

Institut für anorganische Chemie
der Universität Hannover

Oxidation von Lebensmittelinhaltsstoffen – Untersuchungen
mit Hilfe der Clark-Meßzelle

Staatsexamensarbeit

im Rahmen der wissenschaftlichen Prüfung für das Lehramt an
Gymnasien im Fach Chemie

vorgelegt von

Marco Nicolai

Matrikel-Nr.: 1320954

Prüfungs-Nr.: 7129

unter der Leitung von AOR Manfred Jäckel

Hannover, im Juli 1995

Inhalt

1. Einleitung.	4
Verwendete Abkürzungen und Symbole	6
2. Grundlagen: Meßtechnik und biochemische Vorgänge	7
2.1 Sauerstoffmessung und Ascorbinsäurebestimmung	7
2.1.1 Sauerstofflöslichkeit in Wasser	7
2.1.2 WINKLER-Methode	9
2.1.3 Membranbedeckter Sensor nach CLARK.	10
2.1.4 Quantitative Bestimmung von Ascorbinsäure	13
2.2 Enzymatische Bräunung	17
2.2.1 Der Ablauf der enzymatischen Bräunung und die beteiligten Enzyme	18
2.2.2 Substrate in Apfelsäften.	20
2.2.3 Weitere Substrate für PPO	21
2.2.4 Temperatur- und pH-Einflüsse	22
2.2.5 Aussehen und Geschmack	23
2.2.6 Verhinderung der enzymatischen Bräunung.	23
2.2.7 "Ascorbinsäurebräunung" / MAILLARD-Reaktion	26
2.3 Oxidation von Vitamin C und damit verbundener Sauerstoffverbrauch	27
2.4 Fettoxidation.	29
2.4.1 Radikalkettenreaktion	29
2.4.2 Aromafehler	30
2.4.3 Reaktionen während der Induktionsperiode.	31
2.4.4 Methoden zur Verlängerung der Haltbarkeitszeit von fetthaltigen Lebensmitteln	33
2.5 Andere Ursachen für einen Sauerstoffverbrauch von Lebensmitteln.	35
3. Material und Arbeitstechniken	37
3.1 Die Sauerstoffmeßgeräte.	37
3.2 Versuchsaufbauten.	38

3.3 Arbeitstechniken unter Luftausschluß	43
3.3.1 Aufarbeitung der Proben	43
3.3.2 Befüllen der Apparaturen	45
3.4 Sauerstofflöslichkeit in den verwendeten Medien	48
3.5 Sauerstoffverbrauch der Meßzelle	52
3.6 Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs eines Fruchtsaftes	53
3.7 Reagenzien und Geräte	54
4. Ergebnisse und Diskussion.	58
Exkurs: Auswahl der Äpfel	58
4.1 Sauerstoffverbrauch von Apfelsaft.	62
4.1.1 Zusammenhang zwischen Bräunung und Sauerstoffverbrauch.	62
4.1.2 Beziehung zwischen Verbrauchsgeschwindig- keit und Sauerstoffkonzentration	65
4.1.3 Einfluß von Inhibitoren und Temperatureffekte	69
4.1.4 Gehaltsabschätzung von PPO in Apfelsaft mit Hilfe von Natriumdiethylcarbaminat (DDTC)	72
4.1.5 Einfluß von Mikroorganismen	73
4.2 Einfluß von Antioxidationsmitteln im Modellversuch	75
4.3 Sauerstoffverbrauch von Tomatensaft	81
4.4 Sauerstoffverbrauch von Salatgurkensaft	84
4.5 Zwei Biosensoren	85
4.5.1 Die "Bananatrode"	86
4.5.2 Ein Biosensor für Ascorbinsäure auf der Basis von Gurkensaft	89
4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse	95
5. Abschließende Betrachtungen	97
Verwendete Literatur	99
Anhang (Packungsbeilagen von Fertigtestsystemen, Dopamin-Ampullen und einem Enzym-Präparat)	103

1. Einleitung

Fast jeder Endverbraucher hat eine Meinung zu Lebensmittelzusatzstoffen, der eine kauft kein Lebensmittel, das diese Stoffe enthält, der andere toleriert alles, was Lebensmittel den Sinnen attraktiv erscheinen läßt. Lebensmittelhersteller kommen ihrer Kennzeichnungspflicht in den Verbraucher manipulierender Weise nach, indem sie - je nachdem, was verkaufsfördernder erscheint - verschiedene Bezeichnungen verwenden (Vitamin C oder E 300; Phosphorsäure oder E 338).

In dieser zeitlos populären Diskussion spielt ein Aspekt nur eine untergeordnete Rolle: welche Veränderungen laufen in Lebensmitteln ab, wenn auf Zusatzstoffe vollständig verzichtet wird? Aus der Masse der Einflüsse, die Veränderungen in Lebensmitteln hervorrufen, soll hier der Sauerstoff herausgegriffen und näher untersucht werden. Was geschieht zum Beispiel in dem Stück Obst oder dem aufbackbaren Brötchen, wenn sie Luft und damit Sauerstoff ausgesetzt werden, und welche Faktoren beeinflussen diese Prozesse?

Das Braunwerden von Obst und Gemüse, das Ranzigwerden von Butter und anderen Fetten sowie Vitaminverluste sind Vorgänge, die uns im Alltag immer wieder begegnen. Auch wenn diese Erscheinungen nicht immer sichtbar werden bzw. geruchlich oder geschmacklich wahrzunehmen sind, so zeigen zumindest Vakuum- oder Schutzgasverpackungen und Packungsaufdrucke wie "mit Antioxidationsmittel E 220"* , daß Sauerstoff einen Einfluß auf Lebensmittel haben kann. Von welcher Bedeutung beispielweise die Farbe des Lebensmittels für den Endverbraucher und damit auch für den Lebensmitteltechniker ist, zeigt die Beschäftigung mit diesem Aspekt sogar in der fachfremden Öffentlichkeit:

"Braun werdendes Obst bald Vergangenheit?"

Sydney. Braun werdende Äpfel und Birnen könnten schon bald der Vergangenheit angehören. Australische Forscher haben das Gen isoliert, das zur Verfärbung von Obst und Gemüse führt, wenn das Fruchtfleisch mit Sauerstoff in Berührung kommt. Die Wissenschaftler haben ein Gegen-Gen entwickelt." (Neue Presse, 12.1.1995)

* Schwefeldioxid

Hier ist es nun interessant, sich nicht mit der Einsicht zufrieden zu geben, daß ein Lebensmittel Sauerstoff verbraucht und dieser Verbrauch verhindert werden kann, sondern über quantitative Oxidationsmessungen auch den Reaktionsmechanismus genauer zu beleuchten. Anhand möglichst einfacher Verfahren, die modifiziert auch im Schulunterricht Verwendung finden könnten, sollen anfangs Lebensmittel, deren oxidative Beeinflussung optisch leicht festzustellen ist (hier: Äpfel) untersucht werden. Im Unterschied zu in der Literatur zu findenden Schulversuchen, die sich auf die reine Beobachtung des Bräunungsprozesses (auch unter Verwendung von Zusatzstoffen wie Ascorbinsäure) beschränken [10, S.55; 36, S.110-118 und 37, S.190-205], ermöglichen die beschriebenen quantitativ arbeitenden Methoden ein weitergehendes Verständnis der biochemischen Vorgänge. Faktoren sind Sauerstoffverbrauch sowie Veränderung desselben unter Verwendung von Zusatzstoffen und physikalischen Einflüssen, sowie die damit einhergehenden Änderungen einfach zu messender Parameter des Lebensmittels. Gerade die Versuchsergebnisse unter Verwendung von Zusatzstoffen lassen dabei begründete Rückschlüsse auf die Vorgänge unter "normalen Bedingungen" zu.

Weil die einfache Messung des Sauerstoffverbrauchs nur indirekt einen Einblick in die Vorgänge in Lebensmitteln gibt, müssen Verfahren entwickelt werden, die Aussagen über den Oxidationsprozeß von Inhaltsstoffen wie Enzymen und Substraten erlauben.

In der vorliegenden Arbeit wurde der zeitliche Verlauf der Sauerstoffkonzentration (mit Hilfe der CLARK-Meßzelle) in Saft/Wasser-Mischungen von Äpfeln, Tomaten und Gurken untersucht. Ergänzend hierzu wurden photometrische Messungen der Bräunung oder Ascorbinsäurebestimmungen vorgenommen.

Verwendete Abkürzungen und Symbole:

a	Aktivität
α	Bunsenscher Absorptionskoeffizient
AS	Ascorbinsäure
b	Blindwert
c	Konzentration
c_s	Sättigungskonzentration
d_N	NERNSTsche Diffusionsschicht
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol Natriumsalz-Dihydrat
DDTC	Natriumdiethyldithiocarbaminat-Trihydrat
DHAS	Dehydroascorbinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (Titrplex III)
f	Aktivitätskoeffizient
F	Faradaykonstante
F (DCPIP)	Titer der DCPIP-Lösung
I_D	Diffusionsgrenzstrom
M	Molmasse
n_D	Diffusion durch eine Membran
p	Druck
p_0	Normaldruck
P_M	Permeabilität einer Membran
PPO	Polyphenoloxidasen
Prot.	Protein
s	Sättigungsindex
U_{POL}	Polarisationsspannung
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
x	Molenbruch
$V_{0,m}$	Molvolumen
z	Anzahl der Elektronen (NERNSTsche Gleichung)

2. Grundlagen: Meßtechnik und biochemische Vorgänge

Die Enzymatische Bräunung, Vitamin C-Oxidation und die Auto- und Photooxidation von Fetten sind die häufigsten Ursachen für den Sauerstoffverbrauch von Lebensmitteln. Dabei ist eine Oxidation eines Lebensmittels nicht immer mit dem Verderb gleichzusetzen, da viele Lebensmittel erst ihren charakteristischen Geschmack durch den Einfluß von Sauerstoff erhalten. Ist eine Reaktion mit Sauerstoff nicht oder nur zum Teil erwünscht, so gibt es einige Möglichkeiten zur Steuerung der, bei der Oxidation von Lebensmitteln, auftretenden Vorgänge. Daneben werden die - in dieser Arbeit angewandten - Meßtechniken für die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs näher erläutert.

2.1 Sauerstoffmessung und Ascorbinsäurebestimmung

Die CLARK-Elektrode und die maßanalytische Methode nach WINKLER sind die gängigsten Meßtechniken zur Bestimmung gelösten Sauerstoffs. Zur Ascorbinsäurebestimmung sind unterschiedliche Methoden bekannt.

2.1.1 Sauerstofflöslichkeit in Wasser

Kommt sauerstofffreies Wasser mit Luft in Berührung, so geht Sauerstoff neben anderen Gasen in Lösung. Es bildet sich bei Luftsättigung ein Gleichgewichtszustand, bei dem die Aktivität* des gelösten Sauerstoffs dem Sauerstoffpartialdruck der darüberstehenden Atmosphäre entspricht. Unter der Annahme, daß sich Luft bei den zu betrachtenden Druck- und Temperaturverhältnissen ideal verhält und der Sauerstoffpartialdruck der Luft proportional zur Sauerstoffaktivität in diesem Gasgemisch ist, gilt

$$1 \quad p(\text{O}_2, \text{Luft}) \sim a(\text{O}_2, \text{Luft})$$

und damit

$$2 \quad a(\text{O}_2, \text{Luft}) = a(\text{O}_2, \text{Wasser})$$

für das Gleichgewicht. Da für dieses System die Sauerstoffaktivität im Wasser durch den O₂-Partialdruck der Luft bestimmt wird, ist er druckabhängig.

$$3 \quad p(\text{O}_2) = x(\text{O}_2, \text{Luft}) \cdot p(\text{Luft})$$

* In [14 und 18] wird konsequent der Begriff Partialdruck für gelösten Sauerstoff verwendet, $p(\text{O}_2, \text{Luft}) = p(\text{O}_2, \text{Wasser})$ für den Gleichgewichtszustand.

Bei Gleichgewicht zwischen Atmosphäre und Wasser folgt unter Berücksichtigung des Wasserdampfdrucks

$$4 \quad p'(O_2) = x(O_2) \cdot (p(\text{Luft}) - p(\text{Wasserdampf}))$$

Weil der Wasserdampfdruck mit steigender Temperatur zunimmt*, wird der Sauerstoffpartialdruck von Luft sinken. Da die Löslichkeit für Sauerstoff in Wasser ebenfalls temperaturabhängig ist, kommt es zu einer Mischung dieser beiden Effekte. Die Aktivität von Sauerstoff wird mit steigender Temperatur im Gleichgewichtszustand abnehmen.

Die Sauerstofflöslichkeit ist bei konstantem p und T noch von den Eigenschaften des Lösungsmittels abhängig, während die Sättigungsaktivität unter den gleichen Bedingungen eine Konstante darstellt. Damit wird eine Sauerstoff-Sättigungsaktivität in Lösung von dem O_2 -Partialdruck der Luft vorgegeben, und es stellt sich eine lösungsmittelabhängige O_2 -Sättigungskonzentration im Gleichgewicht mit Luft ein. Die Beziehung zwischen Aktivität und Sauerstoffsättigungskonzentration (c_s) wird durch Gleichung 5 beschrieben.

$$5 \quad c_s(T) = \frac{a(O_2)}{p_0} \cdot \alpha(T) \cdot \frac{M(O_2)}{V_{0,n}}$$

Die Sauerstoffsättigungskonzentration bei unterschiedlichen Druck- und Temperaturbedingungen kann allerdings nicht berechnet, sondern muß experimentell bestimmt werden [14, S.9]. In der Regel wird sie für Temperaturen von 0 - 40 °C (bei Normaldruck) angegeben (O_2 -Sättigungstabellen [14, S.13-15]). Eine Druckkorrektur für den herrschenden Luftdruck erfolgt dann nach Gleichung 6.

$$6 \quad c_s(p(\text{Luft})) = c_s(p_0) \cdot \frac{p(\text{Luft})}{p_0}$$

In der Praxis steht Wasser nicht immer mit Luft im Gleichgewicht. So können über- und ungesättigte Wässer auch in Kontakt mit Luft recht stabil sein. Daher sind O_2 -Konzen-

* Streng genommen gilt dies auch für $p(\text{Luft})$ für ein abgeschlossenes System. Dies kann jedoch durch eine kleine Bohrung im Gefäß umgangen werden, damit bleibt die Luft wasserdampfgesättigt, der Gesamtdruck ist jedoch gleich dem Atmosphärendruck.

trationen von 0 - 70 mg/l (bei 0 °C, 1013 mbar) möglich [19, S.167]. Die Löslichkeit für Sauerstoff bei Normaldruck und Raumtemperatur beträgt 44 mg/l. Die Sauerstoffkonzentration für luftgesättigtes Wasser unter gleichen Druck- und Temperaturbedingungen liegt bei 9,07 mg/l.

Neben der Massenkonzentrationsangabe ist noch der Sauerstoffsättigungsindex üblich. Er gibt das Verhältnis von Konzentration zum Sättigungswert (für das Gleichgewicht mit Luft) in Prozent an.

$$6 \quad s = \frac{c}{c_s} \cdot 100 \%$$

Somit kann die O₂-Konzentration mit Hilfe der O₂-Sättigungstabellen über den Sättigungsindex aus der Aktivität berechnet werden. Allerdings bleiben hier Einflüsse möglicher gelöster Substanzen unberücksichtigt. So ist die Löslichkeit für Sauerstoff in Elektrolytlösungen gegenüber reinem Wasser erniedrigt. Im allgemeinen wird der Aktivitätskoeffizient gelösten Sauerstoffs durch andere gelöste Stoffe vergrößert. Der Sättigungsmolenbruch muß dann abnehmen.

$$7 \quad a(\text{O}_2)_{(\text{aq})} = f_{(\text{O}_2)} \cdot x(\text{O}_2)_{(\text{aq})}$$

Dieser Aussalzeffekt [16, S.295] muß experimentell ermittelt werden.

