten an Vitamin E und Carotinoiden in % von Chloroform/Methanol (2:1 v/v) (=100%) dargestellt (siehe Abb. 7).

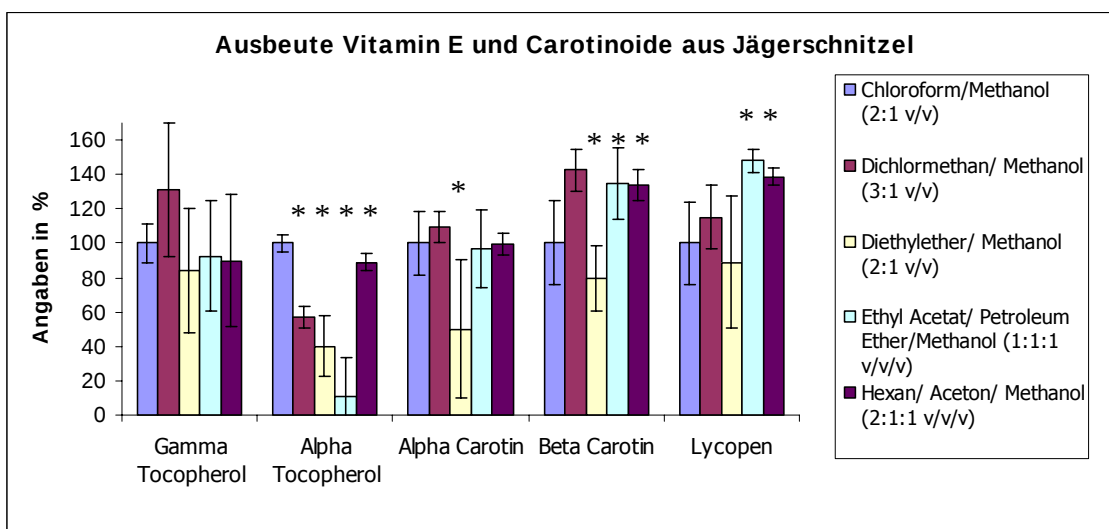


Abb. 7: Ausbeuten dargestellt in % des bisher verwendeten Lösungsmittelgemisches Chloroform /Methanol 2:1 v/v

Fazit

Aufgrund der Ergebnisse wurde erkennbar, dass die Lösungsmittel bei unterschiedlicher Matrix verschieden wirkten. Beim Jägerschnitzel waren die Ergebnisse nicht deutlich genug, um eine klare Aussage treffen zu können.

Allerdings war den Lösungsmitteln Dichlormethan und Diethylether der Vorzug zu geben, da sie bei der Penne Arrabiata gleichmäßig hohe Werte lieferten, wohingegen Ethylacetat/Petroleumether und Hexan/Aceton signifikant geringere Werte lieferten als das bisher verwendete Chloroform.

4.2. Lösungsmittelversuch 2 (mit internem Standard)

Aufgrund der Ergebnisse des ersten Lösungsmittelversuchs wurden für diesen zweiten Versuch die Extraktionsmittelgemische Chloroform/Methanol (2:1 v/v), Dichlormethan/Methanol (3:1 v/v) und Diethylether/Methanol (2:1 v/v) verwendet. Da die Lösungsmittelgemische Ethylacetat/Petroleumether/Methanol und Hexan/Aceton/Methanol im Vergleich zu Chloroform/Methanol zu geringe Ausbeuten zeigten wurden diese in diesem Versuchsansatz nicht mehr verwendet. Bei diesem Versuchsansatz wurde im Gegensatz zum ersten Lösungsmittelversuch ein interner Standard zugegeben.

Die Ausbeute mit Diethylether waren bei der Penne Arrabiata signifikant höher und beim Jägerschnitzel signifikant niedriger als mit Chloroform. Allgemein war Diethylether schwerer handhabbar, da es sehr schnell verdampfte und eine geringere Dichte als Methanol hatte. Daher kam es zu sehr großen Ungenauigkeiten bei den Versuchen, weshalb Diethylether als Lösungsmittel ausgeschlossen wurde. Dichlormethan zeigte in diesem Versuch durchwegs signifikant höhere bzw. ähnlich hohe Werte wie Chloroform (siehe Abb. 8 und 9).

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Vitamin E- und Carotinoidausbeuten mit den verschiedenen Lösungsmittelgemischen sind dargestellt in % von Chloroform/Methanol (2:1 v/v) (=100%).

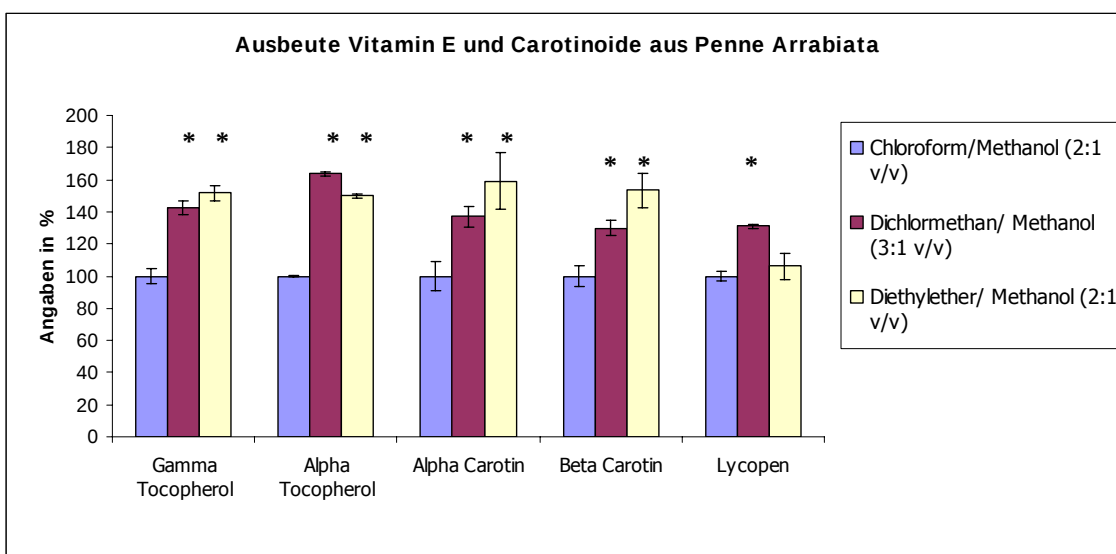


Abb. 8: Ausbeuten dargestellt in % des bisher verwendeten Lösungsmittelgemisches Chloroform/Methanol 2:1 v/v

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Vitamin E- und Carotinoidausbeuten sind dargestellt in % von Chloroform/Methanol (2:1 v/v) (=100%)

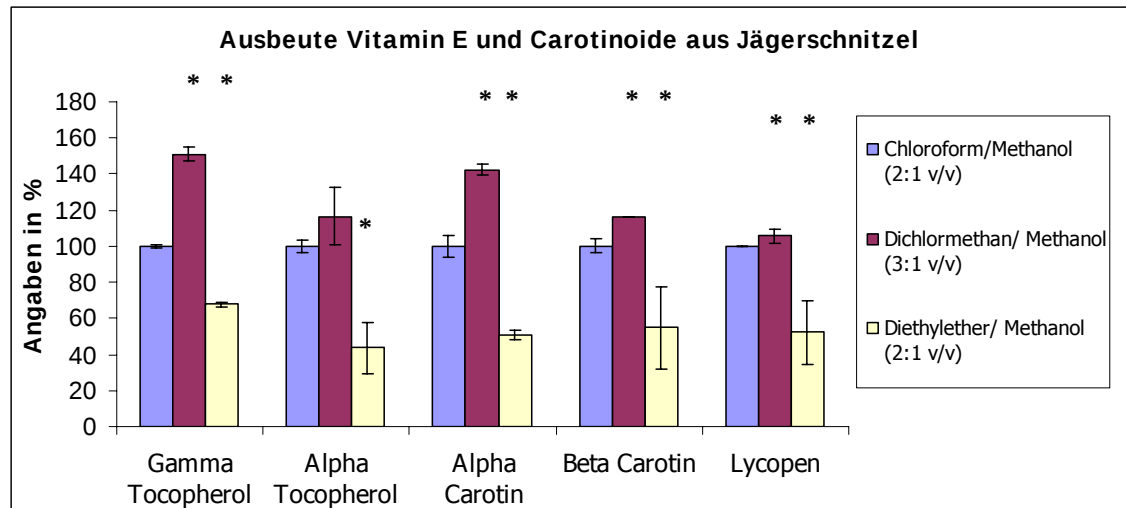


Abb. 9: Ausbeuten dargestellt in % des bisher verwendeten Lösungsmittelgemisches Chloroform/Methanol 2:1 v/v

Verluste während der Extraktion

Um Verluste während der gesamten Extraktion festzuhalten wurde bei diesem Versuch ein interner Standard (IS) zugegeben, und zwar unter der Annahme, dass sich dieser gleich verhalte wie die Analyten selbst. Die zugegebene Menge an IS entspricht dem erwarteten Analytgehalt (berechneter Wert) und wurde mit dem tatsächlich analysierten Wert verglichen (erhaltener Wert). Davon ausgehend ist der Verlust bei der Extraktion die Differenz von berechnetem und erhaltenem Wert.

Apo-8- β -Carotenoate wurde als IS für Carotinoide verwendet, wohingegen Tocol für Vitamin E eingesetzt wurde.

Die Verluste beim Lebensmittel Penne Arrabiata liegen für die Carotinoide zwischen 21,3 und 38,5% und für die Tocopherole zwischen 47,6 und 57,5% für alle eingesetzten Lösungsmittelgemische.

Beim Jägerschnitzel sind die Verluste größer und zwar liegen diese bei den Carotinoiden zwischen 58,3 und 77,2% und bei den Tocopherolen zwischen 37,6 und 59,3% für alle verwendeten Lösungsmittelgemische.

Dichlormethan führt zu geringeren Verlusten als Chloroform, mit Ausnahme von den Verlusten der Tocopherole bei der Penne Arrabiata.

In folgenden Diagrammen wird der berechnete (erwartete) Wert als 100% angegeben (siehe Abb. 10 und 11).

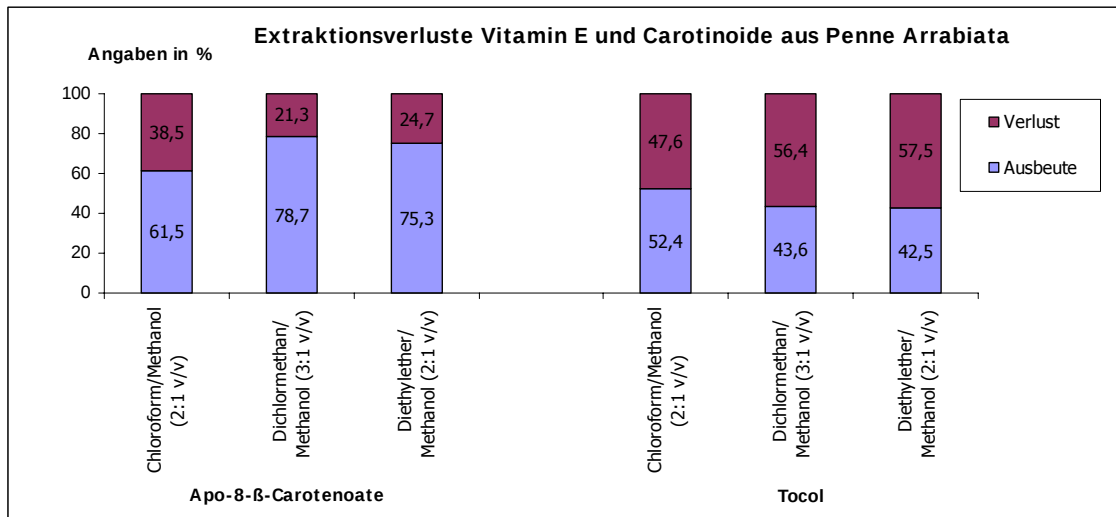


Abb. 10: Extraktionsverluste Vitamin E und Carotinoide aus Penne Arrabiata

Tab. 9: Mittelwerte und Standardabweichungen der Ausbeute der internen Standards in µg/100g (siehe Abb. 10)

Mittelwerte Penne Arrabiata (µg/100g)				
	Apo-8-β-Carotenoate		Tocol	
Chloroform/Methanol (2:1 v/v)	4069	±415	8939	±296
Dichlormethan/ Methanol (3:1 v/v)	5189	±269	13699	±267
Diethylether/ Methanol (2:1 v/v)	5470	±746	14725	±693

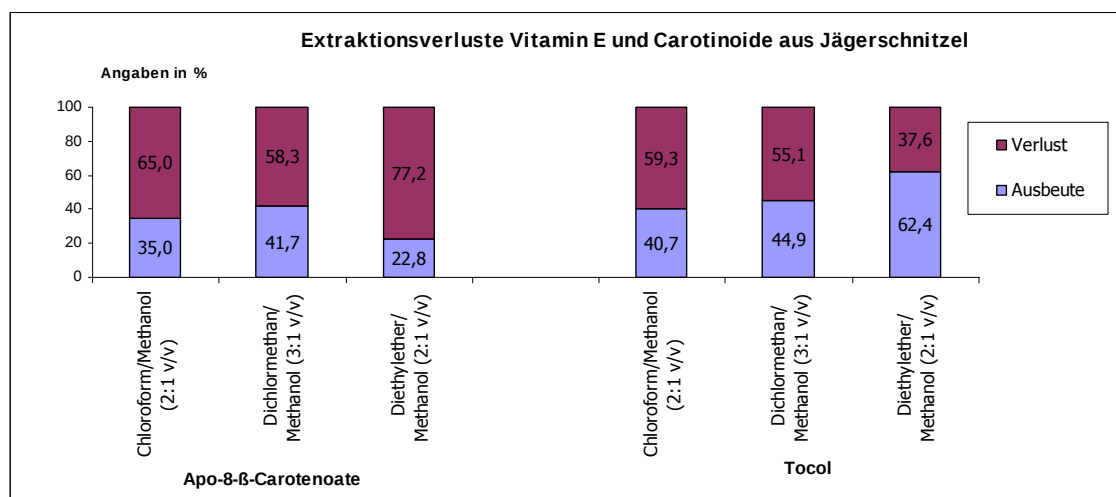


Abb. 11: Extraktionsverluste Vitamin E und Carotinoide aus Jägerschnitzel

Tab. 10: Mittelwerte und Standardabweichungen der Ausbeute der internen Standards in µg/100g (siehe Abb. 11)

Mittelwerte Jägerschnitzel (µg/100g)				
	Apo-8-β-Carotenoate			Tocol
Chloroform/Methanol (2:1 v/v)	33,3	±5,8	7,63	
Dichlormethan/ Methanol (3:1 v/v)	35,9	±9,6	7,74	±3,91
Diethylether/ Methanol (2:1 v/v)	19,5	±8,4	10,7	±0,01

Fazit

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse zeigte sich Dichlormethan dem bisher verwendeten Chloroform am Ähnlichsten. Es lieferte teilweise sogar signifikant höhere Ausbeuten als Chloroform. Diethylether kann aufgrund von sehr unterschiedlichen Ergebnissen mit einerseits signifikant geringeren, andererseits aber auch signifikant höheren Ausbeuten nur schwer beurteilt werden. Zusätzlich ist es auch unpraktisch in der Anwendung. Die aufgetretenen Extraktionsverluste waren bei der Verwendung von Dichlormethan als Extraktionsmittel niedriger als bei der Verwendung von Chloroform.

4.3. Lösungsmittelversuch 3

Anhand der Referenzsubstanz BCR 485, der Firma NIST sollte das unterschiedliche Extraktionsvermögen der Lösungsmittel zwischen einem der gut lösenden und weniger gut lösenden Extraktionsmittel dargestellt werden. Aufgrund der Ergebnisse des Lösungsmittelversuch 1 werden dabei Dichlormethan und Ethylacetat/Petroleumether als Extraktionsmittel gewählt. Abb. 12 zeigt, dass mit Dichlormethan eine höhere Ausbeute erzielt werden konnte als mit Ethylacetat/Petroleumether. Mit 100% (Linie) wurden die Werte von Dichlormethan angegeben. Alle Analysenwerte des Lösungsmittelgemischs Ethylacetat/Petroleumether waren signifikant niedriger, als jene von Dichlormethan.

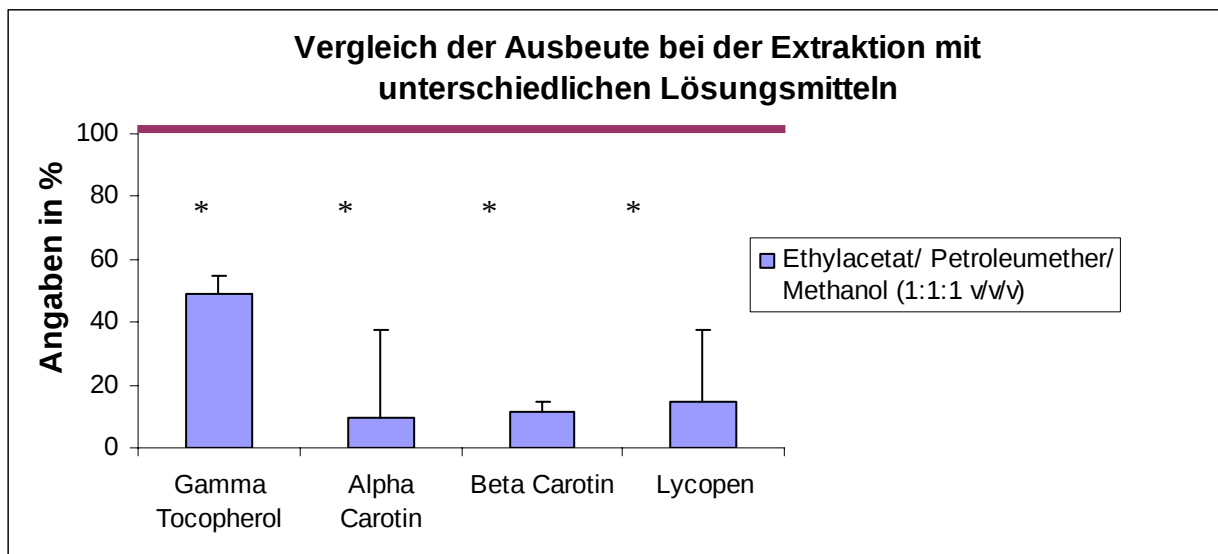


Abb. 12: Vergleich der Ausbeuten, die mit den Extraktionsmitteln Dichlormethan (100 % Linie) und Ethylacetat/Petroleumether erzielt wurden

Fazit

Diese Ergebnisse zeigten eindeutig das bessere Extraktionsvermögen von Dichlormethan. Daher konnte Ethylacetat/Petroleumether als Lösungsmittel für weitere Versuche ausgeschlossen werden.

4.4. Gefriertrocknungsversuch mit Maiskeimöl

Maiskeimöl wurde mit einem internen Standard versetzt und danach einer Gefriertrocknung unterzogen. Zum Vergleich wurde eine Ölprobe nur tiefgefroren, die anderen Ölproben wurden für jeweils 18, 25 und 41 Stunden gefriergetrocknet. Dabei konnten, außer für α -Tocopherol, keine signifikanten Unterschiede der einzelnen extrahierten Vitamine festgestellt werden. Die tiefgefrorenen Proben lieferten im Vergleich zu den gefriergetrockneten Proben bei α -Tocopherol signifikant niedrigere Werte (siehe Abb. 13).

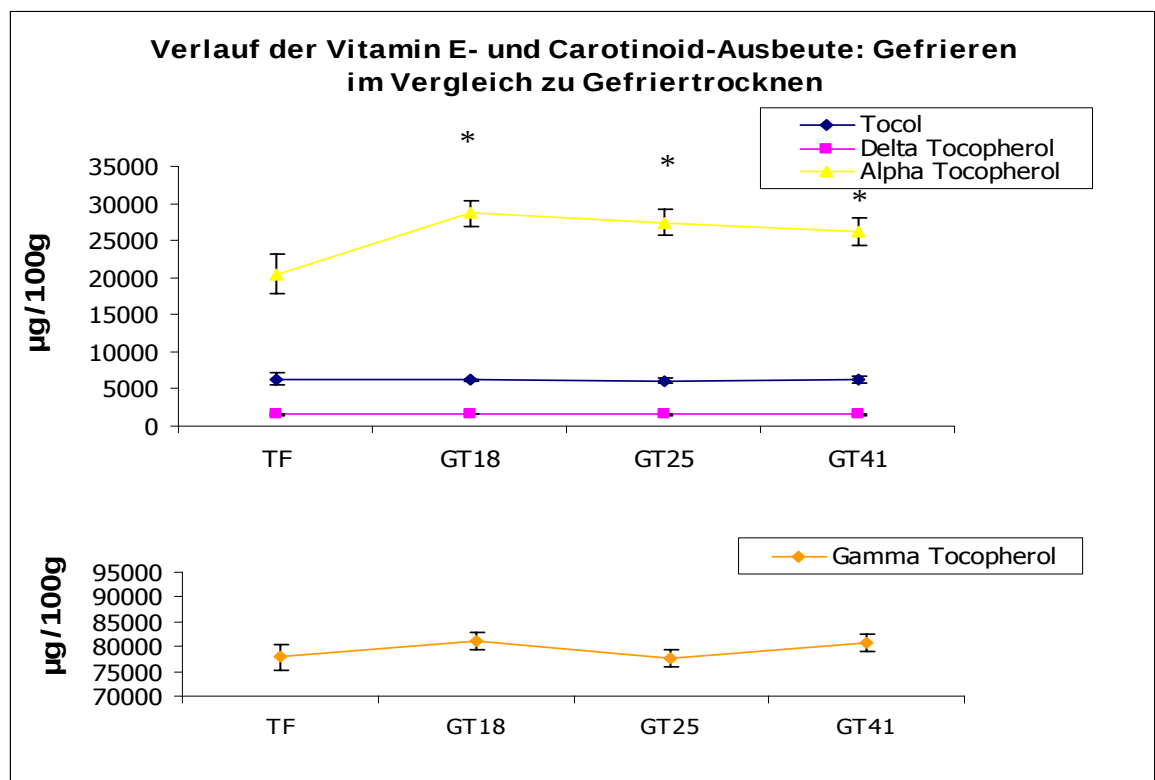


Abb. 13: Unterschiedliche Vitaminausbeute bei Tiefgefrieren und Gefriertrocknen

TF: Tiefgefrieren, GT: Gefriertrocknen, 18, 25, 41: Anzahl der Stunden

α -Tocopherol *: TF < GT18, GT 25, GT 41 ($p < 0,05$)

Um die Verluste während der Gefriertrocknung darzustellen, wurden die Ergebnisse des internen Standards herangezogen. Die Differenz vom erwarteten und erhaltenen Wert gibt den Verlust an. Die Verluste des internen Standards durch Gefriertrocknung liegen zwischen 14,3 und 16,5% für Apo-8- β -Carotenoate und 12,7 und 15% für Tocol. (siehe Abb. 14)

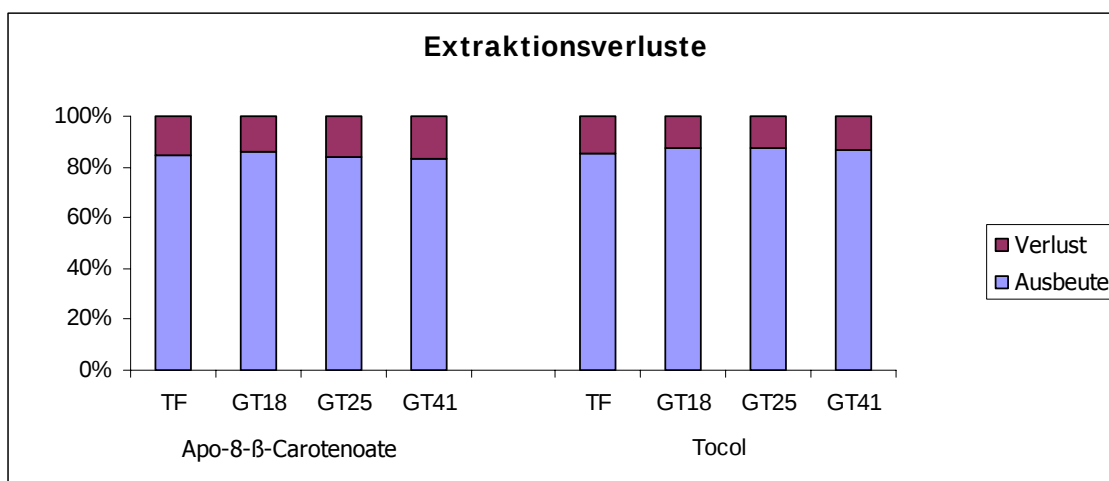


Abb. 14: Extraktionsverluste beim Tieffrieren und beim Gefriertrocknen von Öl

Tab. 11: Mittelwerte und Standardabweichungen der Ausbeuten an internen Standards in $\mu\text{g}/100\text{g}$ (siehe Abb. 14)

$\mu\text{g}/100\text{g}$	Apo-8- β -Carotenoate		Tocol	
TF	2973	$\pm 59,9$	6063	± 833
GT18	3015	$\pm 64,9$	6225	± 147
GT25	2949	$\pm 87,8$	6216	± 272
GT41	2939	± 257	6167	± 411

Fazit

Ob Maiskeimöl während der Probenaufbereitung gefriergetrocknet wurde oder nicht, ergab keine Unterschiede in den Analyseergebnissen der internen Standards (Apo-8- β -Carotenoate und Tocol) sowie jener von γ -Tocopherol und δ -Tocopherol.