2.1.2 WINKLER-Methode

Die älteste Methode zur Bestimmung des in Wasser gelösten Sauerstoffs ist das Titrationsverfahren nach WINKLER (1888). Es wird noch heute, allerdings in einer Modifikation nach ALSTERBERG (Azidzusatz), angewandt. Die WINKLER-Methode ist ein international anerkanntes Referenzverfahren und dient vor allem zur Eichung der elektrochemischen Meßtechniken [14, S.549].

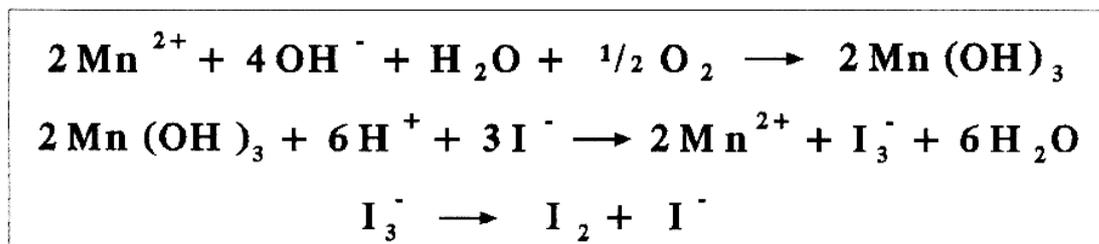


Abb.1 Methode nach WINKLER

Der im Wasser gelöste Sauerstoff oxidiert in alkalischen Medium Mn(II) zu Mn(III), welches als Mn(OH)₃ ausfällt. Nach Ansäuern wird Iodid zugegeben. Mn(III) oxidiert das Iodid zu Iod (Abb.1). Durch Rücktitration des Iods mit Thiosulfatlösung wird dann der Sauerstoffgehalt bestimmt. Das Azid dient dazu, Störungen durch Nitrit zu umgehen.

Der Vorteil aller Titrationsmethoden besteht darin, daß sich aufgrund des stöchiometrischen Prinzips die Sauerstoffmassenkonzentration direkt bestimmen läßt.

2.1.3 Membranbedeckte Elektrode nach CLARK

Die polarographische Sauerstoffbestimmung beruht auf der Reduktion von gelöstem Sauerstoff an einer Goldkathode, während die Silberanode oxidiert wird (Abb.2). Bevor auf die CLARK-Elektrode genauer eingegangen wird, werden vorweg die Vorgänge an den Elektroden erläutert.

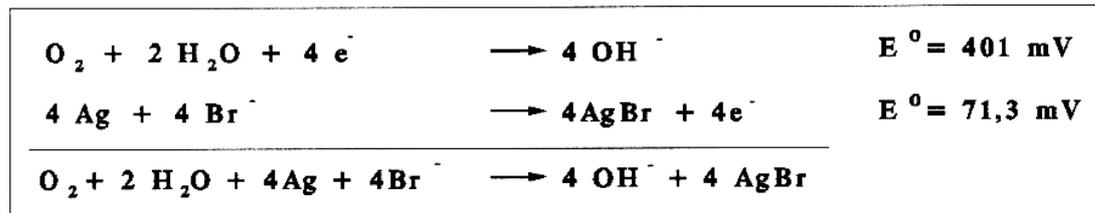


Abb.2 Elektrodenreaktionen des O₂-Sensors, nach [14, S.27]

Da diese Reaktion nicht spontan abläuft, muß sie durch eine äußere Spannung erzwungen werden. Deshalb wird eine Polarisationsspannung (U_{POL}) zwischen der Arbeitselektrode (A) und der Bezugselektrode (B) angelegt und durch einen Potentiostaten elektronisch konstant gehalten (Abb.3). Zwischen Gegenelektrode und Arbeitselektrode wird dann ein Strom gemessen, der als Meßsignal dient. In der Praxis werden jedoch Gegen-

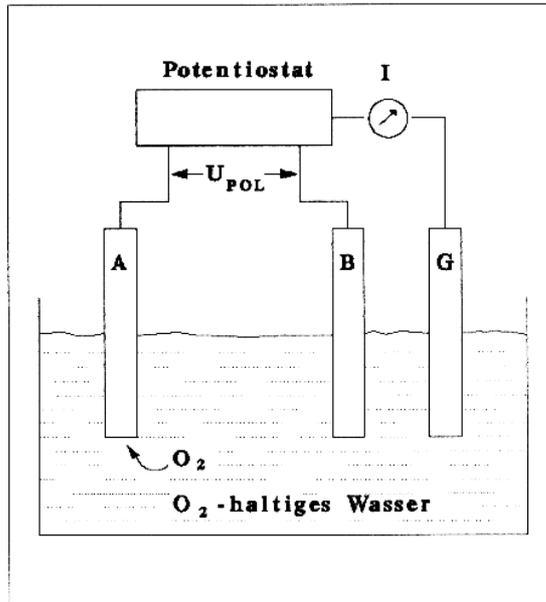


Abb.3 Polarographische Anordnung zur Sauerstoffbestimmung in Wasser, nach [14, S.19]

und Bezugselektrode meist zusammengefaßt. Die Höhe der Polarisierungsspannung richtet sich in etwa nach den Standardredoxpotentialen (Abb.2). Sie wird aber aus der Strom/Spannungskurve (Abb.4) experimentell ermittelt.

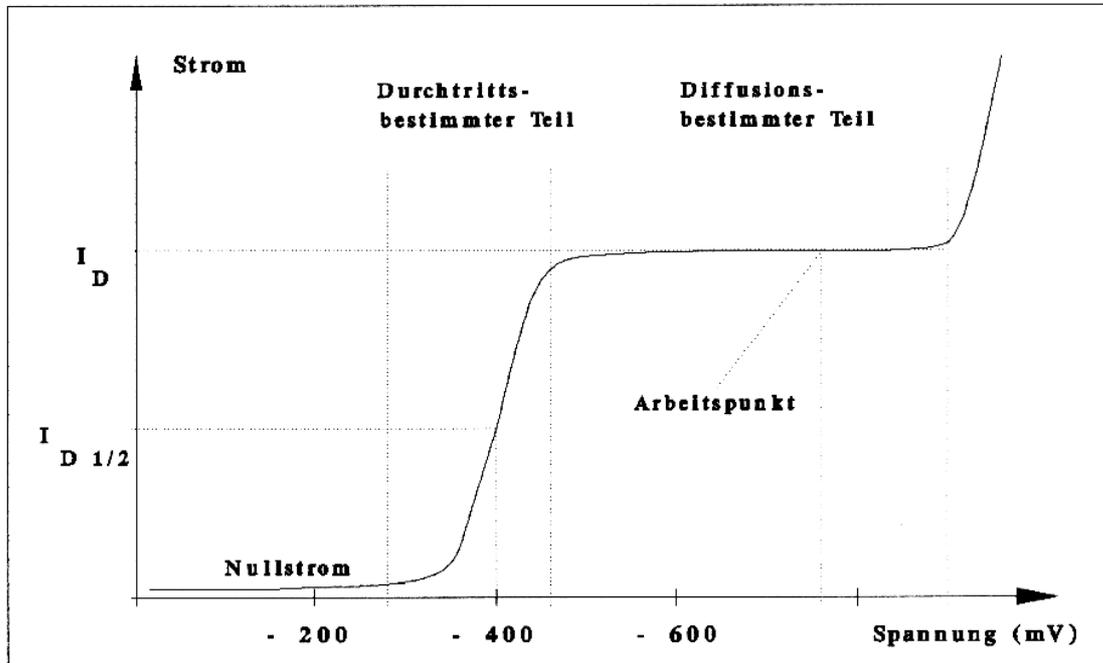


Abb.4 Strom / Spannungskurve für Sauerstoff gegen die Normal-Wasserstoffelektrode, nach [14, S.21]

Bei kleinen Spannungen fließt nur ein geringer Nullstrom. Wird durch Erhöhung der Spannung das Abscheidungspotential [17, S.3267] des am leichtesten zu reduzierenden Stoffes (O_2)* erreicht, so nimmt die Stromstärke bei anwachsender Spannung stark zu, weil die Reduktion des Sauerstoffs einsetzt. Bei Erreichen eines gewissen Grenzwertes (Diffusionsgrenzstrom I_D) schließt sich dem durchtrittsbestimmten Teil der Kurve ein Plateaubereich an, denn die aus der Lösung durch Diffusion an die Arbeitselektrode gelangenden Sauerstoffmoleküle werden an dieser sofort reduziert. Dabei wird die Diffusionsgeschwindigkeit bei konstanter Temperatur von der Differenz zwischen der Konzentration in der Lösung und an der Elektrodenoberfläche (dort ist sie Null!) bestimmt. Der Wert des Diffusionsgrenz-

* Die Elektrolytzusammensetzung ist so gewählt, daß Sauerstoff der am leichtesten zu reduzierende Stoff ist.

stromes hängt nach Gleichung 9 vom Diffusionskoeffizienten D des Sauerstoffs, seiner Konzentration c , der Elektrodenoberfläche A und der Dicke der NERNSTschen Diffusionsschicht d_N [16, S.833] ("ungerührte Grenzschicht" [14, S.22]) ab. Er kann deshalb zur quantitativen Bestimmung der Sauerstoffkonzentration herangezogen werden.

$$9 \quad I_D = z \cdot F \cdot D \cdot \frac{c}{d_N} \cdot A$$

Dieses Prinzip der Sauerstoffbestimmung hat allerdings den Nachteil, daß blanke Elektroden mit den Inhaltsstoffen der Probe reagieren und so das Meßverhalten einer solchen Anordnung beeinträchtigen. Weil diese Meßtechnik für viele Bereiche interessant ist (Abwassertechnologie, Medizin, Lebensmitteluntersuchung etc., also Flüssigkeiten die sowieso gewissen Schwankungen unterliegen), wird deutlich, daß diese Arbeitsweise keine deutliche Verbesserung zur WINKLER-Methode ist. Aus dieser Problemstellung heraus wurde von CLARK ein membranbedeckter O_2 -Sensor entwickelt und 1956 zum Patent angemeldet (Abb.5). Die Elektroden, welche sich in einer definierten Elektrolytlösung befinden (gepufferte KBr-Lösung), werden durch eine sauerstoffdurchlässige Membran von der Probe getrennt. Wie oben erwähnt, werden die Bezugs- und die Gegenelektrode zusammengefaßt. Durch die Membran erfolgt natürlich ein Eingriff in das polarographische Prinzip. Der Diffusionsgrenzstrom, welcher sich bei dem offenen Verfahren direkt proportional zur Konzentration verhält, ist nun abhängig von der Dicke b und der Permeabilität der Membran P_M und, das ist der entscheidende Unterschied, von der Aktivität des gelösten Sauerstoffs (Gleichung 10).

$$10 \quad I_D = z \cdot F \cdot P_M \cdot \frac{a(O_2)}{b} \cdot A$$

Der Grund dafür ist wahrscheinlich darin zu sehen, daß sich die Diffusion durch die Membran n_D proportional zur Aktivität verhält (Abb.6). Damit wird die Sauerstoffaktivität gemessen. Über diese Aktivitätsmessung bestimmt das Meßgerät die O_2 -Konzentration (vgl. 2.1.1). Das hat zum einen den Vorteil, daß die Eichung des Gerätes an Luft möglich ist, andererseits aber den Nachteil, daß eine Korrektur für die

Sauerstofflöslichkeit bei Anwesenheit anderer gelöster Stoffe durchgeführt werden muß.

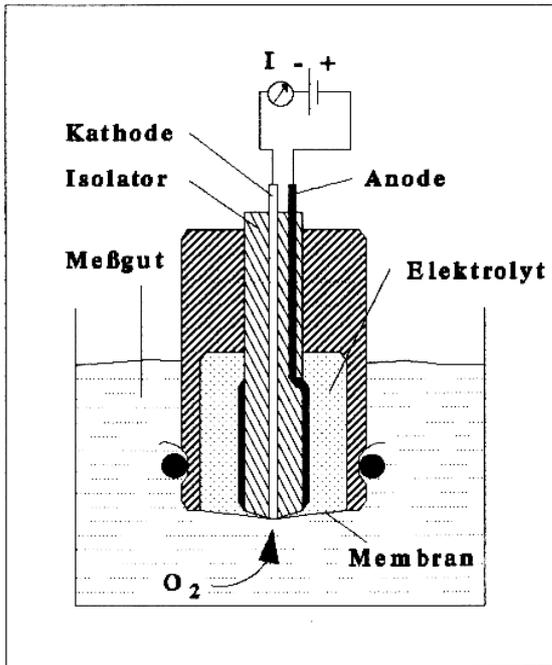


Abb.5 Membranbedeckte Elektrode nach CLARK, nach [14, S.23]

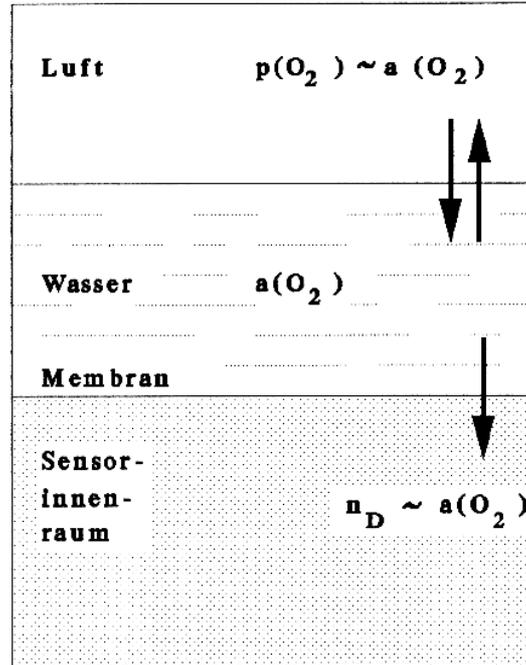


Abb.6 Diffusion im System Luft / Wasser / Sensor

Die Eichung. Die Meßzelle muß geeicht werden, weil durch die Oxidation der Silberanode Bromid verbraucht wird ($\text{Ag}^+ + \text{Br}^- \rightarrow \text{AgBr}$). Daher verändert sich das Potential der Halbzelle nach Gleichung 11. Damit wird die Spannung der Anode zu positiveren Werten verschoben. Die Polarisationsspannung der Goldkathode - elektronisch gegen die Anode stabilisiert - muß sich damit in der gleichen Weise verschieben, da Bezugs- und Gegenelektrode zusammengefaßt sind. Demnach driftet die Elektrode, weil der Arbeitspunkt in Abbildung 6 auf dem Plateau nach links verschoben wird. Diese Drift wird durch die Eichung ausgeglichen.

$$11 \quad E_{\text{Ag}/\text{AgBr}} = E_{\text{Ag}/\text{AgBr}}^{\circ} - \frac{RT}{zF} \cdot \ln c(\text{Br}^-)$$

2.1.4 Quantitative Bestimmungsmethoden von Ascorbinsäure

Ascorbinsäure ist ein starkes Reduktionsmittel, daher beruhen auch die meisten Bestimmungsmethoden auf dieser Eigenschaft. Da jedoch in Lebensmitteln mit anderen

reduzierenden Substanzen (zum Beispiel phenolische Verbindungen) zu rechnen ist, kann es hier zu Störungen kommen. Einige Methoden arbeiten daher mit Farbkupplern die spezifisch mit Ascorbinsäure reagieren sollen.

Neben maßanalytischen und photometrischen Techniken gibt es auch ein Teststäbchensystem sowie die Möglichkeit der polarographischen Bestimmung. Allein die große Anzahl der Methoden, für die vielfach noch unterschiedliche Modifikationen vorgeschlagen werden, geben einen Eindruck über die Problematik der Ascorbinsäurebestimmung in Lebensmitteln.

Die Redox titrationen beruhen einerseits auf der Entfärbung von farbigen anorganischen Oxidationsmitteln oder organischen Farbstoffen durch die Reduktionswirkung der Ascorbinsäure. Andererseits kann während einer Titration mit einem Oxidationsmittel das Redoxpotential gemessen und somit der Äquivalenzpunkt bestimmt werden.

Bei den photometrischen Methoden wird ein Reagenz im Überschuß zugesetzt, welches mit Ascorbinsäure eine Verbindung eingeht (Kupplungsreaktion) oder reduziert wird. In jedem Fall entsteht eine Färbung, die der Konzentration von Ascorbinsäure proportional ist.

Bestimmung mit Iod. Ascorbinsäure reduziert Iod zu Iodid, es wird mit einer Iod-Standard-Lösung titriert, Stärke dient als Indikator. Neben der direkten Titration wird auch die Rücktitration mit Thiosulfatlösung vorgeschlagen, oder Iodid-Lösung wird mit Iodat titriert, und das entstehende Iod reagiert mit Ascorbinsäure, ist diese verbraucht, wird der Endpunkt durch die blaue Farbe des Iod-Stärke-Komplexes angezeigt [4, S.27-29]. Weitere Modifikationen (Oxidation mit Iodmonochlorid oder die Verbindung einer Säure/Base-Titration mit einer direkten Iod-Titration nach DAB 7) werden in [13, S.200] beschrieben.

Die Bestimmung mit 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP). Die erste titrimetrische Methode (TILLMANN, 1936) beruht auf der Verwendung von DCPIP. Der blaue (in saurem Medium rosafarbene) Farbstoff wird durch Ascorbinsäure in seine

farblose Leukoverbindung überführt (Abb.7). Die Ascorbinsäure-Lösung wird in Essig- oder Oxalsäure bis zum Auftreten einer blassen Rosafärbung mit DCPIP-Lösung titriert (Arbeitsvorschrift [11, S.223]). Bei stark gefärbten Proben ist diese Rosafärbung schlecht oder nicht zu erkennen. Daher wird von HERRMANN [15, S.219] empfohlen, nach der Reagenzzugabe die Probe mit Ether auszuschütteln, bis sich dieser rosa färbt. Hierfür soll der Probe, auf mehrere Gefäße aufgeteilt, jeweils eine definierte, von Probe zu Probe sich steigernde Menge DCPIP zugefügt werden. In einer anderen Variante (ZONNEVELD [5, S.319-333]) sollen störende, reduzierende Stoffe durch eine Mischung aus Bleiacetat, Metaphosphorsäure und Trichloressigsäure vor der Titration entfernt werden. An gleicher Stelle wird eine Modifikation vorgeschlagen, welche durch die Zugabe von Formaldehyd die Reaktion von Ascorbinsäure mit DCPIP bei einem bestimmten pH-Wert verhindert. Demnach können störende Substanzen getrennt quantitativ mit DCPIP erfaßt werden.

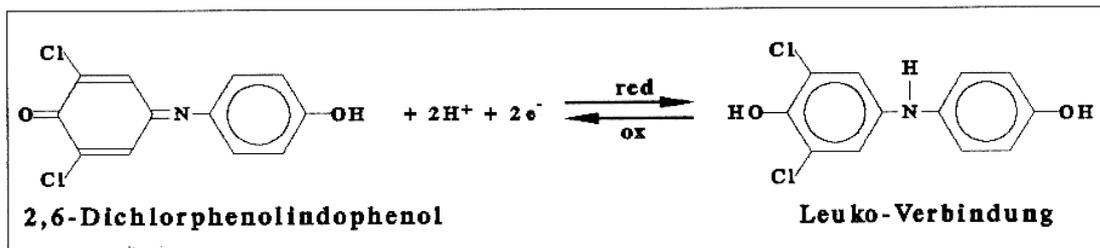


Abb.7 Ascorbinsäurebestimmung mit 2,6-Dichlorphenolindophenol, nach [11, S.220]

Quantitative Redoxpotentialmessungen. BLUME, BADER und PLAUSCHINAT [7, S.293-296] beschreiben die Möglichkeit Vitamin C titrimetrisch bei gleichzeitiger Messung des Redoxpotentials zu bestimmen. Das Potential der Halbzelle Ascorbinsäure/Dehydroascorbinsäure hängt nach der NERNSTschen Gleichung von der Konzentration der Ascorbinsäure ab. Die Spannung zwischen einer Indikatorelektrode (Platin oder Silber) in Ascorbinsäurelösung und einer Bezugselektrode (Hg/Hg₂Cl₂ oder Hg/HgSO₄ in gesättigter Kaliumchlorid- bzw. -sulfat-Lösung) wird gemessen. Gleichzeitig wird die Ascorbinsäure mit einem Oxidationsmittel (Silbernitrat, Kaliumhexacyanoferrat(III), Eisen(III)-chlorid, Kaliumbromat oder Cer(IV)-

sulfat) titriert. Der Endpunkt der Titration ist erreicht, wenn auf Grund überschüssigen Oxidationsmittels das Potential sprunghaft ansteigt.

Teststäbchen. Die Firma Merck arbeitet mit Phosphormolybdat (wahrscheinlich dem schwerlöslichen Ammoniumsalz der Phosphormolybdänsäure $H_7[P(Mo_2O_7)_6] \cdot 28H_2O$), welches durch Reduktion in intensiv blau gefärbtes Molybdänblau überführt wird. Die Färbung ist auf die gleichzeitige Anwesenheit von Mo(IV) und Mo(VI) in der valenzgemischten Verbindung $MoO_3-x(OH)_x$ zurückzuführen [17, S.2658, 2660, 1693]. Die Bestimmung erfolgt über einen Farbvergleich der sich einstellenden Mischfarbe der Reaktionszone des Teststäbchens zwischen Phosphormolybdat (gelb) und Molybdänblau mit einer Farbskala. Eine Anleitung zur Herstellung von Vitamin C-Teststreifen findet sich in [30, S.272].

Nach dem gleichen Prinzip kann auch eine photometrische Bestimmung vorgenommen werden. Nur wird dann mit Phosphormolybdänsäure (SONNENSCHAINS Reagenz) oder dem entsprechenden Natriumsalz gearbeitet. Beide Substanzen sind gut wasserlöslich und Molybdänblau bildet eine kolloidale Lösung, welche im Experiment (Abb.75) ein Extinktionsmaximum bei etwa 720 nm aufweist. Es werden allerdings auch andere Werte angegeben. Gewöhnlich wird dieses Verfahren zur photometrischen Phosphatbestimmung verwendet, da sich Phosphormolybdat wesentlich besser reduzieren läßt als Molybdat. Vitamin C dient dann im Überschuß als Reduktionsmittel.

Polarographische Bestimmung. Mit einer Quecksilbertropf-elektrode kann auf Grund der leichten Oxidierbarkeit der Ascorbinsäure eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt werden (*Dropping Mercury Elektrode* (DME), Versuchsdurchführung [11, S.224], Versuchsaufbau und Theorie [16, S.833 und 17, S.3267]). Die Bestimmung erfolgt nach einer Eichgerade über die Peakhöhe.

Farbkupplungsreaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Ketone und Aldehyde können mit Stickstoffbasen eine Kondensationsreaktion eingehen. Bei Ascorbinsäure liegt zwar eine Carbonylfunktion vor, aber es handelt sich um die eines intramolekularen Esters. Hier ist die Positivierung des Kohlenstoffs (Voraussetzung für diesen nukleophilen

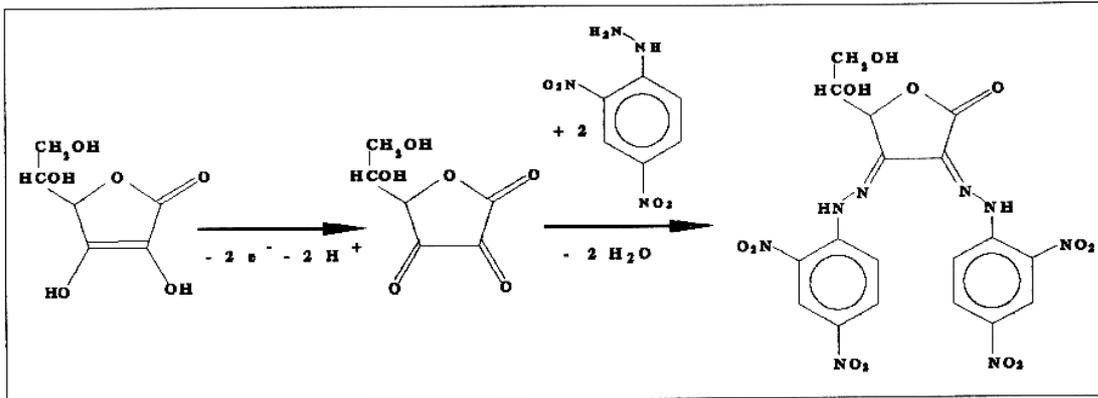


Abb.8 Ascorbinsäurebestimmung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, nach [7, S.296]

Angriff) nicht gegeben. Daher muß Ascorbinsäure erst zu Dehydroascorbinsäure oxidiert werden. Dies geschieht in der Regel mit Iod. 2,4-Dinitrophenylhydrazin bildet mit Dehydroascorbinsäure ein intensiv orange-rotes Osazon (Abb.8), welches nach etwa 5-10 Minuten ausfällt und filtriert werden kann. Der Feststoff kann in Schwefelsäure gelöst und photometrisch bestimmt werden [7, S.296].

Neben dieser Kupplungsreaktion soll noch eine weitere Methode (H. MOOR [6, S.20-27]) erwähnt werden, die nicht auf der Reduktionswirkung von Vitamin C beruht. Dabei reagiert Ascorbinsäure mit diazotiertem 2-Nitroanilin. Es bildet sich ein rotblaues Salz des 2-Nitrophenylhydrazids der Oxalsäure, dessen Konzentrationsbestimmung photometrisch geschieht.

2.2 Enzymatische Bräunung

Kupferhaltige Enzyme (Polyphenoloxidasen) bewirken die beschleunigte Oxidation von phenolischen Verbindungen durch Luftsauerstoff. Die Folge dieser Oxidation ist eine Bräunung des Lebensmittels (Obst und Gemüseprodukte) durch Chinone. Die sich bildenden Chinone sind relativ reaktive Verbindungen und können beispielsweise Reaktionen mit phenolischen Verbindungen (Polymerisation) oder mit Proteinen (Gerbung) eingehen. Einige dieser Verbindungen beeinflussen den Geschmack des Lebensmittels. Diese Vorgänge lassen sich über physikalische (Erhitzen, Abtrennung der Enzyme und Substrat oder Ausschluß von Sauerstoff) oder chemische Methoden (pH-Wert oder Einsatz von geeigneten Inhibitoren) steuern. Neben der enzymatischen Bräunung können in Lebensmitteln zusätzlich nichtenzymatische Bräunungsprozesse

branbruchstücke, Zellwandbestandteile, Cellulose, etc. zählen. In der lebenden Zelle sind PPO und Substrate räumlich voneinander getrennt. Während PPO an Membranstrukturen der Chloroplasten (Thylakoide), Mitochondrien und Peroxisomen gebunden sind [20, S.500], befinden sich die Substrate im Cytoplasma. Dabei ist bisher noch ungeklärt, welche Funktion die PPO im Stoffwechsel der Pflanze überhaupt einnehmen [35, S.659-665].

Aufgrund der Umsetzung verschiedener Substratformen werden die PPO in zwei Klassen eingeteilt (Abb.12). Erstens Cresolasen (Hydroxylierung von Monophenolen zu o-Dihydroxyphenolen) und Catecholasen (Oxidation von o-Dihydroxyphenolen zu den entsprechenden Chinonen), zweitens Laccasen (Oxidation von ortho- und para-Dihydroxyphenolen zu den entsprechenden Chinonen).

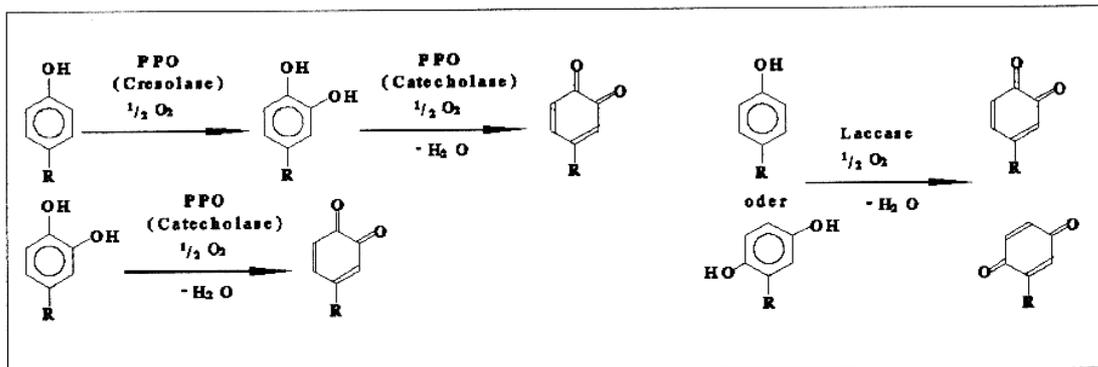


Abb.12 PPO-katalysierte Reaktionen, nach [20, S.500]

2.2.2 Substrate in Apfelsäften.

Nach LEA 1984 [22, S.356] stellen die Pflanzenphenole Chlorogensäure, Phloridzin, Catechin und Epicatechin die wichtigsten Substrate für PPO in Apfelsaft dar (Abb.13).

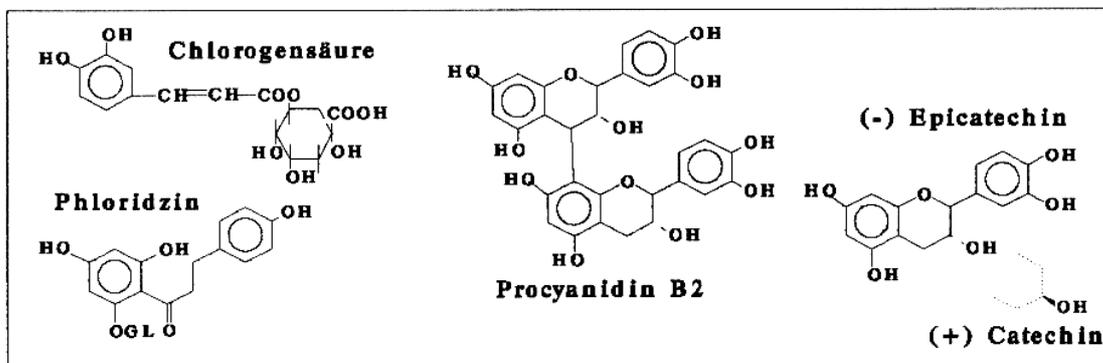


Abb.13 Die wichtigsten Phenole in Äpfeln, nach [22, S.356]

Weiterhin können Polymere des Catechins beziehungsweise Epicatechins, sogenannte Procyanidine, durch Oxidation dunkle Produkte bilden. Allerdings wirkt hier nicht das System PPO/O₂, sondern Chlorogensäurechinon als schnelles nichtenzymatisches Oxidationsmittel, welches zuvor durch PPO-Einfluß entsteht und durch Reduktion wieder zu Chlorogensäure wird. Somit sind Procyanidine ebenfalls am Sauerstoffverbrauch beteiligt. Eine typische Phenolzusammensetzung für einen Apfelmost wird in Tab.1 wiedergegeben. Tafeläpfel weisen einen etwa fünf- bis zehnmal niedrigeren Phenolgehalt auf als Mostäpfel.

Chlorogensäure	980 mg/l	2,85 mmol/l
Epicatechin	380 mg/l	1,35 mmol/l
Phloridzin	190 mg/l	0,40 mmol/l
Procyanidin B2	450 mg/l	0,80 mmol/l
andere dimere Procyanidine	340 mg/l	0,60 mmol/l *
trimere Procyanidine	260 mg/l	0,31 mmol/l *
teramere Procyanidine	210 mg/l	0,19 mmol/l *
oligomere / polymere Procyanidine	3350 mg/l	

Tab.1 Typische Phenolzusammensetzung für einen bitter-süßen englischen Apfelmost (cider) nach [22, S.356]

* berechnet als das jeweilige Vielfache von Epicatechin

2.2.3 Weitere Substrate für PPO

Ganz allgemein für Obst und Gemüse werden in [12, S.345] Ferulasäure, Gallussäure, Rutin, Kaffeesäure, Luteolin und Pelargonidin als Hauptsubstrate für PPO angegeben. Wobei Ferularsäure nach [20, S.505] sogar ein kompetitiver Inhibitor für PPO sein soll. Hier werden Chlorogensäure, Catechin und Kaffeesäure als Substrate beschrieben. Es finden sich in der Literatur einige Widersprüche. So wird in [33, S.207] Brenzcatechin als bevorzugtes Substrat in vitro erwähnt, während es an anderer Stelle [26, S.100] als Inhibitor auftaucht (vgl.2.2.6).