Nur bei α -Tocopherol unterschieden sich die tiefgefrorenen Proben von den gefriergetrockneten Proben mit signifikant niedrigeren Werten. Die Vitaminverluste lagen zwischen 12,7 und 16,5%. Diese stammten aber mit großer Wahrscheinlichkeit nicht von der Gefriertrocknung, da sie auch bei den tiefgefrorenen Proben nachgewiesen werden konnten. Eventuell kamen die Verluste von der Behandlung des Öls mit dem Rotavapor.

4.5. Gefriertrocknungsversuch mit Penne Arrabiata

Die Penne Arrabiata wurde über 3 Tage hinweg gefriergetrocknet. Der ursprüngliche Wassergehalt der frischen Probe wurde gravimetrisch durch wiegen vor und nach der Gefriertrocknung bestimmt.

Nach folgendem Schema wurden die Proben aufgearbeitet.

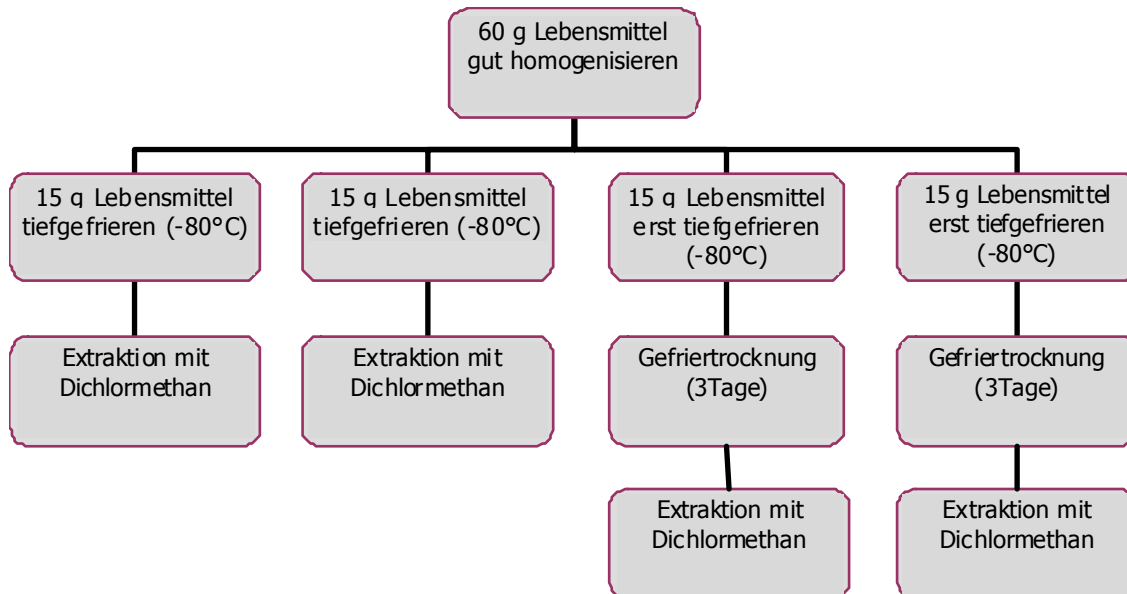


Abb. 15: Gefriertrocknungsversuch mit Penne Arrabiata

Tab. 9 zeigt den Berechnungsvorgang zur Bestimmung des Wassergehalts der frischen Lebensmittelproben. Durch die Gefriertrocknung (GT) wurde das Wasser aus den Lebensmittelproben entfernt.

Tab. 12: Berechnung des ursprünglichen Wassergehaltes der gefriergetrockneten Proben

Probe 1	
Gewicht vor GT in g	19,8756
Dose in g	4,4156
Gewicht nach GT mit Dose in g	9,1718
Gewicht nach GT ohne Dose in g	4,7562
Trockenmasse %	Wassergehalt %
19,8756 g.....100%	
4,7562 g.....x%	<u>69,24%</u>
x=30,765%	

Probe 2	
Gewicht vor GT in g	19,5155
Dose in g	4,1468
Gewicht nach GT mit Dose in g	8,8318
Gewicht nach GT ohne Dose in g	4,685
Trockenmasse %	Wassergehalt %
19,5155 g.....100%	
4,6850 g.....x%	<u>69,52%</u>
x=30,484%	

Alle tiefgefrorenen Proben wiesen signifikant höhere Gehalte an Vitaminen auf als die gefriergetrockneten Proben. Ein besonders großer Unterschied wurde bei α -Tocopherol und Lycopene festgestellt (siehe Abb. 16).

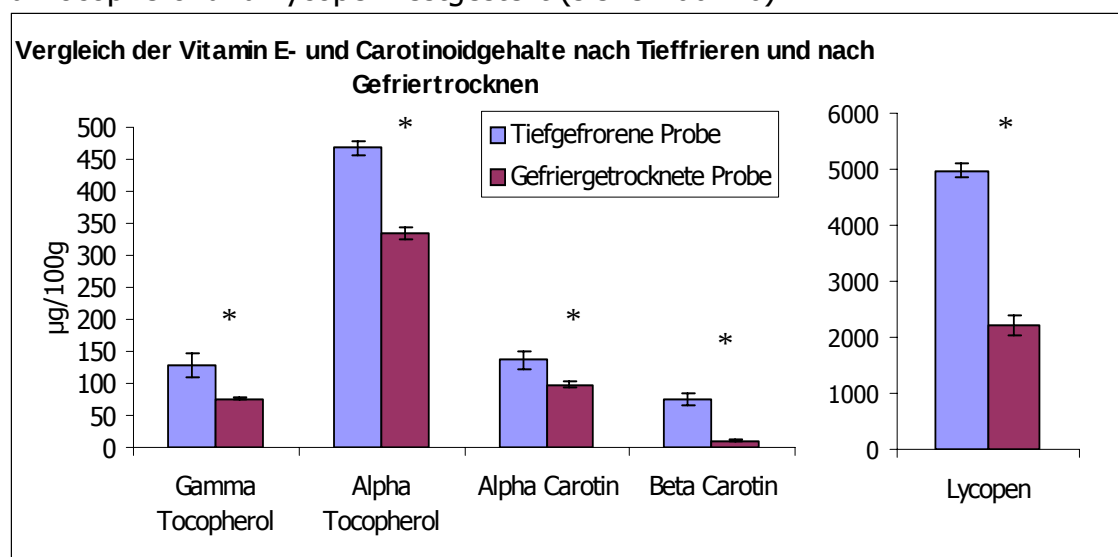


Abb. 16: Vergleich Extraktwerte Vitamin E und Carotinoide nach Tiefgefrieren und Gefriertrocknen am wasserreichen Lebensmittel Penne Arrabiata

Durch den Gefriertrocknungsschritt und dem daraus folgenden Wasserverlust bei der Probenaufarbeitung kam es zu Vitaminverlusten. β -Carotin schien am empfindlichsten zu sein. Abb. 17 soll die Verluste darstellen, die durch die Gefriertrocknung zustande kamen. Dazu wurde die Differenz der Werte der tiefgefrorenen Proben und der Werte der gefriergetrockneten Proben verwendet. Die Verluste betrugen zwischen 28,06 und 55,66%, außer bei β -Carotin, das wie bereits erwähnt, hohe Verluste von 85,82% aufwies (siehe Abb. 17).

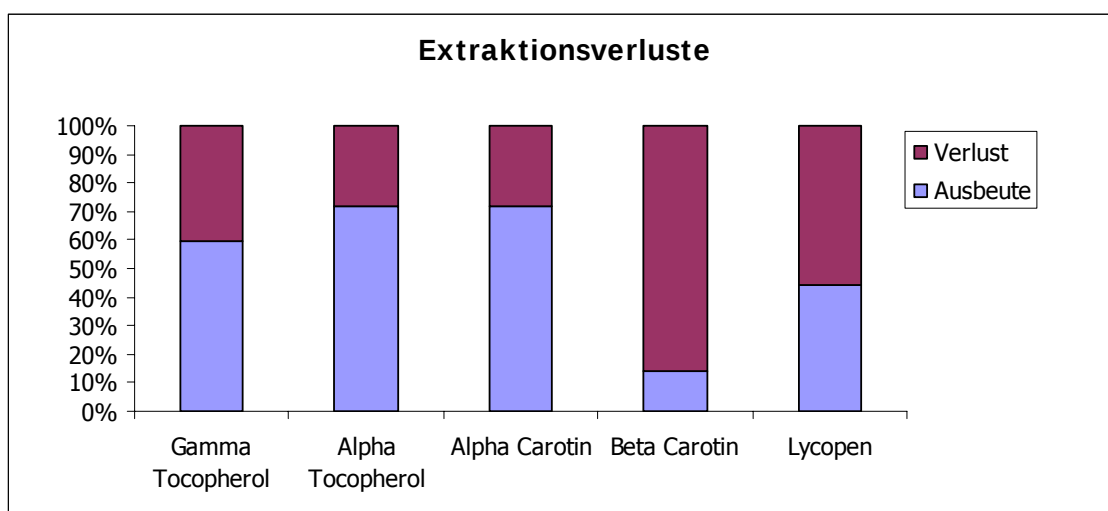


Abb. 17: Verluste durch Gefriertrocknen am wasserreichen Lebensmittel Penne Arrabiata

100%= Gehalte der tiefgefrorenen Probe, Ausbeute= Gehalt der gefriergetrockneten Probe

Tab. 13: Mittelwerte in $\mu\text{g}/100\text{g}$ der Gefriertrocknung und Tiefkühlung

$\mu\text{g}/100\text{g}$	γ -Tocopherol		α -Tocopherol		α -Carotin		β -Carotin		Lycopene	
GT	76,3	$\pm 2,54$	335	$\pm 8,3$	98,2	$\pm 3,93$	10,7	$\pm 1,62$	2207	± 172
TF	129	$\pm 19,3$	468	$\pm 11,26$	137	$\pm 13,26$	75,2	$\pm 8,53$	4979	± 138

TF: Tiefgefrorene Probe; GT: Gefriergetrocknete Probe

Fazit

Die gefriergetrockneten Proben wiesen hohe Verluste an allen analysierten Vitaminen gegenüber den tiefgefrorenen Proben auf. Bei β -Carotin machten die Verluste sogar bis zu 85,5% aus. Es ist daher nicht empfehlenswert, Lebensmittel, die einen hohen Wassergehalt haben, vor der Extraktion gefrierzutrocknen, da mit hohen Verlusten zu rechnen ist.

4.6. Schüttelversuch 1

Dieser Versuch sollte mögliche Unterschiede bei der Ausbeute an fettlöslichen Vitaminen aus Penne Arrabiata aufgrund verschieden langer Schütteldauer und Extraktionsdauer sowie aufgrund unterschiedlicher Temperatur aufzeigen. Die Proben wurden wie in Tab. 14 dargestellt behandelt, wobei als Lösungsmittelgemisch Dichlormethan/Methanol verwendet wurde.