2.2.4 Temperatur- und pH-Einflüsse.

Die Aktivität der Polyphenoloxidasen ist abhängig von der Temperatur. Zunächst ist auch bei enzymatischen Reaktionen eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Temperatur zu erwarten. Eine weitere Temperaturerhöhung über 30°C führt jedoch durch Denaturierung der Proteinkomponente von PPO zu einer weitgehenden irreversiblen Zerstörung des Enzyms (Abb.14).

Das pH-Optimum liegt im neutralen Bereich, unterhalb von pH 3 und oberhalb von pH 10 ist ebenfalls mit einer irreversiblen Inaktivierung zu rechnen.

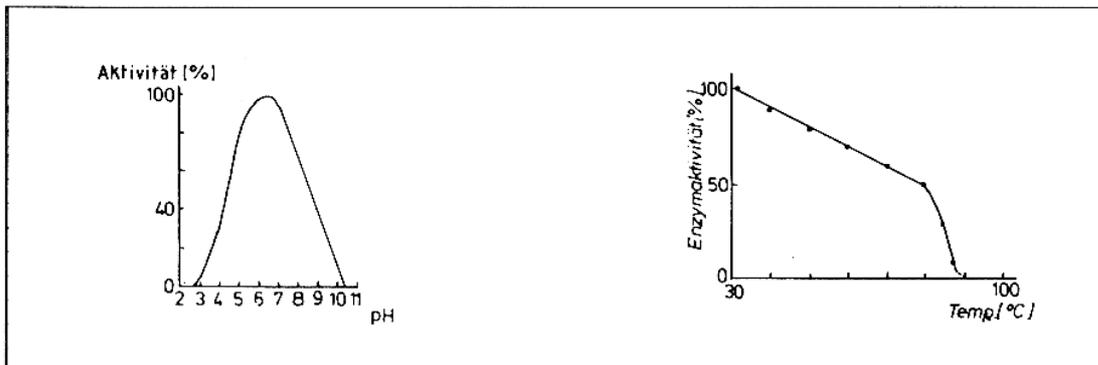


Abb.14 pH- und Temperaturabhängigkeit der PPO-Aktivität [12, S.345]

2.2.5 Aussehen und Geschmack.

Die Oxidation der phenolischen Inhaltsstoffe von Fruchtsäften ist aus kosmetischen Gründen (Braunfärbung) ein Problem. So sieht ein heller Trübsaft frischer aus und läßt sich besser verkaufen. Die Procyanidine im Apfelsaft zeichnen sich im Geschmack durch Bitterkeit und Adstringenz aus und tragen so zu dem typischen Apfelsaftgeschmack bei. Das Gleichgewicht dieser beiden Geschmacksnoten ist jedoch abhängig vom Molekulargewicht der Procyanidine (Abb.15) [22, S.357], so daß eine Steuerung der Oxidation auch aus diesen Gründen notwendig ist.

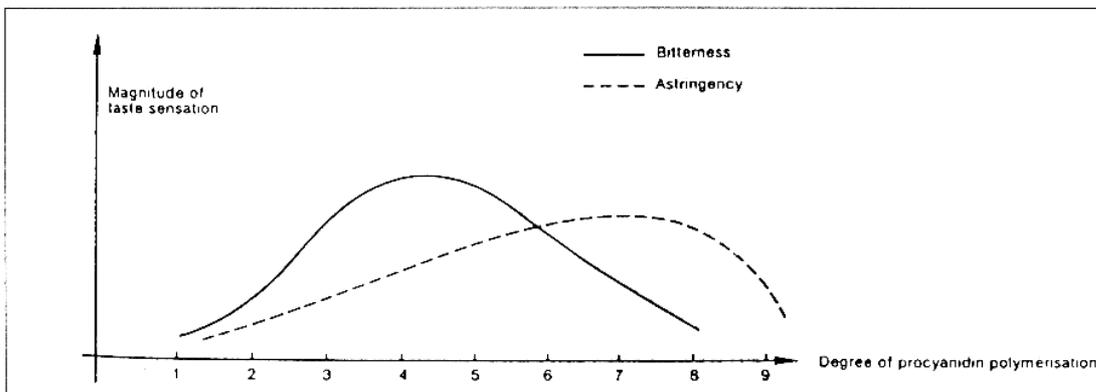


Abb.15 Beziehung zwischen Geschmacksempfindung und Procyanidinpolymerisation [22, S.357]

1.2.6 Verhinderung der enzymatischen Bräunung

Die Bräunungsreaktion ist in der Obst- und Gemüseverarbeitung zum Teil erwünscht, beispielsweise bei schwarzen Oliven, Kakao, Kaffee, Tee, Datteln und Feigen, da sie hier wesentlich zur Farbe und zum typischen Aroma beiträgt. Ist die Bräunung jedoch nicht erwünscht, so gibt es mehrere Methoden sie zu unterbrechen oder ganz zu unterbinden. Die Möglichkeiten bestehen darin, das Enzym durch Erhitzen zu denaturieren, es mit einem geeigneten Zusatzstoff zu hemmen, den Sauerstoff vom Lebensmittel fernzuhalten oder das Enzym aus dem Gemisch zu entfernen (Abtrennen der Trübstoffe). Alle diese Methoden finden bei der Fruchtsaftherstellung Anwendung.

In der Lebensmittelherstellung finden Ascorbinsäure, Schwefeldioxid, Zitronensäure und Benzoesäure als Zusatzstoffe Anwendung. Sie haben die Eigenschaft, gesundheitlich als unbedenklich zu gelten. Als Inhibitoren sind aber weitere Stoffe bekannt, sie sollen hier ihrer Wirkung nach geordnet wiedergegeben werden (Tab.2).

1. Inhibitoren welche die Zentralionen (Kupfer) im aktiven Zentrum des Enzyms angreifen	
Zitronensäure [12, S.345] Azide [20 S.504] Ethylxanthate [20]	Cyanide [20] DDTC [20]
2. Inhibitoren welche mit dem Substrat um das Enzym konkurrieren (kompetitive Hemmung)	
Ferularsäure [20] Brenzcatechin [26, S.100] Sorbinsäure [20]	Phenyllessigsäure [20] Zimtsäure [20] Benzoesäure [20]
3. Inhibitoren welche die Reaktion rückgängig machen (starke Reduktionsmittel)	
Ascorbinsäure [1, S.201]	Schwefeldioxid [12, S.347]

Tab.2 Inhibitoren von PPO

Die Substanzen der Gruppe 1. Starke Komplexbildner können das Kupfer aus dem aktiven Zentrum des Enzyms entfernen. Jedoch sind nicht alle Komplexbildner dazu in der Lage. Beispielsweise zeigt EDTA (auch in großen Konzentrationen) nicht die geringste Wirkung. Vermutlich ist der Histidinkomplex im Enzym stabiler als der Kupfer-EDTA-Komplex. Damit ergeben sich jedoch neue experimentelle Möglichkeiten (Einsatz als Maskierungsmittel oder als Hemmstoff gegen Mikroorganismen).

Die Stoffe der Gruppe 2. Einige Substanzen konkurrieren mit den Substraten um das Enzym, ohne oxidiert zu werden (Phenylcarbonsäuren und Sorbinsäure) oder sie werden oxidiert, zeigen jedoch keine so starke Bräunung (Brenzcatechin ?). Gerade hier sind oft gegensätzliche Angaben in der Literatur zu finden. So werden Substanzen als Inhibitoren erwähnt die an anderer Stelle Substrate darstellen. Das Brenzcatechin beispielsweise wurde in der vorliegenden Arbeit erfolgreich als Substrat eingesetzt.

Gruppe 3. Antioxidationsmittel schließlich stellen Substanzen dar, die aufgrund ihrer Reduktionseigenschaften mit dem oxidierten Produkt reagieren. Die Edukte werden wieder hergestellt, wobei sich die Inhibitoren verbrauchen. Der Vorteil besteht vor allem darin, daß der in der Mischung enthaltene Sauerstoff verbraucht wird (Abb.16). Schwefeldioxid soll aber auch direkt das Enzym inhibieren [12, S.347] und [23, 381-387]. Weiterhin wird das Substrat durch nukleophile Addition von Sulfid an einer erneuten Reaktion gehindert (Abb.17) [12, S.346].

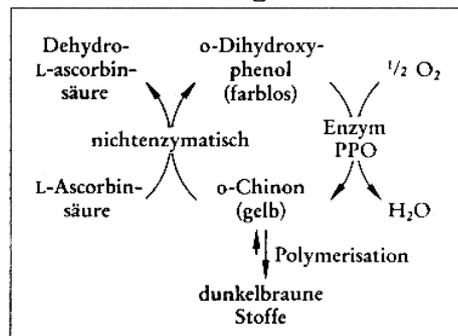


Abb.16 Inhibitorwirkung von Ascorbinsäure [1, S.201]

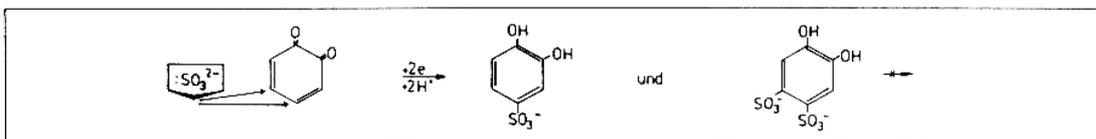


Abb.17 Reaktion von Sulfid mit phenol. Inhaltsstoffen [12, S.346]

Auch für Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure wurde eine direkte Wechselwirkung mit dem Enzym nachgewiesen [2, S.765].

Die Produkte (also die gebildeten o-Chinone) sind im allgemeinen sehr reaktionsfreudige Stoffe. Sie können Bindungen mit den Amino- und Thiolgruppen von Aminosäuren eingehen. Somit sind Reaktionen mit der Proteinkomponente des Enzyms möglich (Abb.18). Die daraus resultierende Strukturänderung des Proteins führt zu einer irreversiblen Inaktivierung des Enzyms. Diese Produkthemmung wird Gerbung genannt.

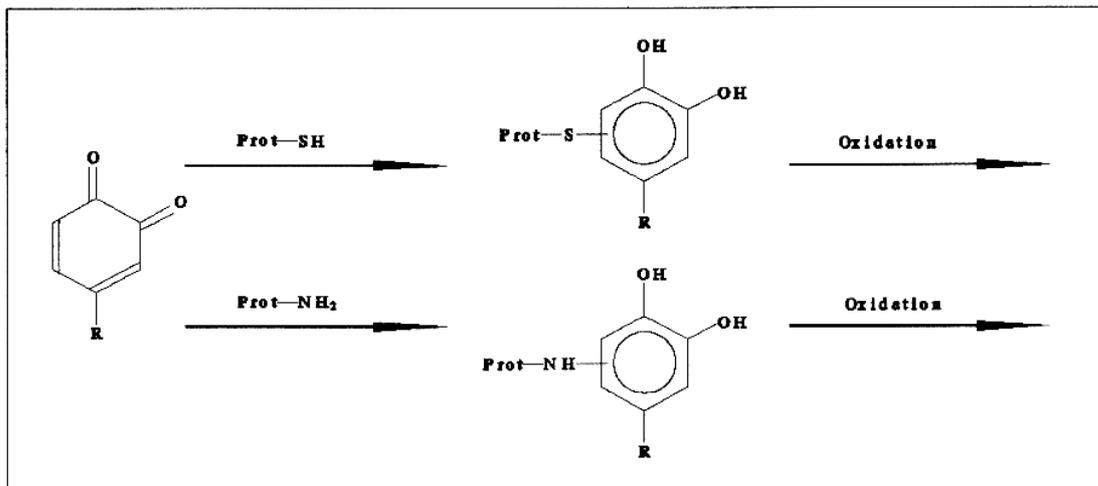


Abb.18 Reaktionen von o-Chinonen mit Proteinen, nach [20, S.503]

Diese Enzymhemmung ist allerdings für die Verhinderung und Steuerung der enzymatischen Bräunung nicht geeignet, da es in diesem Fall die Chinone sind, die das Aussehen und den Geschmack eines Lebensmittels beeinflussen. Es wäre demnach nicht sinnvoll, einen Vorgang den man verhindern will, erst einmal ablaufen zu lassen, damit die unerwünschten Produkte im nachhinein die Ursache ihrer Entstehung zerstören.

Ein gewisser technischer Nutzen bei der Fruchtsaftherstellung kommt der Gerbung allerdings zu. So werden Enzymproteine, die für den pektolytischen Abbau verantwortlich sind, zerstört. Damit wird der partielle Abbau von Pektin zu einer schleimigen Pulpe verhindert, und die Früchte lassen sich damit wesentlich besser pressen [20, S.358].

Für Experimente mit Polyphenoloxidasen ist die Gerbwirkung der Reaktionsprodukte allerdings ein unerwünschter Nebeneffekt, der sicherlich gerade bei Messungen über längere Zeiträume ins Gewicht fällt.

Zusammenfassend werden die Mechanismen für die Steuerung der enzymatischen Bräunung mit den in der Lebensmitteltechnik gebräuchlichen Stoffen in (Abb.19) dargestellt.

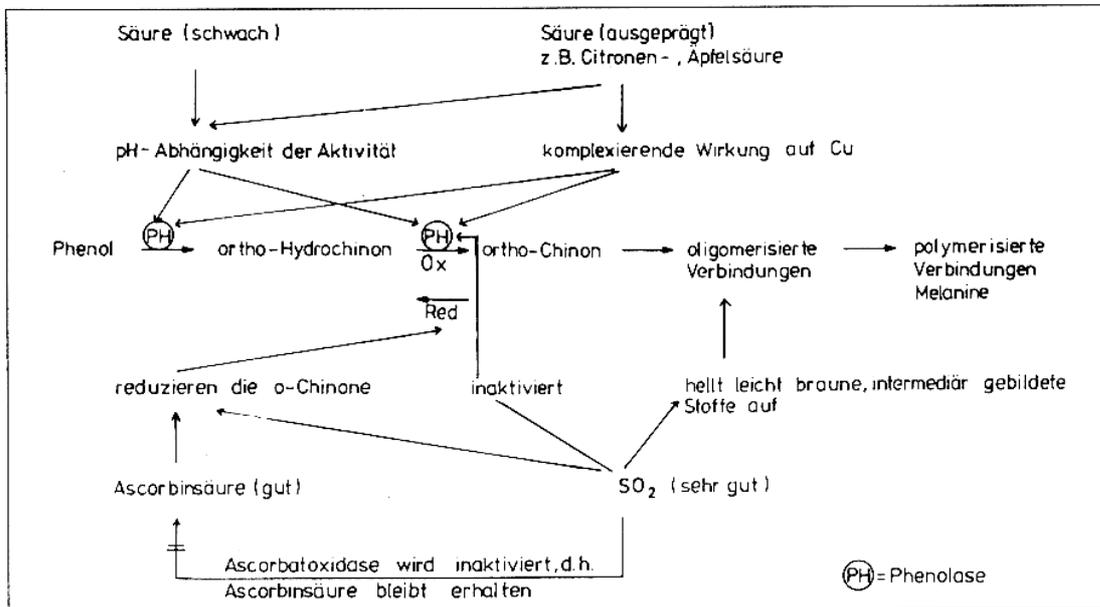


Abb.19 Reaktionsschema: Inhibition der enzymatischen Bräunung [12, S.347]

2.2.7 "Ascorbinsäurebräunung" / MAILLARD-Reaktion

Allerdings sind der Zugabe von Ascorbinsäure auch Grenzen gesetzt. So nimmt Dehydroascorbinsäure durch Reaktion mit Aminosäuren - über den Strecker-Abbau - an nicht enzymatischen Bräunungsreaktionen (MAILLARD-Reaktion) teil. Es bildet sich Scorbaminsäure, welche mit Dehydroascorbinsäure zu einem roten Farbstoff reagiert. Dieser Farbstoff bildet nun unter Einbeziehung eines weiteren Moleküls Scorbaminsäure braune Produkte (Abb.20). Diese reine "Ascorbinsäurebräunung" stellt beispielweise Probleme bei der Lagerung von Kiwisafkonzentrat dar (1, S.200).

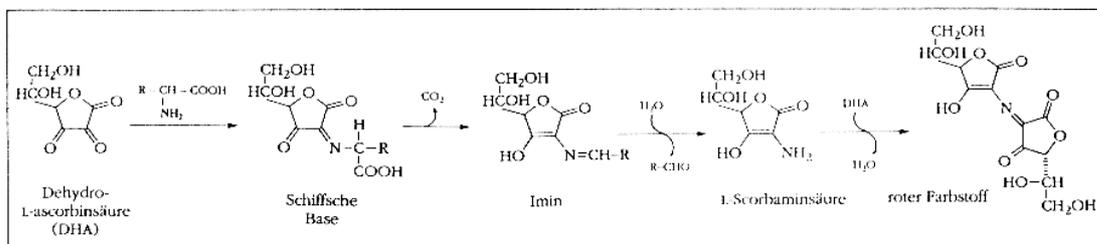


Abb.20 Reakt. von Dehydroascorbinsäure mit Aminosäuren [1, S.201]

2.3 Oxidation von Vitamin C und damit verbundener Sauerstoffverbrauch

Während kristallines Vitamin C einer Oxidation gegenüber relativ stabil ist, findet in wässrigen Lösungen bei Anwesenheit von Luftsauerstoff ziemlich schnell eine Umsetzung zu Oxidationsprodukten statt. Noch schneller als diese Spontanoxidation verläuft die durch Spuren von Schwermetallen (Eisen III, Kupfer II) katalysierte Oxidation (Abb.21). Ascorbinsäure kann weiterhin unspezifisch durch das System PPO/o-Diphenole in pflanzlichem Material beschleunigt oxidiert werden. Zahlreiche Pflanzen (Kohl, Spinat, Gurken usw.) enthalten jedoch ein spezifisches Kupferprotein, die Ascorbinsäureoxidase. Sie dehydriert Vitamin C zu Dehydroascorbinsäure. Dehydroascorbinsäure ist noch biologisch aktiv aber sehr instabil. Die biologische Vitaminwirkung geht jedoch verloren, wenn aus Dehydroascorbinsäure durch irreversible Öffnung des Lactonrings 2,3,-Diketogulonsäure entsteht, welche dann über weitere Reaktionen eine Vielzahl von Abbauprodukten liefert (Abb.22).

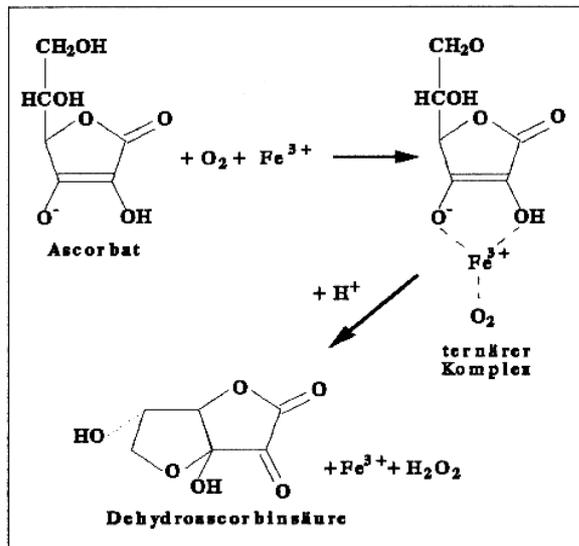


Abb.21 Fe^{3+} -katalysierte Oxidation von Ascorbat nach [1, S.199]

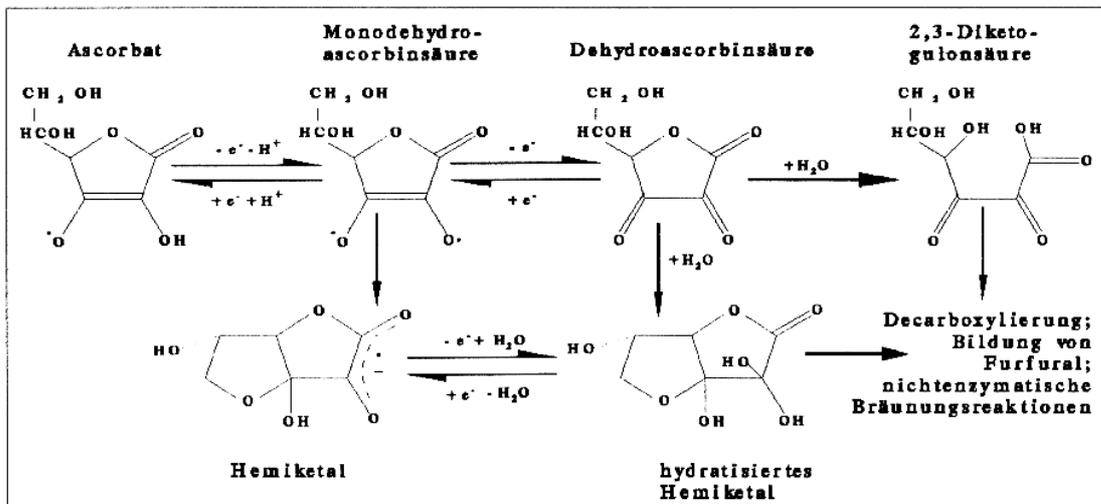


Abb.22 Oxidativer Abbau von Ascorbinsäure, nach [1, S.200]

In der Lebensmittelverarbeitung werden diese Prozesse unter dem Begriff "Vitamin C-Verluste" zusammengefaßt. Gewöhnlich ist an allen Reaktionen Sauerstoff beteiligt. Theoretisch reagiert ein Sauerstoffmolekül, über Wasserstoffperoxid als Zwischenprodukt, mit zwei Molekülen Ascorbinsäure (Abb.23).

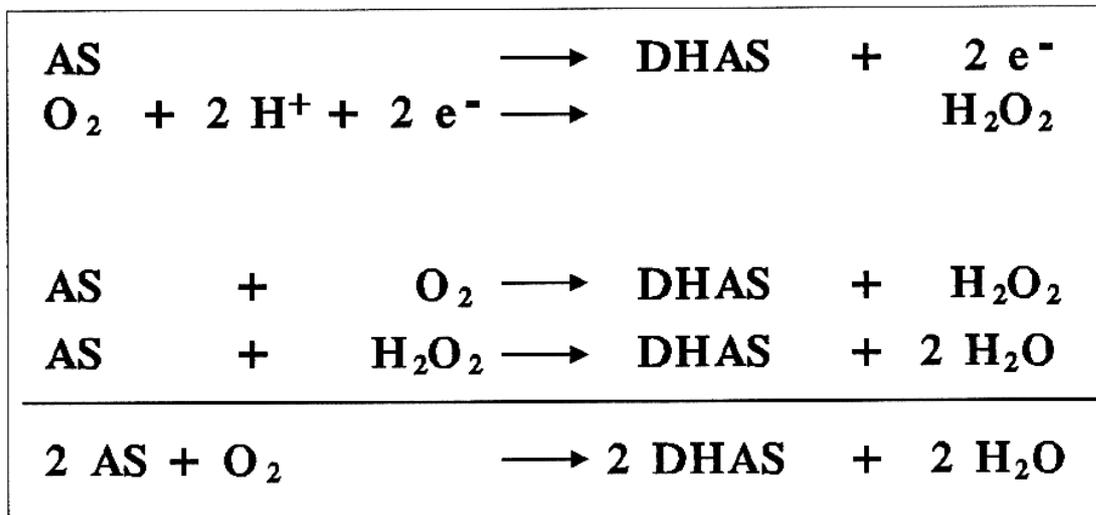


Abb.23 Oxidation von Ascorbinsäure, verändert nach [3, S.298]

Der Vitamin C-Verlust ist von Bedeutung für Citrussäfte, schwarzen Johannisbeersaft sowie Erdbeer- und Sanddorn-Süßmost, während Apfel- und Traubensaft von vornherein kaum Ascorbinsäure aufweisen. Da bereits bei der Herstellung Vitamin C verlorengelht (zu Dehydroascorbinsäure oxidiert wird), wird es in vielen Fällen nachdosiert, um die enzymatische Bräunung zu verhindern. Meist weist der Hersteller in werbewirksamer Weise auf den besonders hohen Vitamin C-Gehalt seines Getränks hin, tatsächlich hat er den Saft aber nicht so sehr aus Sorge um die Gesundheit des Verbrauchers vitaminisiert, sondern um die Farbe des Getränks zu erhalten.

2.4 Fettoxidation

Eine der Ursachen für den Verderb von Fetten und fetthaltigen Lebensmitteln ist die Reaktion von ungesättigten Fettsäuren mit Sauerstoff. Als Folge dieser Reaktion können Geruchs- und Geschmacksstoffe entstehen, die oft schon in äußerst geringen Konzentrationen einen ranzigen, tranigen, metallischen oder fischigen Aromafehler ("off-flavour") verursachen. Der zeitliche Verlauf dieser radikalischen Oxidation läßt sich in die drei Abschnitte Induktionsperiode, Kettenwachstum und -verzweigung und schließlich den Kettenabbruch einteilen. Durch Licht wird die Fettoxidation beschleunigt. In diesem Zusammenhang spielen Photosensibilisatoren (z.B. Chlorophyll) und Sauerstoff im Singulettzustand eine Rolle. Der Verderb kann durch Antioxidationsmittel wie Vitamin E in Verbindung mit dem fettlöslichen Vitamin C-Derivat Ascorbyl-6-palmitat hinausgezögert werden.

2.4.1 Radikalkettenreaktion

Die Geschwindigkeit der Fettoxidation nimmt nach einer gewissen Induktionsperiode exponentiell zu (Anfang von Zeitraum B, Abb.24). Dies läßt sich mit den autokatalytischen Schritten 3 und 4 in Abbildung 25 erklären. Hier

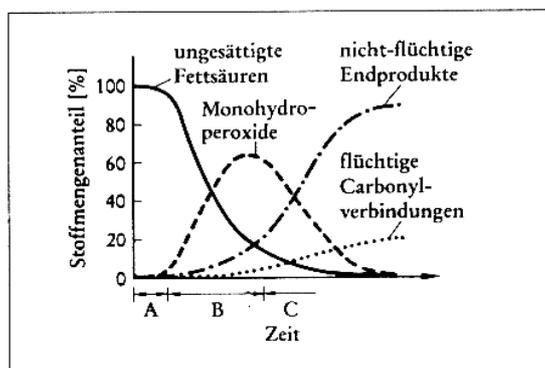


Abb.24 Fettoxidation [1, S.203]
(A: Induktionszeit, B: Kettenwachstum und -verzweigung, C: Kettenabbruch)

Start:	Bildung von $R\cdot$ oder $RO_2\cdot$
Kettenwachstum:	(1) $R\cdot + O_2 \longrightarrow RO_2\cdot$
	(2) $RO_2\cdot + RH \longrightarrow ROOH + R\cdot$
Kettenverzweigung:	(3) $ROOH \longrightarrow RO\cdot + \cdot OH$
	(4) $2 ROOH \longrightarrow ROO\cdot + RO\cdot + H_2O$
Kettenabbruch:	(5) $2 RO_2\cdot \longrightarrow ROOR + O_2$

Abb.25 Elementarschritte der Autoxidation von Fetten [25, S.71]

werden erneut Radikale durch uni- oder bimolekularen Zerfall von Hydroperoxiden gebildet. Aus der Kettenabbruchreaktion (Schritt 5, Abb.25) entstehen Dialkylperoxide. Es ist aber auch möglich, daß der cyclische Ablauf der Reaktion zu einer Disproportionierung in Keto- und Monohydroxyfettsäuren führt (Abb.26).

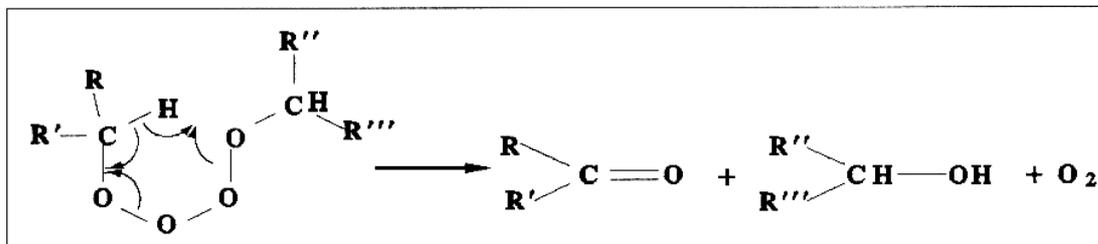


Abb.26 Kettenabbruch und Disproportionierung* aufgrund der Reaktion von zwei Peroxyradikalen, nach [24, S.72]

2.4.2 Aromafehler

Die aus der Radikalkettenreaktion hervorgehenden Hydro- und Dialkylperoxide sind geruch- und geschmacklose Verbindungen. Die durch Disproportionierung entstehenden Vinylketone (Abb.26 z.B. das 1-Octen-3-on) und flüchtigen Aldehyde (die erst sekundär, wahrscheinlich durch Zerfall der Hydroperoxide (Abb.27), entstehen) machen den Großteil des "off flavours" aus. Dabei ist die Reaktionsfähigkeit

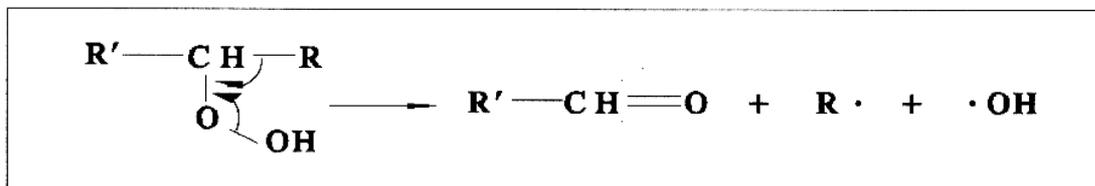
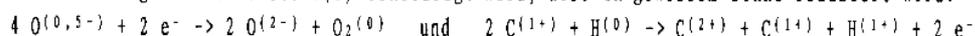


Abb.27 Zerfall von Monohydroperoxiden zu Aldehyden [24, S.74]

der Fettsäuren (Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt mit der Anzahl der Doppelbindungen zu) weniger ausschlaggebend, vielmehr sind die oftmals geringen Schwellenkonzentrationen (Tab. 3) der entstehenden flüchtigen Carbonylverbindungen für die Geschmacksveränderung verantwortlich. Darauf ist wohl auch der relativ schnelle Verderb von Butter und Rinder- bzw. Hammeltalg zurückzuführen. Diese Lebensmittel enthalten (zwar in nur geringer Konzentration) cis-11,cis-15-

* Hier werden sowohl Sauerstoff, als auch Kohlenstoff disproportioniert, wobei einem Fall die Positivierung des Kohlenstoff(I) erniedrigt wird, also in gewissem Sinne reduziert wird:



Octadecadiensäure, welche aber als Vorläufer für das cis-4-Heptanal mit besonders hohem Aromapotential gilt [24, S.74].

Verbindung	Aroma	Aromaschwelle (mg/kg)	
		Geruch	Geschmack
Pentanal	stechend	0,24	0,15
Hexanal	grasig	0,32	0,15
Heptanal	ölig, nach Kitt	3,2	0,042
Octanal	fettig	0,32	0,068
trans-2-Heptenal	fettig, nach Kitt	14,0	0,63
cis-2-Octenal	fettig, nach Walnüssen		
trans-2-Octenal	fettig	7,0	1,0
trans-2-Nonenal	talig, nach Gurken	3,2	0,1
cis-3-Nonenal	nach frischen Gurken		
trans-3-Nonenal	nach Gurken		
trans-2,trans-4-Nonadienal	fettig nach Spülwasser		
trans-2,cis-4-Decadienal	Fritieraroma	2,15	0,28
cis-4-Heptenal		0,01	0,0016
1-Octen-3-on	nach Metall		
trans-6-Nonenal		0,005	0,0004

Tab.3 Flüchtige Carbonylverbindungen aus autoxydierten Fettsäuren und Aromaschwellen von Aldehyden gelöst in Paraffinöl (Auszug aus [27, S.73,74])

2.4.3 Reaktionen während der Induktionsperiode

Licht vermag die Induktionsperiode zu verkürzen, somit die Radikalkettenreaktion schneller einzuleiten und damit kommt es zu einem frühzeitigen Verderb des Lebensmittels.