Tab. 14: Schüttelversuch 1

Probe	Schütteldauer in Minuten	Extraktionsdauer in Stunden	Bedingungen
1	30	18	Kühlraum
2	30	2	Raumtemperatur
3	60	18	Kühlraum
4	120	18	Kühlraum

Die Bedingungen der Probe 1 entsprechen jenen der derzeit angewandten Methode.

Die Vitamin E- und Carotinoid-Gehalte von Probe 1 wurden mit den Analysewerten der anderen Proben verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Carotinoid- und Tocopherol-Gehalte von Probe 2 signifikant niedriger waren, als jene von Probe 1. Bei Lycopon unterschieden sich alle Proben signifikant voneinander. Probe 3 und 4 zeigten signifikant höhere Werte und Probe 2 signifikant niedrigere Lycopengehalte als Probe 1. Es konnte also festgestellt werden, dass eine 2-stündige Extraktion zu kurz ist (siehe Abb. 18). Die Signifikanzen beziehen sich auf die derzeit verwendete Methode am Department (Probe 1).

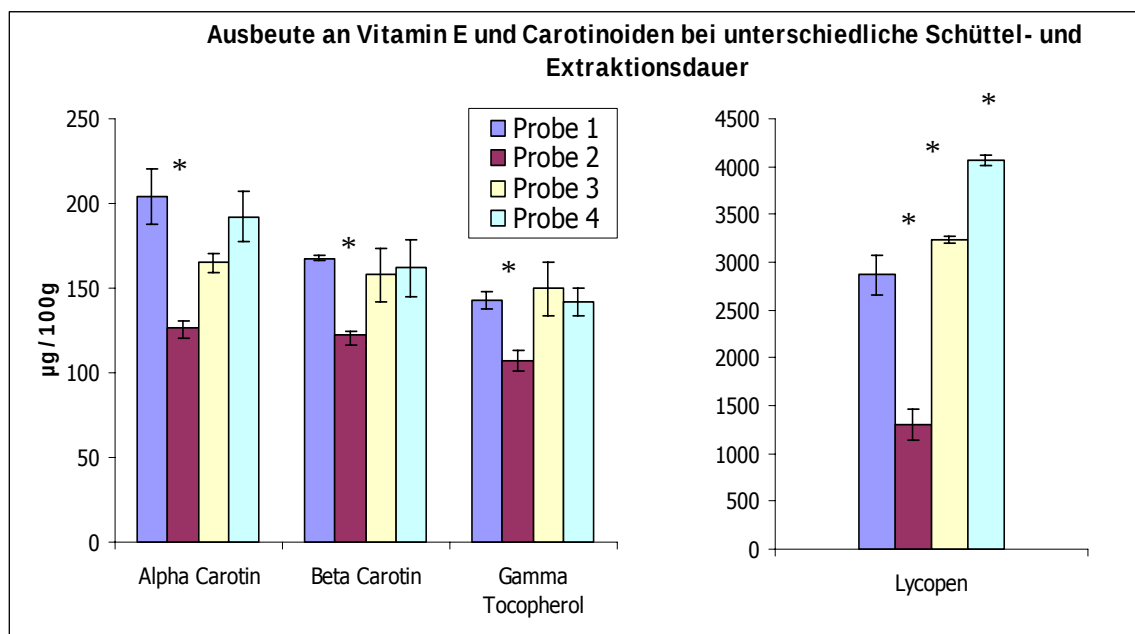


Abb. 18: Einfluss einer unterschiedlich langen Schüttel- und Extraktionsdauer auf die Carotinoid- und Vitamin E-Ausbeute im Vergleich zur derzeit am Department verwendeten Methode (Probe 1)

Die Verluste lagen bei Apo-8- β -Carotenoate zwischen 48 und 68,5%, für Tocol zwischen 35,3 und 42,3% (siehe Abb. 19).

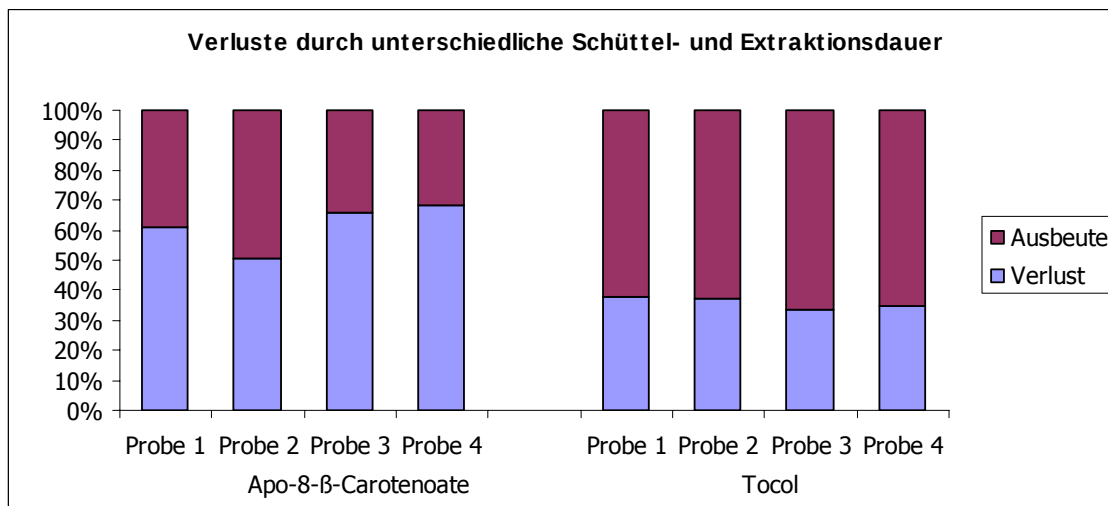


Abb. 19: Ausbeuten und Verluste in % bei unterschiedlicher Schüttel- und Extraktionsdauer

Tab. 15: Mittelwerte der Analysenwerte des internen Standards in $\mu\text{g}/100\text{g}$ bei unterschiedliche Schüttel- und Extraktionszeiten

$\mu\text{g}/100\text{g}$	Apo-8- β -Carotenoate		Tocol	
Probe 1	19,0		303	$\pm 17,1$
Probe 2	23,5	$\pm 3,50$	299	$\pm 21,9$
Probe 3	16,0		313	$\pm 2,1$
Probe 4	15,3	$\pm 0,6$	316	$\pm 7,1$

Fazit

Eine Extraktionsdauer von 2 Stunden erwies sich als zu kurz, um die im Lebensmittel enthaltenen Vitamin E- und Carotinoidgehalte vollständig zu extrahieren. Es zeigen sich keine signifikant höheren Ausbeuten, wenn die Lebensmittelprobe länger geschüttelt wurde. Daher ist eine Verlängerung der Schütteldauer, auf mehr als 30 Minuten nicht notwendig, wenn danach eine Extraktionsphase von 18 Stunden folgt. Die Verluste bei dieser Methode lagen zwischen 35,3 und 68,5%.

4.7. Schüttelversuch 2 an unterschiedlichen Lösungsmitteln

Bei diesem Versuch wurden die Lösungsmittelgemische Dichlormethan/Methanol und Chloroform/Methanol verwendet. Die Proben wurden jeweils 30 Minuten geschüttelt und dann 18 Stunden stehen gelassen bzw. 18 Stunden mit dem jeweiligen Extraktionsmittelgemisch geschüttelt (ohne zusätzliche Stehzeit).

4.7.1. Vergleich innerhalb der Lösungsmittel

Dichlormethan: Die β -Carotin- und Lycopren-Ausbeuten waren bei den Proben, welche nur 30 Minuten geschüttelt wurden signifikant niedriger als bei den Proben, welche für 18 Stunden geschüttelt wurden. Bei anderen Vitaminen gab es keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 20).

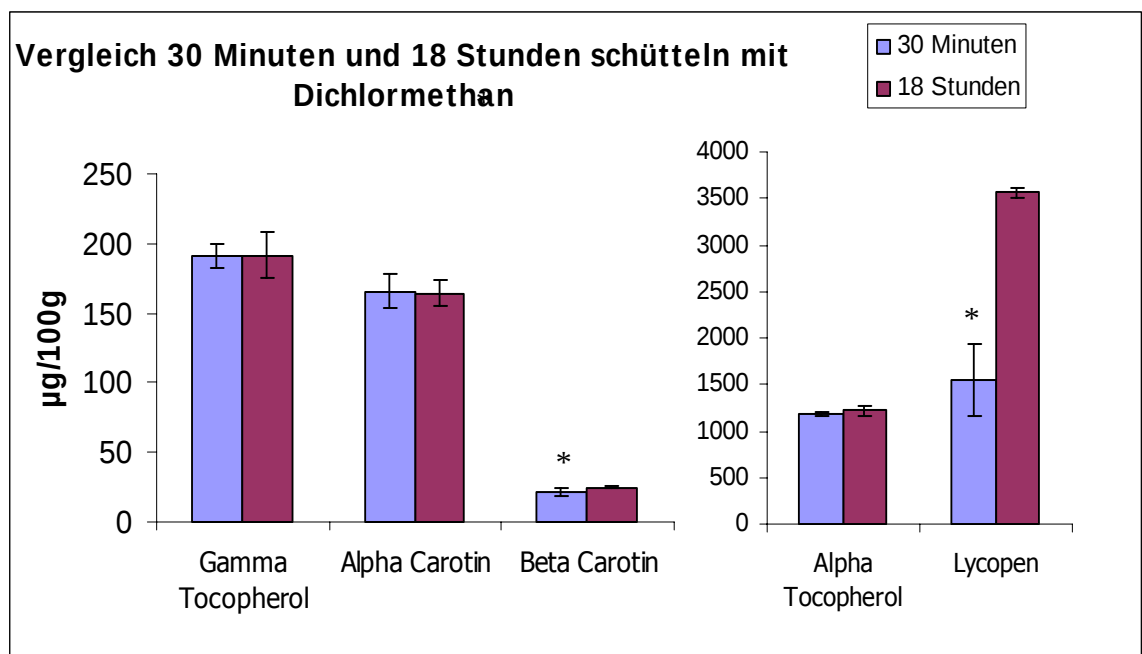


Abb. 20: Vitaminausbeuten bei unterschiedliche Schütteldauer mit Dichlormethan

Chloroform: Bei einer verringerten Schütteldauer von 30 Minuten waren die β -Carotin-Ausbeuten signifikant größer und γ -Tocopherol-Ausbeuten signifikant niedriger als bei einer langen Schütteldauer von 18 Stunden. (siehe Abb. 21).

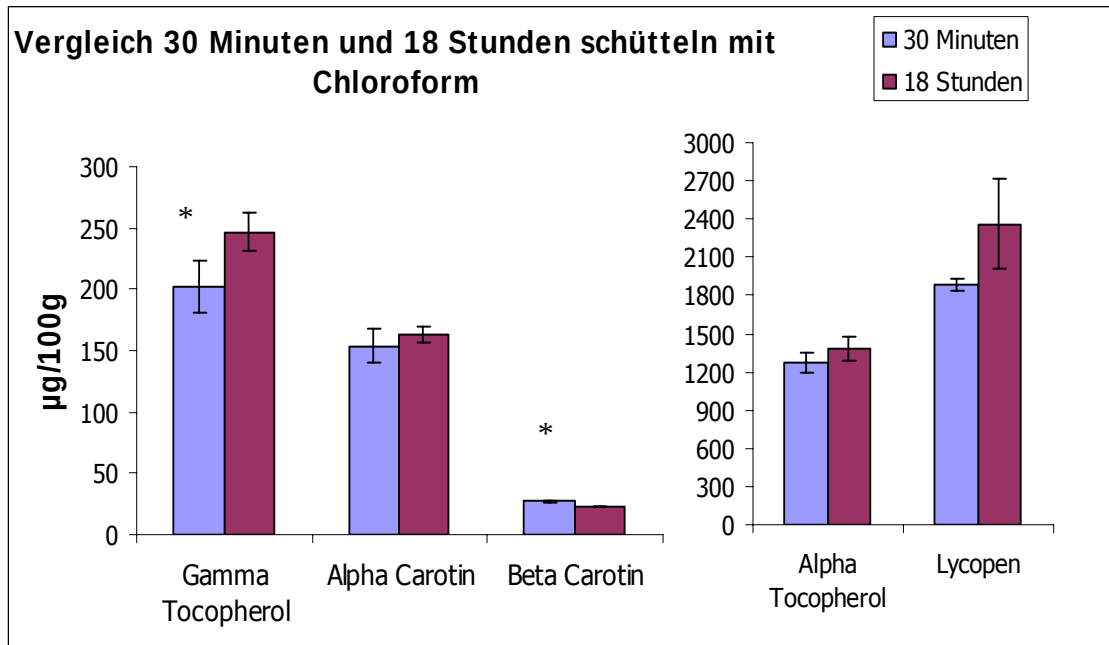


Abb. 21: Vitaminausbeuten bei unterschiedliche Schütteldauer mit Chloroform

4.7.2. Vergleich der Extraktionsmittel

18 Stunden schütteln: Chloroform löste γ - und α -Tocopherol signifikant besser, während Dichlormethan Lycoplen signifikant besser extrahierte (siehe Abb. 22).