Diese Lichtempfindlichkeit der Fette ist auf die Bildung von Sauerstoff im 1. Singulettzustand (1O_2) zurückzuführen. In Abbildung 28 ist die Elektronenkonfiguration des Sauerstoffs wiedergegeben.

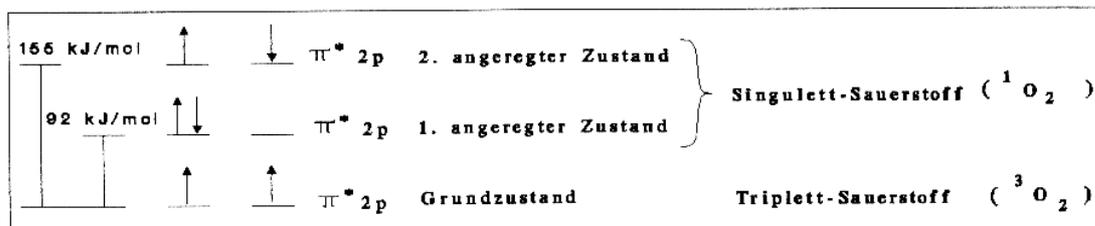


Abb.28 Elektronenkonfiguration des O_2 -moleküls, nach [27, S.394]

Für Sauerstoff im Grundzustand ($^3\text{O}_2$) sind in diesem Zusammenhang nur 1-Elektronen-Reaktionen mit Radikalen zu erwarten. Da aber im angeregten 1.Singulett-Zustand die Elektronen gepaart vorliegen, sind 2-Elektronen-Reaktionen ähnlich dem Etylen möglich, nur daß Sauerstoff elektrophiler reagiert. Durch Cyclo-Addition (Abb.29) von Singulett-Sauerstoff an die Doppelbindung der Fettsäure bilden sich Hydroperoxide, welche nach den Schritten 3 und 4 in Abbildung 25 die radikalisch verlaufende Autoxidation einleiten.

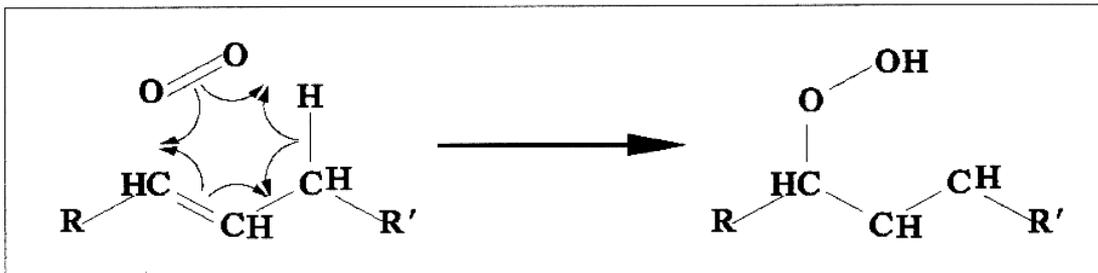


Abb.29 Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit allylständigen Doppelbindungen, nach [24, S.76]

Es stellt sich nun die Frage nach der Bildung von Singulett-Sauerstoff. In einem Modellversuch [24, S.77] wurde reine Linolsäure unter Lichteinwirkung nur in Anwesenheit von Chlorophyll beschleunigt oxidiert. Danach wird die Lichtenergie von einem Sensibilisator (neben Chlorophyll kommen noch eine Reihe weiterer Verbindungen mit Sensibilisator-Eigenschaften in fetthaltigen Lebensmitteln vor) aufgenommen und auf Sauerstoff übertragen, dieser geht dann in den angeregten Singulettzustand über (Abb.30).

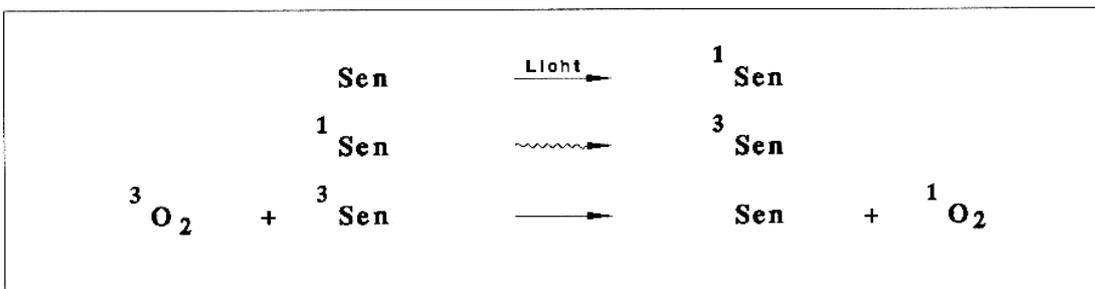


Abb.30 Bildung von Singulett- O_2 bei der sensibilisierten Photooxidation, nach [24, S.77]

2.4.5 Methoden zur Verlängerung der Haltbarkeitszeit von fetthaltigen Lebensmitteln

Als Maß für die Haltbarkeit wird die Induktionsperiode herangezogen, da die folgenden Reaktionen vergleichsweise schnell ablaufen. Um diesen Abschnitt der Fettoxidation zu verlängern, kommen verschiedene physikalische und chemische Methoden zur Anwendung.

Speiseöle werden in gelben oder braunen Flaschen oder in Blechdosen verkauft. Diese Maßnahme, einmal abgesehen von den vollen Lichtschutz bietenden Blechumhüllungen, beruht auf der unterschiedlichen Lichtempfindlichkeit bei verschiedenen Wellenlängen (Abb.31). Dennoch werden einige fetthaltige Lebensmittel (z.B. Milch) nicht lichtgeschützt verpackt. Der Grund dafür ist sicherlich kosmetischer Natur, aber viele Lebensmittel unterliegen auch einem weitaus schnellerem Verderb anderer Ursache, so daß hier die Fettoxidation kaum eine Rolle spielt.

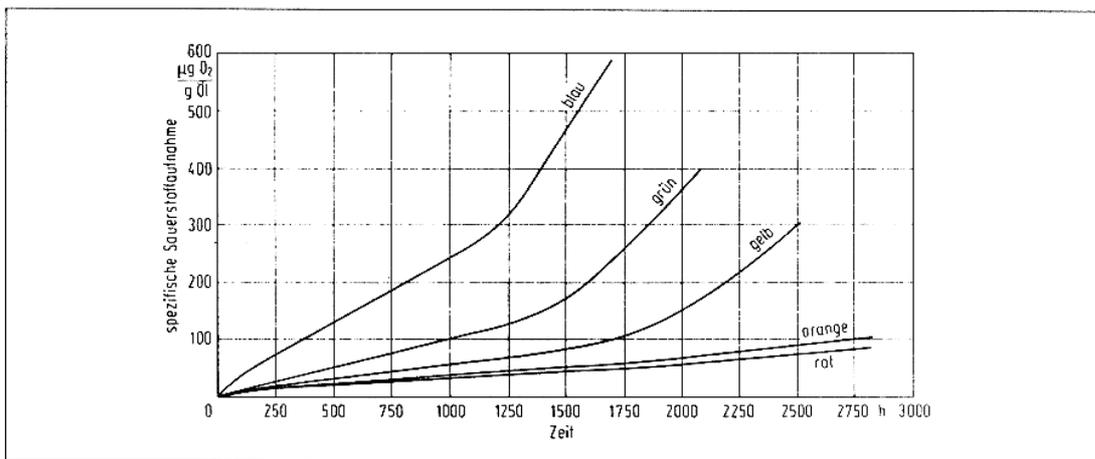


Abb.31 Sauerstoffaufnahme von Sojaöl bei verschiedenen Wellenlängen [25, S.43]

Die Oxidationsgeschwindigkeit ist in einem weiten Bereich nur wenig vom Sauerstoffpartialdruck abhängig [25, S.44]. Dies ist angesichts der niedrigen Geruchs- und Geschmackschwellenwerte der auftretenden Verderbsprodukte verständlich. Erst bei einem wesentlich verminderten Sauerstoffpartialdruck (0 bis 10 mbar) findet eine deutliche Senkung der Reaktionsgeschwindigkeit statt. Dies ist technisch am besten durch eine Schutzgasatmosphäre zu erreichen.

Antioxidationsmittel. Vitamin E (Tocopherol) und Vitamin C können erfolgreich als Radikalfänger zur Haltbarmachung von Fetten eingesetzt werden [1, S.203]. Am besten wirkt eine Kombination aus beiden Verbindungen, wobei anstatt der Ascorbinsäure das fettlösliche Vitamin C-Derivat Ascorbyl-6-palmitat verwendet wird. Die Mischung bewirkt eine Haltbarkeitsverlängerung die durch Vitamin E allein nicht erzielt werden kann (Abb.32). Ein einfaches Erklärungsmodell für dieses Phänomen zeigt Abbildung 33. Danach ist Tocopherol der eigentliche Wirkstoff, es wird, durch die aus der Kettenreaktion gebildeten Peroxylradikale, zum Chromanoxyl-Radikal umgesetzt. Dieses Radikal ist zu reaktionsträge um die Kettenreaktion fortzuführen, es kann aber durch Ascorbylpalmitat (welches nicht mit den Peroxyl-Radikalen reagieren soll [12, S.64]) regeneriert werden und steht so erneut als Radikalfänger zur Verfügung. Dieses Modell stellt den Inhibitionsvorgang sicherlich vereinfacht da, so spielen beispielsweise auch direkte Wechselwirkungen gewisser Fettsäuren mit Ascorbylpalmitat eine Rolle [1, S.204].

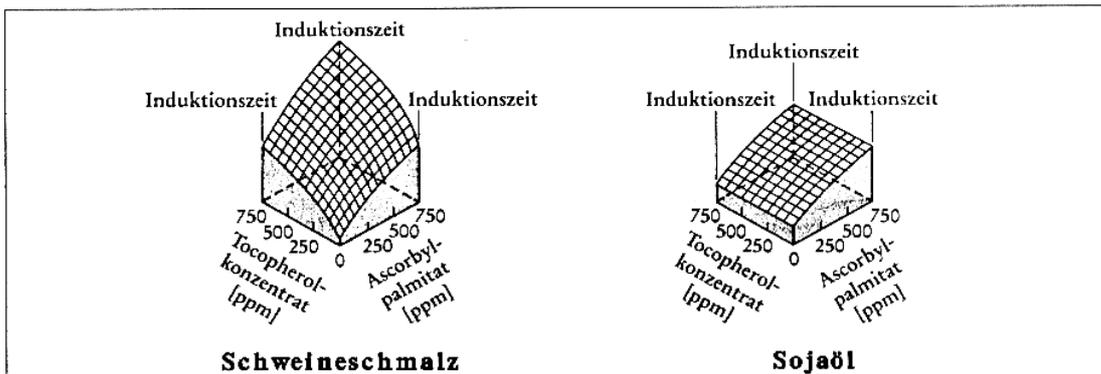


Abb.32 Einfluß von Tocopherol und Ascorbylpalmitat auf die Oxidationsstabilität von Fetten [1, S.203]

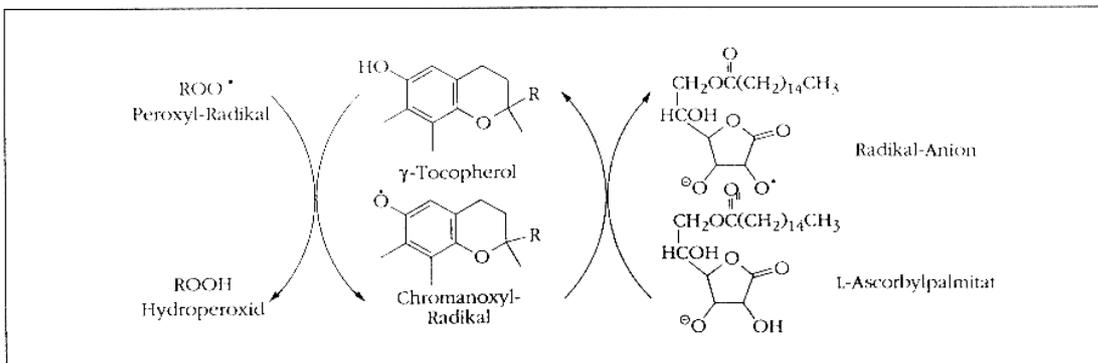


Abb.33 Reaktion von Tocopherol mit Peroxyl-Radikalen und Regeneration durch Ascorbylpalmitat [1, S.204]

2.5 Andere Ursachen für einen Sauerstoffverbrauch von Lebensmitteln

Neben der enzymatischen Bräunung, der Fettoxidation und einem Sauerstoffverbrauch durch Vitamin C gibt es eine Reihe weiterer Ursachen für einen Sauerstoffverbrauch von Lebensmitteln. Hat der Einfluß von Sauerstoff eine qualitätsmindernde Auswirkung auf das Lebensmittel, so kann unter Einbeziehung aller diesbezüglichen Vorgänge eine spezifische Sauerstoffempfindlichkeit oder -toleranz bestimmt werden. In der Regel geschieht dies durch sensorische Analyse von Geschmack, Geruch, Farbe und Konsistenz. So wurden unter Vernachlässigung der Diffusion* folgende Werte für höchstzulässige Sauerstoffaufnahme gefunden (in mg/kg) [25, S.38 und 28, S.52]: Bier 1-4, Wein 3, ultrahocherhitzte Milch 1-8, Kartoffelflocken 10-40, Volleipulver 35, Coca-Cola 40, Tomatenketchup 70, Fruchtgetränke mit Zitrusaroma 20, Röstkaffee 15 und Emmentaler Käse 420.

Neben allen essentiellen Fettsäuren und Vitamin C sind die Vitamine A und E sowie einige Aminosäuren (Arginin, Histidin Lysin, Methionin) sauerstoffempfindlich.

Die Oxidation von rotem Myoglobin zu braunem Metmyoglobin ist die Ursache, warum Fleisch unter Sauerstoff- und Hitzeeinwirkung eine "unansehnliche" Farbe annimmt. Daher werden viele Fleischwaren mit Natriumnitrit behandelt; es entsteht rotes Nitrosomyoglobin, welches das typische Aussehen von Pökelfleisch ausmacht.

Stoffwechselfvorgänge in weitgehend noch intakten Organismen (Zellatmung in frischem Obst und Gemüse) können große Mengen an Sauerstoff umsetzen. Diese Eigenschaft wird z.B. bei der Lagerung von Äpfeln unter CO₂ ausgenutzt**. So erzeugt das Obst in speziellen Lagerräumen seine Schutzgasatmosphäre durch die Veratmung von anwesendem Sauerstoff selbst.

* Der Sauerstoff muß erst einmal in das Lebensmittel eindringen, so wurden zur Bestimmung der Toleranzgrenzen dünne Schichten von Lebensmitteln eingesetzt, der Sauerstoffverbrauch gemessen und die Verkäuflichkeitsgrenze sensorisch bestimmt [29].

** Telefonische Auskunft des Bundessortenamtes, Prüfstelle Würzen

Neben diesen endogenen Ursachen können auch sekundäre Einflüsse wie Mikroorganismen für einen Verbrauch von Sauerstoff verantwortlich sein. Beispielsweise ist halbgebackenes, zum Aufbacken bestimmtes Brot wegen der hohen Oberflächenfeuchtigkeit sehr anfällig gegen Schimmelpilzbefall. Um diesem Umstand Abhilfe zu verschaffen, wird das Brot in einer Schutzgasverpackung aus Verbundmaterial unter CO₂ verpackt. Die Firma Harry-Brot verwendet zwei unterschiedliche Folienverpackungen: Schlauchbeutel und Tiefziehfolien. Der technisch bedingte Restsauerstoffgehalt in der ersten beträgt 0,2 %, in der zweiten 1,2 % und es gibt einen direkten Zusammenhang zwischen Restsauerstoffgehalt und Mindesthaltbarkeitszeit*.

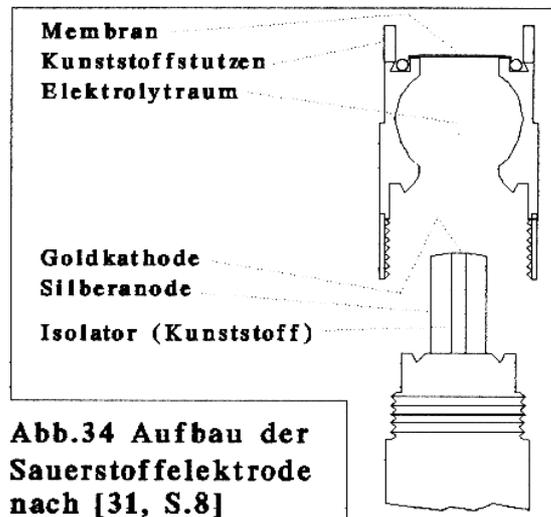
* Telefonische Auskunft der Firma Harry-Brot / Hannover

3. Material und Arbeitstechniken

Um quantitative Sauerstoffmessungen in Lösungen durchzuführen, muß der Einfluß von Luft ausgeschlossen werden. Die für diesen Zweck entwickelten Versuchsapparaturen bestanden größtenteils nicht aus den üblichen Laborgeräten, sondern wurden aus möglichst leicht zu beschaffenden Gerätschaften des klinischen und alltäglichen Bedarfs konstruiert. Kernstück für alle Gelöstsauerstoff-Messungen waren die Sauerstoffmeßgeräte OXI 92 und 96 der Firma WTW. Weiterhin wurden die laborüblichen Chemikalien (zum größten Teil Analysequalität) und zwei Schnelltestsysteme der Firma Merck ("Aquamerck-Sauerstoff"-Test nach WINKLER und "Merckoquant-Ascorbinsäure"-Teststäbchen) verwendet.

3.1 Die Sauerstoffmeßgeräte

Die beiden verwendeten Geräte (OXI 92 und 96) der Firma WTW unterscheiden sich weitgehend nur in der Signalverarbeitung, der Aufbau der Sonde (Abb.34) ist identisch. Die Temperaturkorrektur erfolgt über einen in die Elektrode eingebauten Temperaturfühler. Während beim OXI 92 der Luft-



druck mit einem mitgelieferten Barometer bestimmt und am Gerät eingestellt werden muß, erfolgt die Druckkorrektur im OXI 96 automatisch über einen eingebauten Druckfühler und es ist eine Salzkorrektur möglich, die am OXI 92 über eine veränderte Eichung erfolgen muß.

Da der Sensor nullstromfrei (vergl. Abb.4 Strom/Spannungskurve für Sauerstoff) arbeitet, ist eine Einpunkteichung möglich. Die Eichung erfolgt an wasserdampfgesättigter Luft. Dabei wird der Wert für den Sauerstoffsättigungsindex auf 102% eingestellt (beim Oxi 96 erfolgt dies automatisch beim Drücken der Taste "cal"), dies entspricht dann einem Wert von 100% in luftgesättigtem Wasser.

Technische Daten [31]

Drift:	< 1 digit/24h
Polarisationsspannung:	790 mV \pm 10 mV (Dauerpolarisation, auch im ausgeschalteten Zustand)
Ansprechzeit:	90 % des Endwertes nach < 10s (20°C) 99 % des Endwertes nach < 40s (20°C)
Nullstrom:	nullstromfrei
Mindestanströmung:	15 cm/s

3.2 Versuchsaufbauten

In Vorversuchen wurden meist Bechergläser oder Erlenmeyerkolben als Meßgefäße verwendet. Es stellte sich jedoch schnell heraus, daß der Einfluß der Luft erhebliche Störungen verursachte. Daraufhin wurden mehrere Apparaturen entwickelt, die einen Kontakt der Luft mit der zu messenden Flüssigkeit ausschlossen.

Apparatur 1, Abb.35: Es wurde ein 60 ml Standzylinder als Meßgefäß benutzt. Die Meßsonde (OXI 92) wurde mittels eines durchbohrten Stopfens aufgesetzt. Zum Befüllen der Apparatur und zum Spülen mit Stickstoff oder Sauerstoff dient eine Kanüle, die mit einem dünnen Schlauch verbunden ist, welcher bis zum Boden des Standzylinders reicht. Für den Druckausgleich sorgt eine weitere, etwas dünnere Kanüle. Beide Kanülen werden durch den Stopfen gestochen und verbleiben dort. Während der Messung können sie mit kleinen Stopfen verschlossen werden. Das Volumen beträgt ca. 50 ml, muß aber bei jedem Versuchsansatz neu bestimmt werden.

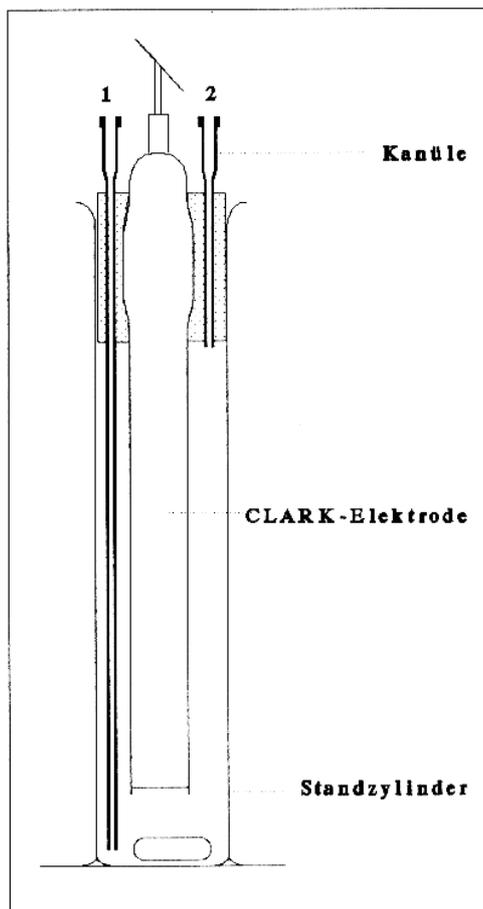


Abb.35 Apparatur 1

Diese Apparatur diente neben der direkten Messung auch zum Einstellen definierter Sauerstofflösungen, welche dann in Apparatur 2 überführt wurden.

Apparatur 2, Abb.36: Um Proben während der Sauerstoffmessung entnehmen zu können, wurde dieser Versuchsaufbau modifiziert. Die Meßsonde (OXI 96) wurde in den Gummikolben einer 50 ml Perfusorspritze eingebaut. Somit können Proben entnommen werden ohne das eine Gasphase mit dem Reaktionsgemisch in Berührung kommt. Ein weiterer Vorteil besteht darin, auch kleinere Proben volumina einsetzen zu können. Damit konnten beispielsweise Saftproben einer Frucht in verschiedenen Ansätzen und unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Das jeweilige Probevolumen wird anhand der Skaleneinteilung der Perfusorspritze eingestellt. Dabei wird das Volumen des Rührfisches und der überstehenden CLARK-Elektrode mit 1 ml berücksichtigt.

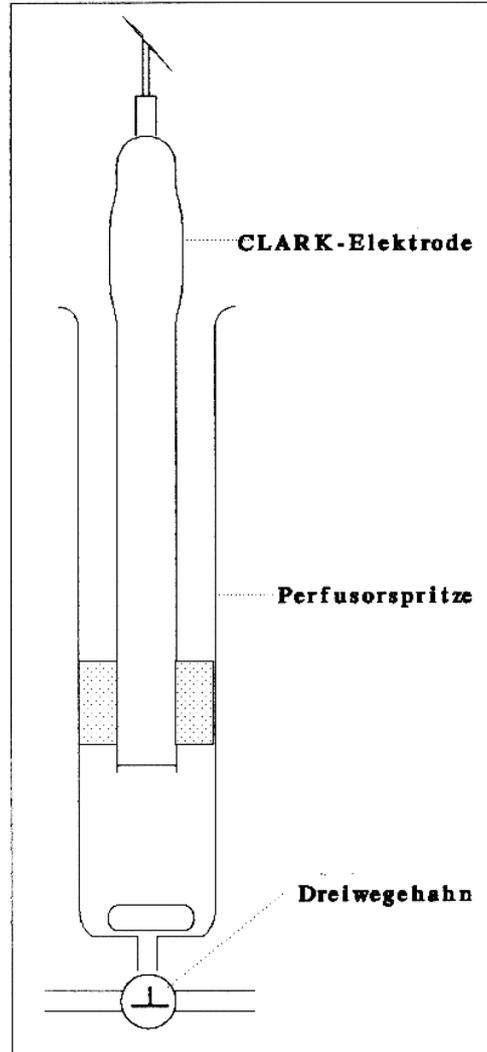


Abb.36 Apparatur 2

Ein gewisser Nachteil ergibt sich allerdings daraus, daß der Temperatursensor der Meßzelle bei dieser Variante nicht mehr direkt mit der Probe in Kontakt steht. Allerdings sind die daraus resultierenden Fehler als gering einzuschätzen, da (wie Temperaturmessungen zeigten) die Temperatur von Probe und Umgebung nahezu gleich gehalten werden kann.

Apparatur 3, Abb.37: Um direkt nebeneinander polarographisch und photometrisch in ein und derselben Lösung messen zu können, wurde Versuchsanlage 2 erweitert. Zunächst mußte ein geeignetes Photometer gefunden werden, welches

sich einfach in den bisherigen Versuchsaufbau integrieren ließ. Mit dem "Aquanal-plus"-Photometer als kleines tragbares Gerät wurde ein Kompromiss gefunden. Die Verdunklung des Meßraumes geschieht durch einfaches Aufstecken einer Kunststoffkappe und die Küvetten ragen aus dem Gehäuse heraus. Die Küvetten selbst sind rund und groß genug um eine gute Verbindung und Vermischung mit dem restlichen Probevolumen zu gewährleisten. Leider ist die Extinktionsmessung nur bei vier fest eingestellten Wellenlängen möglich (635, 585, 565 und 480 nm).

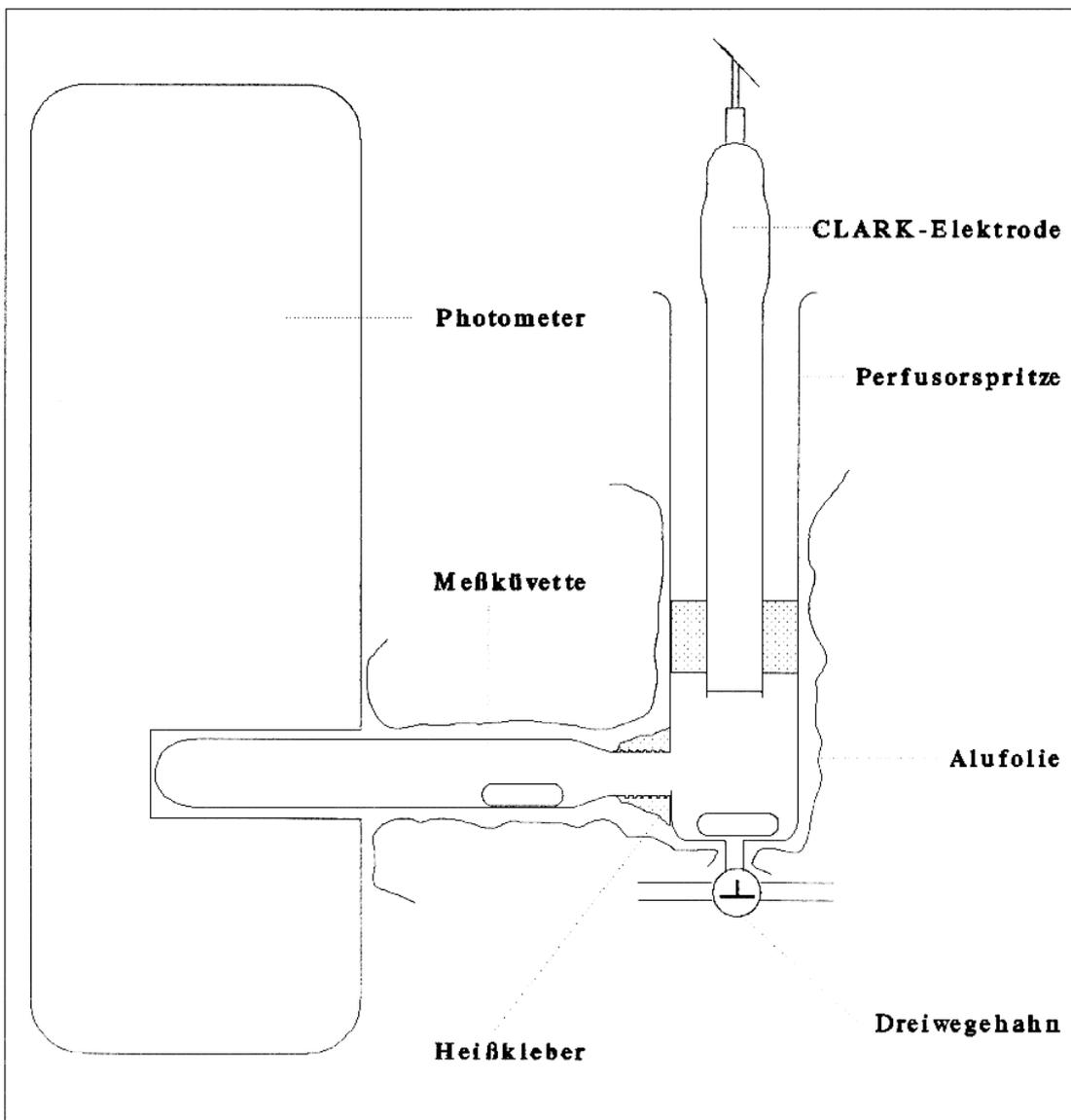


Abb.37 Apparatur 3

Die Perfusorspritze wurde am unteren Ende seitlich durchbohrt und die Küvette dort rechtwinklich nach außen luft- und flüssigkeitsdicht mit Heißkleber fixiert. Als Schutz gegen einfallendes Licht dient Aluminiumfolie. Ein zweiter Rührfisch in der Küvette sorgt für eine gute Durchmischung im ganzen Flüssigkeitsraum.

Abschließend wurde dieser Aufbau mit Kaliumpermanganat getestet. Gute Ergebnisse wurden erzielt, wenn direkt nach dem Einspritzen der zweiten Flüssigkeitsportion (in diesem Fall Permanganat-Lösung) ein Magnet über der Küvette etwa eine Minute hin und her bewegt wurde.

Apparatur 4, Abb.38: Dieser Versuchsaufbau schließlich stellt die Biosensoren für die Bestimmung von Ascorbinsäure und Brenzcatechin dar.

Der Sauerstoffgehalt der Probe wurde konstant gehalten, dies geschah durch Einblasen von Luft. Auf der Membranoberfläche der Meßzelle wurde enzymatisches Material so fixiert, daß Sauerstoff und Substrat nur in dieser Region miteinander reagieren können. Der aus dieser enzymatischen Reaktion resultierende Sauerstoffverbrauch kann zur quantitativen Bestimmung des Substrats herangezogen werden.

Biosensor zur Bestimmung von o-Dihydroxyphenolen. Es wurde ein etwa 2 mal 2 cm großes Stück Bananenschale mit der Innenseite nach außen über den Sauerstoffsensoren (OXI 92) gestülpt und mittels eines Gummiringes befestigt (Abb.39B). Da die Polyphenoloxidasen am Pflanzengewebe gebunden sind, bleiben sie in der Bananenschale lokalisiert. Um eine ausreichende Sauerstoffdiffusion zu gewährleisten, muß die Bananenschale möglichst dünn sein. Deshalb wurden relativ "alte" schon stark gebräunte Bananen verwendet, da hier die Schale etwas dünner ist. Außerdem wurde ein Großteil des anhaftenden Pflanzengewebes mit der stumpfen Seite eines Küchenmessers vorsichtig abgeschabt.