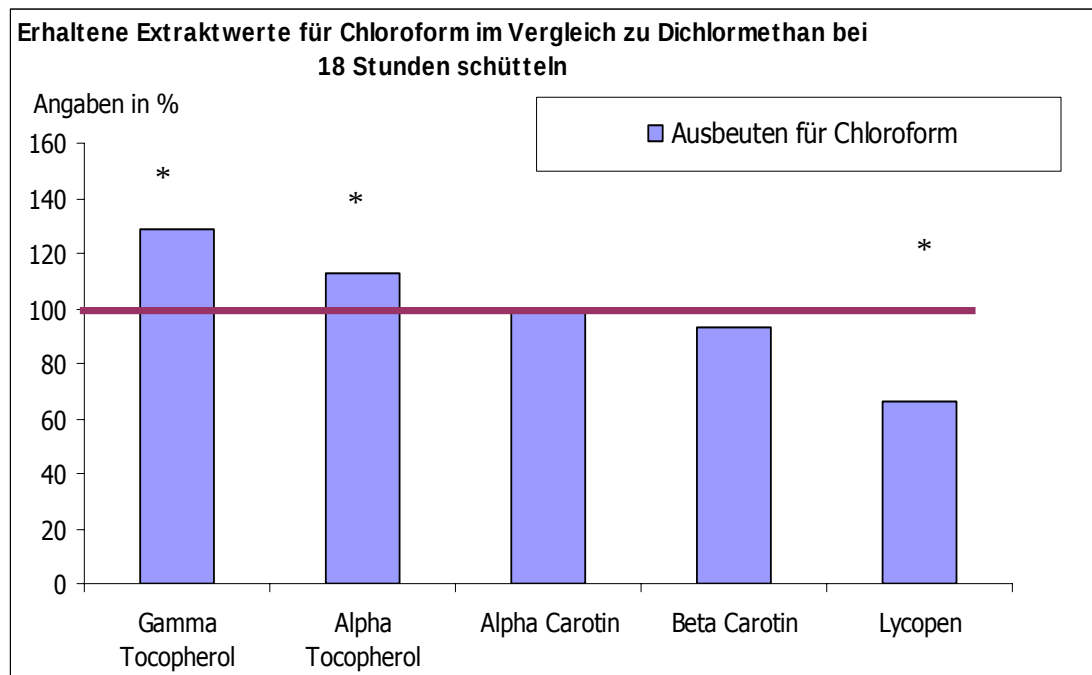


Abb. 22: Vitaminausbeuten durch Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel bei einer Schütteldauer von 18 Stunden. Dichlormethan wird als Linie in den Diagrammen als Vergleichswert zu den Chloroformwerten dargestellt. (Dichlormethanwerte = 100 % ; Linie)

30 Minuten schütteln und 18 Stunden extrahieren: Chloroform löste β -Carotin signifikant besser als Dichlormethan (siehe Abb. 23).

Ansonsten gab es keine signifikanten Unterschiede bei der Extraktionsfähigkeit der unterschiedlichen Lösungsmittel.

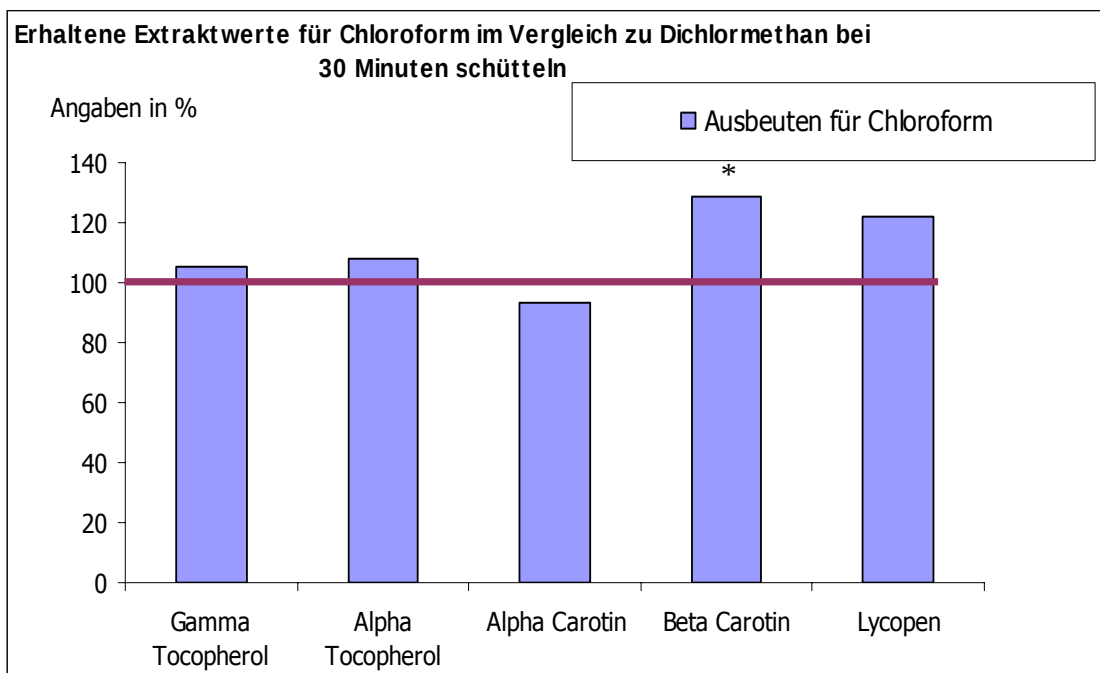


Abb. 23: Vitaminausbeuten durch Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel bei einer Schütteldauer von 30 Minuten. Dichlormethan wird als Linie in den Diagrammen als Vergleichswert zu den Chloroformwerten dargestellt. (Dichlormethanwerte = 100 %; Linie)

Fazit

Über einen Zeitraum von mehr als 30 Minuten zu schütteln ist nur dann nötig, wenn γ -Tocopherol oder Lycopon extrahiert werden sollen. Man kann aber bei der ursprünglichen Methode bleiben, die 30 Minuten schütteln und 18 Stunden Extraktion beinhaltet.

Bezüglich Dichlormethan und Chloroform war keine Aussage möglich, welches Lösungsmittel das quantitativ besser wirkende war. Dichlormethan konnte aber durchaus mit Chloroform konkurrieren, und lieferte teilweise sogar höhere Analysenwerte.

4.8. Versuch mit unterschiedlichen Natriumsulfatkonzentrationen

Für die etablierte Methode werden 10 g Natriumsulfat zum Trocknen des Extraktes verwendet (2 gehäufte Teelöffel) um möglicherweise noch vorhandenes Wasser aus dem Extrakt zu entfernen. Die unterschiedlichen Konzentrationen sollen aufzeigen, ob auch weniger Natriumsulfat ausreichen würde um das Restwasser zu entfernen. Es wird angenommen, dass durch die Filtration mit Natriumsulfat eine unbestimmte Analytenmenge (z.B. fettlösliche Vitamine) zurückgehalten wird und nicht in das endgültige Extrakt übergeht, wodurch es zu einem Fehler bei der Bestimmung des Analyten kommt. Bei diesem Versuch wurde die erste Filtercharge nachgespült, die 2. Charge hingegen nicht, um zu sehen ob Nachspülen des Filters zu einer höheren Ausbeute an Vitaminen im Extrakt führt.

4.8.1. Mit Nachspülen

Wenn kein Natriumsulfat verwendet wurde, zeigten sich bei β -Carotin, Lycoplen und α -Tocopherol signifikant höhere Ausbeuten als mit 10 g Natriumsulfat wie es bei der derzeitigen Methode verwendet wird. Kein Unterschied zeigte sich dagegen bei der Ausbeute von γ -Tocopherol. Dabei spielte die Konzentration an Natriumsulfat die verwendet wurde keine Rolle (siehe Abb. 24).

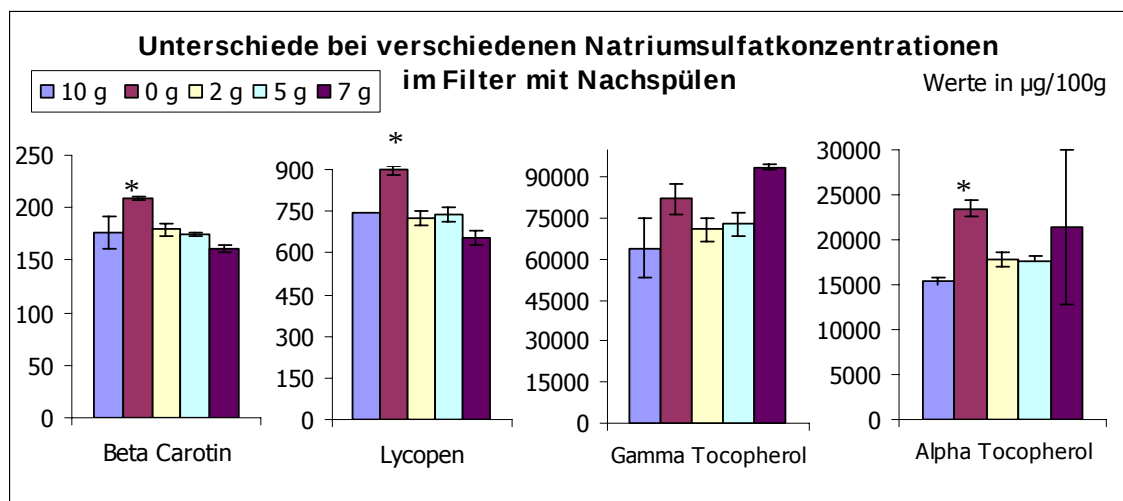


Abb. 24: Vitamin E- und Carotinoidkonzentrationen bei unterschiedlichen Natriumsulfatkonzentrationen mit Nachspülen

4.8.2. Ohne Nachspülen

Bei β -Carotin, Lycoplen, α - und γ -Tocopherol unterschied sich die etablierte Methode bei der 10 g Natriumsulfat verwendet wurden, von der Methode mit 0 g Natriumsulfat durch signifikant niedrigere Ausbeuten. Bei allen Vitaminen zeigte sich, dass mit steigender Natriumsulfatkonzentration im Filter die Ausbeute der gewünschten fettlöslichen Vitamine abnimmt (siehe Abb. 25).

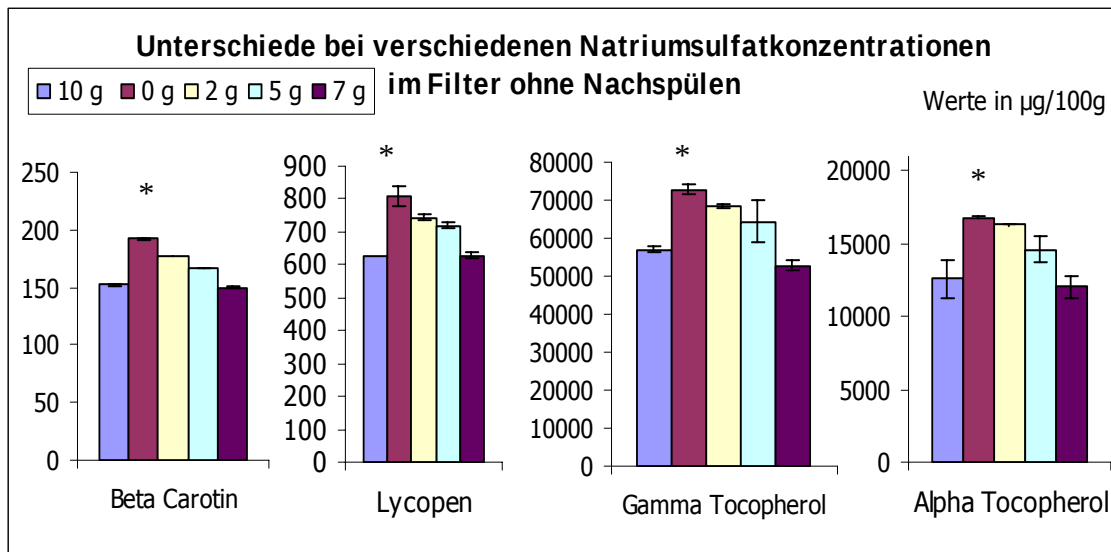


Abb. 25: Vitamin E- und Carotinoidkonzentrationen bei unterschiedlichen Natriumsulfatkonzentrationen ohne Nachspülen

Für Lycopren war es wichtig bei einer Natriumsulfatmenge von 10 g nachzuspülen, da ansonsten signifikant niedrigere Ausbeuten erhalten wurden. Allgemein kann für die Methode mit 10g Natriumsulfat gesagt werden, dass ohne Nachspülen die Vitamingehalte der Extrakte geringer waren (siehe Abb. 26).

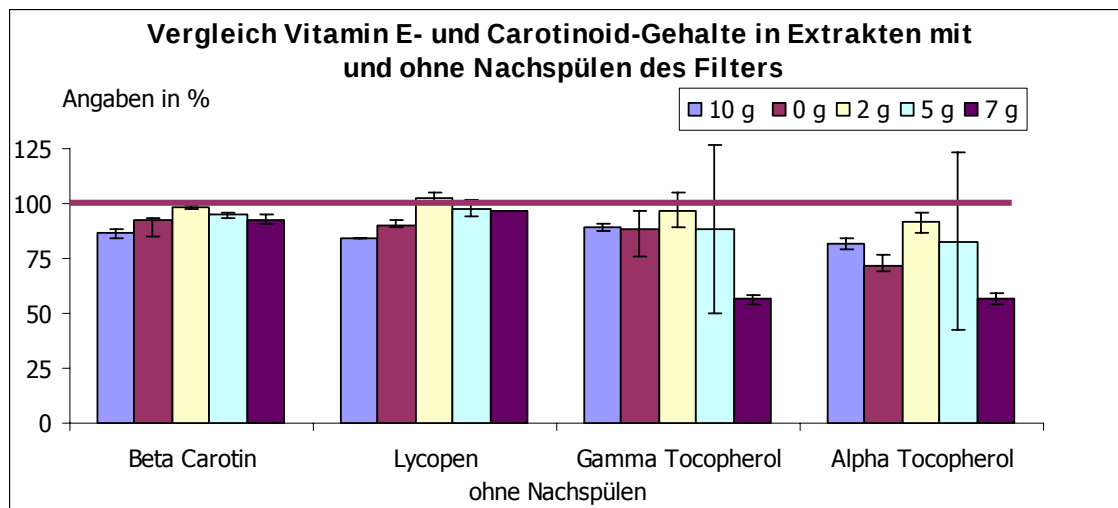


Abb. 26: Vergleich der Ausbeuten mit und ohne Nachspülen unterschiedlicher Natriumsulfatkonzentrationen. Die Werte „mit Nachspülen“ werden als 100 % mit der Linie gekennzeichnet.

Fazit

Aufgrund der Ergebnisse dieses Versuches lässt sich die Empfehlung ableiten ohne Natriumsulfat zu arbeiten um Vitaminverluste bei diesem Extraktionsschritt zu vermeiden, wodurch zusätzlich auch ein Filter eingespart wird.

Für die bestehende Methode am Department mit Verwendung von 10 g Natriumsulfat ist es außerdem sinnvoll den Filter sorgfältig zu spülen, da sich Vitamine im Natriumsulfat befinden und es somit zu Verlusten kommt.

4.9. Filterversuch 1

Dieser Versuch wurde mit Penne Arrabiata durchgeführt. Die Filter, die auch noch Lebensmittelreste (siehe 3.1.2.) enthielten, wurden für diesen Versuch verwendet. Durch nochmalige Zugabe des Lösungsmittels wurden eventuell enthaltene Vitaminrückstände aus den Filtern extrahiert. Dabei wurden Rückstände gefunden, die aber größtenteils keinen nennenswerten Anteil am erwarteten Gesamtextrakt ausmachten. Allerdings wurden für die Proben 1 und 2 von Apo-8- β -Carotenoate mehr als 10% des Gesamtgehaltes an Vitaminen im Filter gefunden. Bei Tocol lagen die Verluste durch den Filter gleichmäßig bei ca. 5 % unabhängig von der Extraktkonzentration. Für Tocol liegt die Filterausbeute zwischen 4,7 und 5,7% und bei Apo-8- β -Carotenoate zwischen 2,1 und 19,9% (siehe Abb. 27).

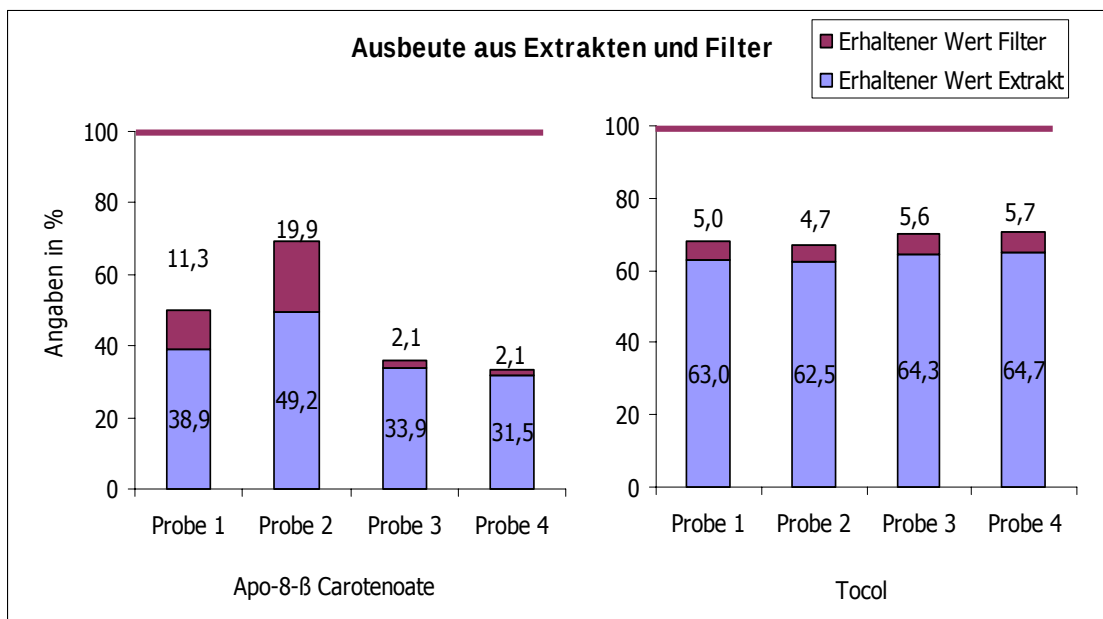


Abb. 27: Ausbeuten aus Extrakt und Filter. Die Linie entspricht dem Wert an internem Standard, der den Proben zugegeben wurde.

Probe 1: 30/18.... 30 Minuten schütteln, 18 Stunden extrahieren

Probe 2: 30/2.... 30 Minuten schütteln, 2 Stunden extrahieren

Probe 3: 60/18.... 60 Minuten schütteln, 18 Stunden extrahieren

Probe 4: 120/18.... 120 Minuten schütteln, 18 Stunden extrahieren

Fazit

Im 1. Filter blieben keine nennenswerten Rückstände, mit Ausnahme der Carotinoide, wo bei der derzeit verwendeten Methode (Probe 1) 11% Rückstand im Filter zu finden war.

4.10. Filterversuch 2 mit Natriumsulfat

Bei diesem Versuch wurde überprüft, welche mengen an fettlöslichen Vitaminen im Filter 2 (mit Natriumsulfat) zurückbleiben. Dabei wurde der Filter samt Inhalt nach dem Ablassen des Extraktes aus dem Scheidetrichter in frisches Lösungsmittel gegeben und extrahiert. So sollten eventuell zurückbleibende Vitaminmengen in den Natriumsulfat enthaltenen Filtern aufgezeigt werden. Weiters wurde untersucht, ob auch ohne das Natriumsulfat gearbeitet werden kann. Daher wurden Natriumsulfatmengen von 0 g bis 10 g gewählt. Wurde kein Natriumsulfat verwendet, waren die Vitaminverluste über den Filter geringer. Bei der aktuell verwendeten Methode (10 g) waren die Verluste am größten. Je mehr Natriumsulfat verwendet wurde, desto mehr Vitamine blieben im Filter zurück. Besonders starke Verluste wurden bei Beta Carotin gefunden, die Rückstände im Filter betrugen dabei zwischen 60 und 90% vom Gehalt im Extrakt. (siehe Abb. 28)

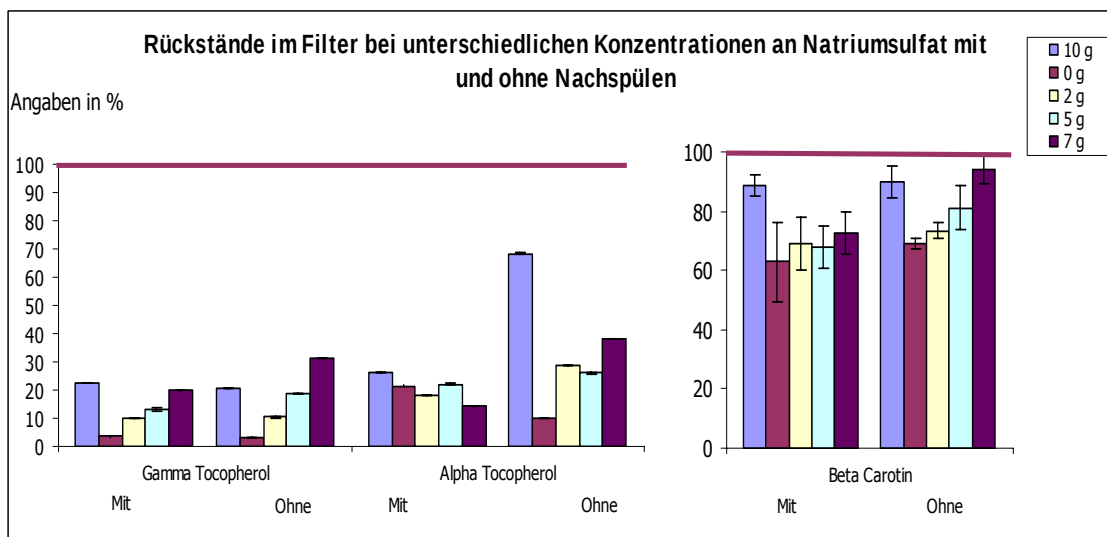


Abb. 28: Vergleich der Vitamingehalte im Filter mit und ohne Nachspülen von Natriumsulfat im Filterversuch 2. Mit 100 % (Linie) wurden die Extraktgehalte angegeben.

Fazit

Da die Rückstände an Vitamin E und Carotinoiden im Filter 2 teilweise beachtlich sind, ist es empfehlenswert ohne Natriumsulfat zu arbeiten, denn dann kann auf den zweiten Filter verzichtet werden. Besonders hohe Verluste waren bei β -Carotin zu finden (60-80%). Weniger Rückstand wurde im Filter ohne Natriumsulfat gefunden. Außer bei β -Carotin wurden trotz Nachspülen 63% des Analyten im Filter gefunden und sogar 69% ohne Nachspülen.

4.11. Diskussion

Die quantitative Extraktion von fettlöslichen Vitaminen ist entscheidend und sollte möglichst ohne Verluste durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte überprüft werden, ob es bei den verschiedenen Arbeitsschritten der derzeit am Department für Ernährungswissenschaften verwendeten Methode (Methode nach Folch et al. 1957) eventuelle Fehlerquellen gibt. Dazu wurden die einzelnen Arbeitsschritte eingehend untersucht, um diese eventuell vorhandenen Fehlerquellen sichtbar zu machen.

Gefriertrocknung ist eine Methode die während der Probenaufarbeitung häufig angewandt wird, um die Homogenität einer Lebensmittelprobe für verschiedene Untersuchungen zu garantieren. Die Ergebnisse aller Analysen waren sehr homogen und zeigten lediglich eine geringe Standardabweichung. Allerdings wurden durch das Gefriertrocknen bei allen ausgewählten Analyten (Carotinoide und Vitamin E) hohe Verluste erzielt. Diese Verluste betrugen für γ -Tocopherol 40%, für α -Tocopherol 29%, für α -Carotin 28%, für β -Carotin 86% und für Lycopon 56% im Vergleich zu den tiefgefrorenen Proben. Diese Ergebnisse bestätigte eine Studie, in welcher Tomaten gefriergetrocknet und frisch analysiert wurden. Die Lycopengehalte der gefriergetrockneten Probe waren um 33% bzw. 48% (Sorten abhängig) niedriger als jene der frischen Probe (Chang, 2006).

Die Ergebnisse der Lösungsmittelversuche von Penne Arrabiata und Jägerschnitzel ergaben, dass Hexan und Aceton vergleichbare Mengen an fettlöslichen Vitaminen extrahierten, nichtsdestoweniger lösten Dichlormethan, Chloroform und Diethylether Carotinoide und Tocopherole signifikant besser.

In einer Studie von McGraw (2008) wurden verschiedene Lösungsmittel verwendet um Carotinoide aus Geflügelplasma zu extrahieren. Dabei wurden sowohl Aceton, Hexan als auch Methanol als Extraktionsmittel verwendet. β -Carotin wurde durch Aceton und Hexan gleich gut gelöst, während Methanol keineswegs an diese Werte herankam (Mc Graw, 2008).

In der Literatur finden sich verschiedene Studien, die sich mit der Wiederfindungsrate für fettlösliche Vitamine beschäftigen. Valls et. al (2006) konnten die Wiederfindungsrate für α -Tocopherol, welche im Durchschnitt bei 93,6% lag, erhöhen, indem Pyrogallol als Antioxidant und sauerstofffreie Verbindungen zugesetzt wurden. Dadurch konnte die Oxidation von Tocopherol vermindert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden keine Antioxidantien während der Extraktion verwendet. Dies könnte eine Mitursache dafür sein, dass es teilweise zu relativ großen Vitaminverlusten kam. Die Wiederfindungsrate für Carotinoide lag bei Verwendung des Lösungsmittels Dichlormethan bei der Penne Arrabiata zwischen 61,5% und 78,7% für Carotinoide und zwischen 42,5% und 52,5% für Tocopherole. In einer Studie in der unterschiedliche Säulen als Festphasenextraktion für Carotinoide und Blattfarbstoffe in Pesto dienten, kam es zu unterschiedlichen Wiederfindungsraten, die zwischen 43% und 112% variierten (Masino, 2008). Es gibt also viele Einflüsse auf Vitaminverluste während der Extraktion, die von einer zur anderen Methode stark variieren können.

Pürierte Babynahrung wurde verseift und in Methanol gelöstes Butylhydroxitoluol hinzugefügt, anschließend mit Chloroform gerührt und zentrifugiert. Davon wurde ein Aliquot entnommen und zur Bestimmung verwendet. Bei dieser Methode wurden weder Filter noch Natriumsulfat verwendet. Zudem wurde BHT als Antioxidationsmittel zugesetzt. Die Wiederfindungsrate für β -Carotin lag zwischen 100,6 und 103,8 % (Humayoun Akhtar, 2008). Die Empfehlung, ohne Filter und Natriumsulfat zu extrahieren, könnte eventuell zu höheren Wiederfindungsraten führen, da die Filtergehalte mit Natriumsulfat in der vorliegenden Diplomarbeit bei 22,4 % für γ -Tocopherol und 26,2 % für α -Tocopherol lagen. Bei β -Carotin konnten sogar Gehalte von 89,0 % gefunden werden.

Mit dieser Diplomarbeit wurden Arbeitsschritte während der Probenvorbereitung und Extraktion identifiziert, bei denen es zu Vitaminverlusten kommt. Außerdem wurde eine Alternative zu dem derzeit verwendeten Lösungsmittel Chloroform gefunden. Als alternatives Lösungsmittel kann Dichlormethan verwendet werden. Dichlormethan löst ähnlich gut wie Chloroform und ist dabei nicht in

dem Ausmaß gesundheitsschädlich. Daher besteht für jene Person, die mit dem Lösungsmittel arbeitet, eine geringere gesundheitliche Gefahr.

Bei der derzeit verwendeten Extraktionsmethode können einzelne Arbeitsschritte angepasst werden, um die Vitaminverluste zu verringern oder zu vermeiden. So kann beispielsweise eine höhere Ausbeute an Lycoplen durch eine längere Schütteldauer erzielt werden. Außerdem ist es möglich ohne Natriumsulfat und somit auch ohne zweiten Filter zu arbeiten, wodurch einerseits Kosten gespart und andererseits Extraktionsverluste der fettlöslichen Analyten vermindert werden. Extraktionsverluste zu vermeiden ist wesentlich um die Richtigkeit der Methode zu gewährleisten und um den tatsächlichen Gehalt an Inhaltsstoffen, z.B. fettlöslichen Vitaminen eines Lebensmittels nicht zu unterschätzen.

5. SCHLUSSBETRACHTUNG

In der folgenden Abbildung werden alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kurz zusammengefasst.

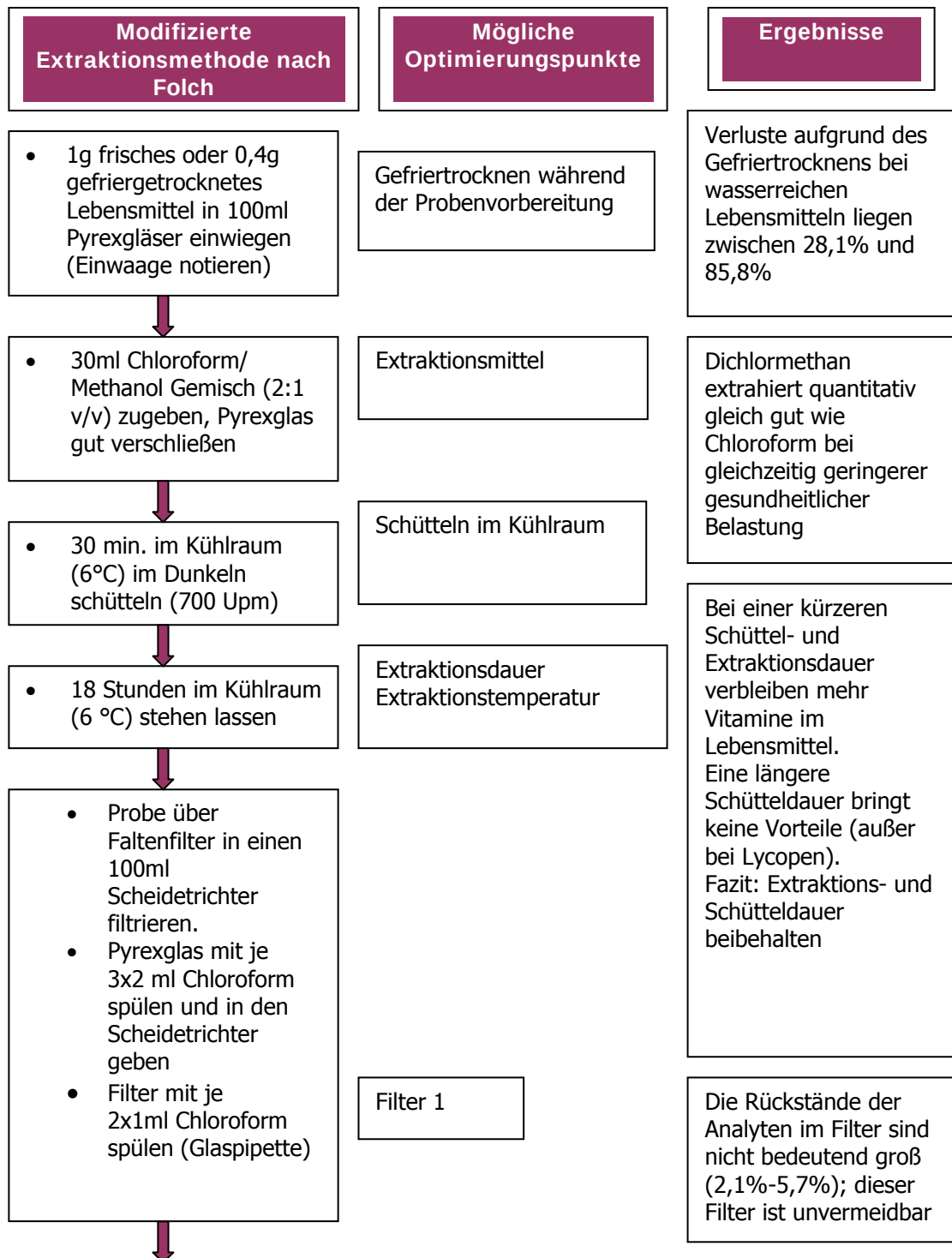


Abb. 29: Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Versuchsergebnisse

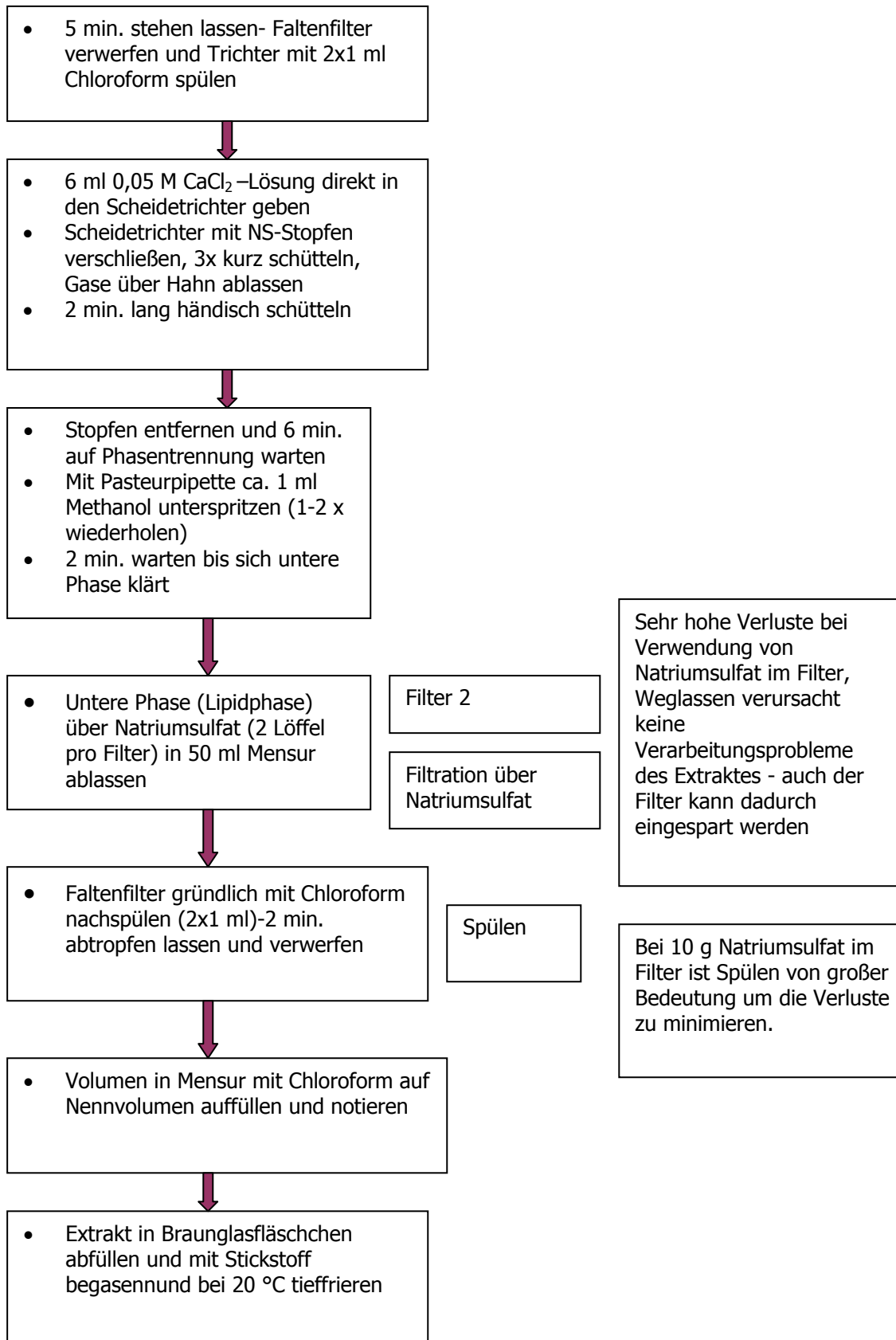


Abb. 29: Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Versuchsergebnisse (Fortsetzung)

6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde am Department für Ernährungswissenschaften der Universität Wien, die modifizierte Methode nach Folch zur Extraktion von fettlöslichen Vitaminen untersucht.

Dabei waren die einzelnen Extraktionsschritte Teil der Untersuchungen. Ebenfalls relevant war die gesundheitliche Gefährdung für den Menschen am Arbeitsplatz durch das Lösungsmittel Chloroform. Daher wurde versucht einen Ersatz für dieses Extraktionsmittel zu finden, welches aber dennoch quantitativ gleichwertige Ergebnisse liefern sollte.

Für die Versuche wurden 3 unterschiedliche Lebensmittel herangezogen. Die beiden Fertigprodukte Penne Arrabiata und Jägerschnitzel wurden laut Anleitung zubereitet, homogenisiert, portioniert und danach tiefgefroren. Die einzelnen Portionen wurden aufgetaut und danach nochmals homogenisiert. Als drittes Lebensmittel wurde Maiskeimöl verwendet.

Die Überprüfung der einzelnen Extraktionsschritte ergab, dass es zu Extraktionsverlusten bei den Carotinoiden und bei den Tocopherolen kam. Gefriertrocknen zur Probenvorbereitung des Lebensmittels, zeigte für wasserreiche Lebensmittel, dass es zu hohen Verlusten an Carotinoiden und Vitamin E kam. Bei β -Carotin waren die Verluste im Vergleich zur tiefgefrorenen Probe besonders groß.

Die Schütteldauer für die Methode betrug 30 Minuten und danach folgte eine Extraktionszeit von 18 Stunden im Kühlraum. Wurde nur 2 Stunden extrahiert, wurde zu wenig aus dem Lebensmittel herausgelöst. Außer für Lycopene, war eine längere Schüttelzeit nicht notwendig. Rückstände im Filter 1 (Filtration des Extraktes mit Probe) konnten nicht vermieden werden. Mengenmäßig viel bedeutender waren dagegen die Vitaminverluste im Filter mit Natriumsulfat. Weniger Rückstände enthielt der Filter ohne Natriumsulfat.

Diese Arbeit zeigte, dass während der Extraktion hohe Vitaminverluste entstehen, die bei den analysierten Werten zu berücksichtigen wären. Außerdem wurde Dichlormethan als Ersatz für das Lösungsmittel Chloroform gefunden.

7. SUMMARY

Within the present diploma thesis the modified method of Folch et al. (1957) for the extraction of fat soluble vitamins at the Department of Nutritional Sciences of the University of Vienna was reevaluated. The individual extraction steps were part of the investigations. Similarly relevant was the endangerment for humans by the solvent chloroform. Therefore replacement for this extracting agent was sought, which exhibits quantitatively equivalent results.

For these attempts different foods were used. The two ready meals "Penne Arrabiata" and "Jägerschnitzel" were prepared according to the instructions, homogenized, portioned and afterwards frozen.

Results of individual extraction steps resulted in extraction losses for carotenoids and tocopherols. Freeze drying for sample preparation showed high losses of vitamins for water-rich food. For β -carotene the loss by freeze-drying was very high in comparison to the frozen sample.

The vibration duration for the method amounts 30 minutes and was followed by an extraction time of 18 hours in the refrigerating chamber. Extraction time of only 2 hours at room temperature was not sufficient. Except for Lycopene, a higher vibration duration for samples was not necessary. Arrears in filter 1 (filtration step of food sample) were not to be avoided but they were not that high. More important were the losses of vitamins in the second filter (filtration of extract with sodium sulfate). Less arrears were recognized in the filter without sodium sulfate.

This work showed that during food extraction high amounts of vitamins were lost. In addition, methylene chloride was found as a replacement for the solvent chloroform.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Ake M, Fabre H, Malan A K; Mandrou B. (1998). "Column liquid chromatography determination of vitamins A and E in powdered milk and local flour: A validation procedure." *Journal of Chromatography A* 826(2): 183-189.

Ames S R. (1972). "5. Occurance in foods. The Vitamin. Chemistry, Physiology, Pathology, Methods." Academic Press, New York 5(2): 233.

Ball G F M. (2006). "Vitamins in Foods. Analysis, Bioavailability, and Stability." Taylor and Francis Group.

Biesalski H K, Schrezenmeir J, Weber P, Weiß H. (1997). "Vitamine. Physiologie, Pathophysiologie, Therapie." Thieme Verlag, Stuttgart.

Breithaupt D E, Schwack W. (2000). "Determination of free and bound carotenoids in paprika (*Capsicum annuum* L.) by LC/MS." *European Food Research Technology* (211): 52-55.

Chang C-H, Lin H-Y, Chang C-Y, Liu Y-C. (2006). "Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes." *Journal of Food Engineering* (77): 478-485.

Deutsche Forschungsgemeinschaft. (o.J.). "Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten." Wiley-VCH, Weinheim.

Donninger R, Vorbach U. (o.J.). "Lösungsmittel. 284 Schriftenreihe des Wirtschaftsförderinstituts." WIFI Österreich.

ECETOC-Statement-No.3. (1986). "Current Results from industry-sponsored research into species differences in the toxicology of methylene chloride." European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, Brussels, Ave Louise 250, B.63.

Elmadfa I, Leitzman C. (1998). "Ernährung des Menschen." Ulmer, Stuttgart, 3.Auflage: 289-290.

Fish W W, Perkins-Veazie P, Collins J K. (2002). "A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents." *Journal of Food Composition and Analysis* 15(3): 309-317.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley G H. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." *Journal of Biological Chemistry* 226(1): 497-509.

Gama P, Casal S, Oliveira B, Ferreira M A. (2000). "Development of an HPLC/diode-array/fluorimetric detector method for monitoring tocopherols and tocotrienols in edible oils." *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 23(19): 3011-3022.

Harris D C. (1998). "Lehrbuch der quantitativen Analyse." Vieweg, Braunschweig Wiesbaden.

Hart D J, Scott K J. (1995). "Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK." *Food Chemistry* 54(1): 101-111.

Hewavitharana A K, Van Brakel A S, Harnett M. (1996). "Simultaneous liquid chromatographic determination of vitamins A, E and β -carotene in common dairy foods." *International Dairy Journal* 6(6): 613-624.

Howard L A, Wong A D, Perry A K, Klein B P. (1999). " β -Carotene and Ascorbic Acid Retention in Fresh and Processed Vegetables." *Journal of Food Science* 64(5): 929-936.

Humayoun Akhtar M, Bryan M. (2008). "Extraction and quantification of major carotenoids in processed foods and supplements by liquid chromatography." *Food Chemistry* 111(1): 255-261.

Isler O, Brubacher G. (1982). "Vitamine I. Fettlösliche Vitamine." Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Kaur D, Wani A A, Oberoi D P S, Sogi D S. (2008). "Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology." *Food Chemistry* 108(2): 711-718.

Lee C Y M, McCoon P E, LeBowitz J M. (1981). "Vitamin A Value of sweet corn." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29: 1294.

Masino F, Ulrici A, Antonelli A. (2008). "Extraction and quantification of main pigments in pesto sauces." *European Food Research and Technology* 226(3): 569-575.

Mathiasson L, Turner C, Beg H, Dahlberg L, Theobald A, Anklam E, Ginn R, Sharman M, Ulberth F, Gabernig R. (2002). "Development of methods for the determination of vitamins A, E and β -carotene in processed foods based on supercritical fluid extraction: A collaborative study." *Food Additives and Contaminants* 19(7): 632-646.

McGraw K J, Tourville E A, Butler M W. (2008). "A quantitative comparison of the commonly used methods for extracting carotenoids from avian plasma." *Behavioral Ecology and Sociobiology*: 1-12.

Otto M. (2000). "Analytische Chemie." Wiley-VCH Weinheim, 2.Auflage.

Reichardt W, Gernand E. (2003). "Erhebungen zur Fettsäurezusammensetzung von Rückenfett bei Thüringer Schweinen sowie zum Fett von Thüringer Knackwürsten aus den Einzelheiten." Archiv Tierzucht 46(3): 257-267.

Rodriguez-Amaya D B. (2000). "Some considerations in generating carotenoid data for food composition tables." Journal of Food Composition and Analysis (13): 641.

Roldàn-Gutiérrez J M, Dolores Luque de Castro M. (2007). "Lycopene: The need for better methods for characterization and determination." Trends in Analytical Chemistry 26(2): 163-170.

Roth, L. (2008). "Chemie-Ratgeber Sicherheitsdaten MAK-Werte." 23. Ergänzungslieferung.

Sa de M C, Rodriguez-Amaya D B. (2004). "Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables - Comparison of analytical and calculated data." Journal of Food Composition and Analysis 17(1): 37-51.

Sattler K. (1988). "Thermische Trennverfahren. Grundlagen, Auslegung, Apparate." VCH, Weinheim, S. 395 ff.

Schwedt G. (1995). "Analytische Chemie. Grundlagen, Methoden und Praxis." Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Tan B. (1988). "Analytical and preparative chromatography of tomato paste carotenoids." Journal of Food Science (53): 954.

The-Merck-Index. (2006). "The Merck Index. An Enzyklopedia of chemicals, drugs, and biologicals." Merck & Co, Whitehouse Station.

Valls F, Fernandez-Muino M A, Checa M A, Sancho-Ortiz M T. (2007). "Determination of vitamins A and E in cooked sausages." European Food Research and Technology (226): 181-185.

Vauck W R A, Müller H A. (2000). "Grundoperationen chemischer Verfahrenstechnik." Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Stuttgart, 11. Auflage, S. 771 ff.

Curriculum Vitae

Name: Marlies Wallner
Staatsangehörigkeit: Österreich
Geburtsdatum: geb. 22.07.1983 in Prenning/Österreich
Eltern: Edith Maria Wallner, Landwirtin
Vater Franz Wallner, verstorben

Ausbildung:

2003-2009	Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien Schwerpunkt „Ernährung und Umwelt“
1999-2003	Private Höhere Lehranstalt für Land- und Ernährungswirtschaft in Graz-Eggenberg/Steiermark
1997-1999	Landwirtschaftliche Hauswirtschaftsschule Grabnerhof in Admont/Steiermark
1993-1997	Peter-Tunner-Hauptschule in Deutschfeistritz/Steiermark
1989-1993	Volksschule in Waldstein/Steiermark

Arbeitserfahrungen und Praktika

September 2008 bis	
März 2009	Lebensmittelanalytisches Laborpraktikum bei der Firma Hengstenberg in Esslingen am Neckar(D)
Jänner 2008	Praktikum im Bereich der klinischen Ernährung, Mitarbeit beim europaweiten Nutrition Day
Oktober 2007	Laborpraktikum am Hygiene Institut in Wien, Abteilung Lebensmittelhygiene
Juli-August 2007	Laborpraktikum bei der Firma Roche Diagnostics Graz GmbH in Graz, Abteilung Reagenzien Entwicklung