Biosensor zur Bestimmung von Ascorbinsäure. Es diente Salatgurkensaft als enzymatisches Material. Mit diesem Saft befeuchtete Küchenpapierstückchen wurden auf die Membranoberfläche des O₂-Meßgerätes gelegt und mit Einmachhaut (Zellglas, Firma Folia) fixiert (Abb.39A).

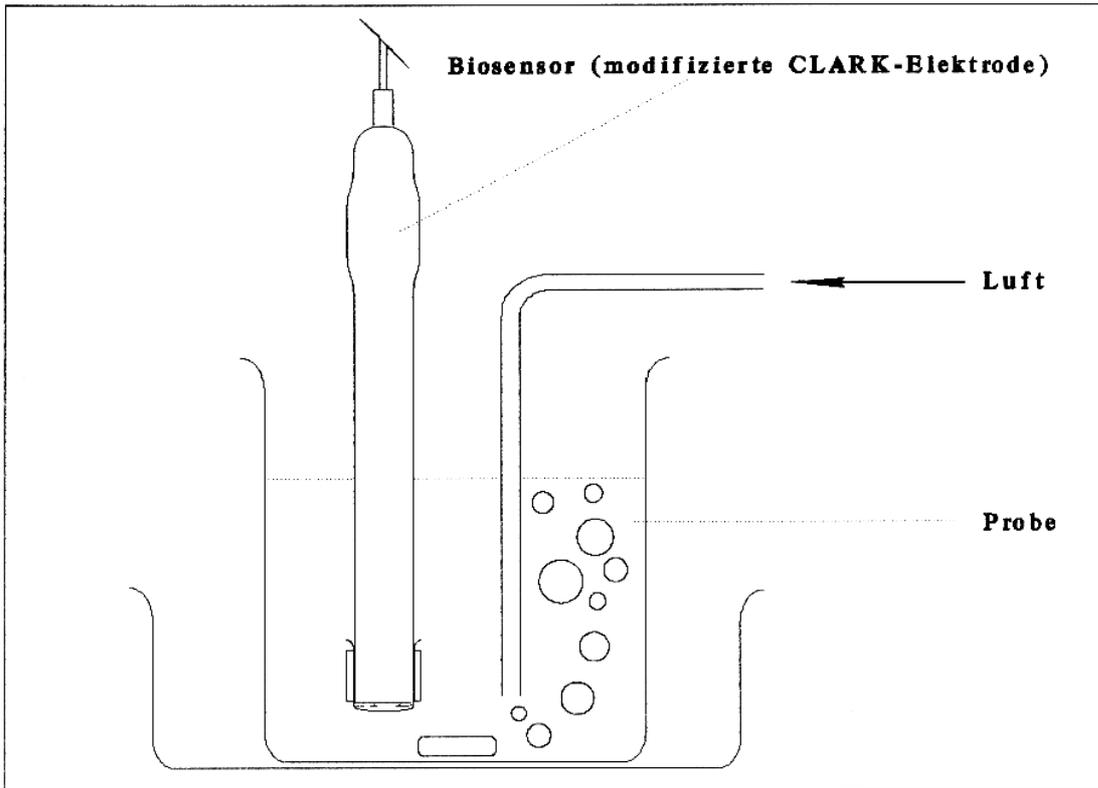


Abb.38 Apperatur 4

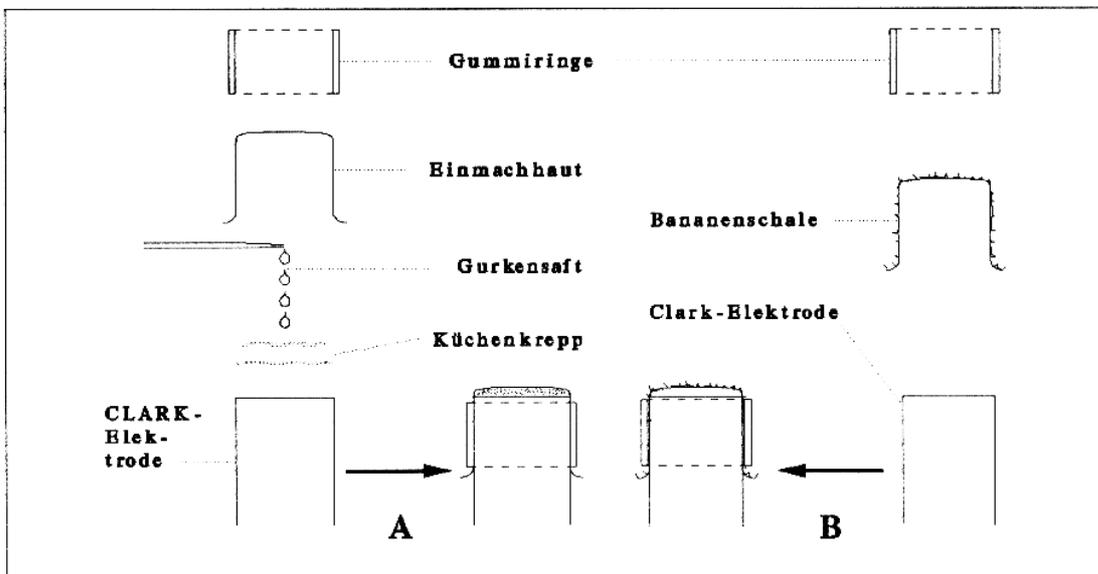


Abb.39 Aufbau der Biosensoren (A: Ascorbinsäuresensor, B: Sensor zur Bestimmung von o-Dihydroxyphenolen)

Um die enzymhaltigen Präparate möglichst enganliegend auf der CLARK-Meßzelle zu befestigen, mußten in beiden Fällen die kleinen Kunststoffstutzen am Membrankopf (Abb.34) entfernt werden. Die Eichung des O₂-Sensors erfolgte einmal (vor der Modifikation) auf 102%. Aufgrund des höheren Diffusionswiderstandes (nach Aufbringen der Enzymschicht), stellte sich ein geringerer Wert ein. Alle folgenden Eichungen erfolgten auf diesen Wert.

3.3 Arbeitstechniken unter Luftausschluß

Mit den Apparaturen 1-3 unter Zuhilfenahme von Stickstoff und Kohlendioxid als Schutzgase kann der Sauerstoffeinfluß der Luft weitgehend verhindert werden. Für das Überführen von Lösungen haben sich Spritzen, Schläuche und Dreiwegehähne aus dem klinischen Bedarf bewährt. Diese Hilfsmittel weisen eine ausreichende Gasdichtigkeit auf und sind mit Normverbindungen ausgestattet. Neben der Art und Weise des Überführens, ist für die Messung auch die Reihenfolge der Zugabe entscheidend. Die Verfahrensweisen werden im folgenden ausführlich beschrieben.

3.3.1 Aufarbeitung der Proben:

- **Lagerung:** Früchte, die nicht sofort nach dem Kauf verarbeitet werden konnten, wurden in einem Kunststoffbeutel mit Kohlendioxid begast, verschlossen und im Kühlschrank aufbewahrt.

- **Pressmethode:** *Der Apfel wurde in einem Baumwollsäckchen untergebracht und kam in einen Gefrierbeutel ("Topits"). Es erfolgte eine Stickstoffspülung. Der Beutel wurde verschlossen, darauf erfolgte eine Ruheperiode um restlichen Sauerstoff, der sich noch im Apfel befinden kann, durch Diffusion zu verdünnen. Nach einer zweiten Stickstoffspülung wurde dieser Beutel in einen weiteren Beutel ("gelber Sack"), welcher auch mit Stickstoff gefüllt wird, überführt. Nach Verschuß und Umwickeln mit einem Handtuch wurde eine Holzplatte aufgelegt und mit einem Hammer einige Male kräftig auf die Platte geschlagen. Eine weitere Zerkleinerung erfolgte durch Kneten in der Hand. Ist der Apfel genügend zerkleinert, kann man nun mit vorsichtigem Druck den*

Saft durch den Stoff abpressen. In der Gefrierbeutelecke sammelte sich nun ausreichend Saft für die Messung.

Die Saftentnahme geschah folgendermaßen:

- 60ml-Spritze mit Stickstoff aus dem äußeren Beutel spülen*
- Spritze mit Stickstoff aus dem inneren Beutel spülen*
- Probe entnehmen*
- Kanüle mit Stopfen oder Dreiwegehahn sichern*

Diese Technik wurde für alle zu untersuchenden Früchte angewendet. Bei weichen Früchten (z.B. Tomaten) entfiel allerdings die grobe mechanische Zerkleinerung mit dem Hammer.

Für die Bestimmung der Sauerstofflöslichkeit in Fruchtsaft/Wasser-Mischungen wurde sauerstofffreier, vollständig oxidierter Fruchtsaft benötigt.

- Herstellung von sauerstofffreiem ausoxidiertem Fruchtsaft:

- Frucht ohne Schutzgas pressen*
- Saft 3 Stunden unter Lufteinwirkung rühren (Magnetrührer)*
- Saft im siedenden Wasserbad 15 Minuten erhitzen*
- Saft in Apparatur 1 solange unter Rühren mit N₂ begasen bis die Anzeige des Meßgerätes Null zeigt*
- Saft über Kanüle 1 mittels einer mit Stickstoff gespülten Spritze mit Dreiwegehahn entnehmen*

3.3.2 Befüllen der Apparaturen

- *Apparatur 1, Variante 1: Um den Sauerstoffgehalt der Probe aufzunehmen wurde der Fruchtsaft als erstes eingefüllt und anschließend sauerstoffreiches Wasser aufgefüllt. Die Versuchsanordnung muß vollständig gefüllt sein.*

- *Volumenbestimmung und Berechnung des Volumenanteils der Probe für die gewünschte Verdünnung*
- *Apparatur mit N₂ spülen bis die Anzeige des Meßgerätes den Wert Null anzeigt*
- *Einfüllen der Fruchtsaftprobe über Kanüle 1*
- *Meßwert notieren*
- *Einfüllen von sauerstoffreichem Wasser bis alles Gas aus der Apparatur verdrängt ist. (eventuell Versuchsaufbau schräg halten). gleichzeitig Uhr starten*
- *Messung beginnen*

Es hat sich gezeigt, daß die Fruchtsäfte nach dem Pressen keinen Sauerstoff enthielten (wahrscheinlich wurden Sauerstoffreste durch Oxidation von Inhaltsstoffen entfernt). Daher kann die Reihenfolge der Zugabe auch umgekehrt geschehen.

- *Apparatur 1, Variante 2:*

- *Volumenbestimmung und Berechnung des Volumenanteils der Probe für die gewünschte Verdünnung*
- *Wasser einfüllen*
- *Wasser unter Rühren mit O₂ begasen*
- *Meßwert aufnehmen*
- *Probe einfüllen, Uhr starten, Meßwerte aufnehmen*

- **Apparatur 2:**

- *Vorsichtig sauerstoffreiche Lösung über Dreiwegehahn ansaugen (kein Vakuum ziehen)*
- *Versuchsaufbau drehen und durch leichtes Klopfen Gasblasen zur Spritzenöffnung bringen*
- *Gasreste und überschüssige Flüssigkeit aus der Apparatur drücken bis das gewünschte Volumen erreicht ist*
- *Dreiwegehahn verschließen*
- *Meßwert aufnehmen*
- *Dreiwegehahn mit der Probe spülen, damit keine Luftbläschen in die Apparatur gelangen*
- *Apparatur über den Dreiwegehahn mittels einer Spritze bis zum gewünschten Endvolumen mit der Probe auffüllen, Uhr starten*
- *Messung beginnen*

- **Apparatur 3:** (Modellversuch zur Enzymatischen Bräunung)

- *gepufferte Enzymlösung mit O_2 aus der Gasflasche sättigen und in die Apparatur überführen*
- *Photometer auf 480 nm einstellen und kalibrieren*
- *O_2 -Meßwert aufnehmen*
- *Substratlösung durch Einleiten von Stickstoff (Apparatur 1) von Sauerstoffresten befreien*
- *Hemmstoff einwiegen und in die zur Aufnahme der Substratlösung bestimmten Spritze überführen*
- *Spritze über Dreiwegehahn mit N_2 spülen*

- *Substratlösung aufnehmen, schütteln und N₂-Gasbläschen aus der Spritze drücken*
- *Dreiwegehahn des Versuchsaufbaus mit Substrat/Hemmstoff-Lösung spülen*
- *Apparatur bis zum gewünschten Endvolumen mit Substrat/Hemmstoff-Lösung über Dreiwegehahn auffüllen, Uhr starten*
- *Extinktions- und O₂-Meßwerte aufnehmen*

Da einige Saftproben den gelösten Sauerstoff vollständig verbrauchten, wurde versucht den Sauerstoff nachzudosieren. Dies kann auf unterschiedliche Weise geschehen. Einerseits kann direkt Gas nachgeliefert werden, oder es wurde sauerstoffreiches Wasser aufgefüllt, was eine weitere Verdünnung der Probe zur Folge hat.

- *Nachdosieren von gelöstem Sauerstoff (unter gleichzeitiger Verdünnung der Probe)*

- *Apparatur 1, Variante 2*
- *Messung durchführen bis aller Sauerstoff verbraucht ist*
- *einen definierten Volumenanteil der Saft-Wasser-Mischung über Kanüle 1 entnehmen*
- *sauerstoffreiches Wasser über Kanüle 1 zugeben bis die Apparatur vollständig gefüllt ist*
- *gegebenenfalls Vorgang wiederholen*

- *Nachdosieren von Sauerstoffgas*

- *Dreiwegehahn auf Kanüle 1 anbringen*
- *Messung durchführen bis aller Sauerstoff verbraucht ist*
- *etwas Mischung über den Dreiwegehahn entnehmen, Spritze aufgesteckt lassen*

- *O₂ aus der Gasflasche über den Dreiweghahn 30 Sekunden in die restliche Mischung einleiten*
- *entnommene Mischung wieder zufügen*
- *Messung fortführen*
- *gegebenenfalls Vorgang wiederholen*

Diese beiden Methoden wurden allerdings nur in Vorversuchen (Abb.40) angewendet, da sie einige Nachteile beinhalten: erstens ist der Sauerstoffverbrauch während des Nachdosierens nicht zu bestimmen und zweitens wird aufgrund der Verdünnung durch sauerstoffreiches Wasser die Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt; oder ein gewisser Teil der Mischung verläßt (durch das Einleiten von O₂) als Aerosol den Versuchsaufbau, damit entstehen unvermeidlich Gasblasen nach dem Wiederaufgeben der entnommenen Mischung, was ein Nachlösen von Sauerstoff zur Folge haben kann.

Um einen vollständigen Verbrauch zu verhindern, wurden im allgemeinen O₂-gesättigte Lösungen verwendet und mit niedrigeren Saftanteilen gearbeitet.

3.4 Sauerstofflöslichkeit in den verwendeten Medien

Da chemisch indifferente Stoffe die Löslichkeit von Sauerstoff im allgemeinen herabsetzen, kommt es unweigerlich zu Problemen bei Sauerstoffmessungen in Lebensmitteln. Zum einen enthalten die zur Messung verwendeten Fruchtsäfte eine nicht unbeträchtliche Menge an gelösten Stoffen (Zucker, Säuren etc.), zum anderen wurden den Saft/Wasser-Mischungen in vielen Fällen Zusatzstoffe beigegeben. Wie bereits erwähnt, sind die Sauerstoffmeßgeräte nicht dazu in der Lage den absoluten Sauerstoffgehalt einer Probe zu messen. Sie registrieren vielmehr die Aktivität und berechnen daraus die Konzentration, welche sich auf reines Wasser bezieht. Die Methode von CLARK wird somit in Saft/Wasser-Mischungen, Pufferlösungen und so weiter immer einen höheren Wert anzeigen.

Um eine Korrektur vorzunehmen wurde anfangs mit der WINKLER-Methode gearbeitet. Es zeigte sich jedoch schnell, daß Inhaltsstoffe der Probe oder einige zugesetzte Stoffe auch

hier zu unzuverlässigen Werten führten. So wurden in Glucoselösungen geringere Werte angezeigt, ein Umstand der wahrscheinlich auf einer Oxidation von Glucose durch gelösten Sauerstoff, im teilweise alkalischen Milieu, des WINKLER-

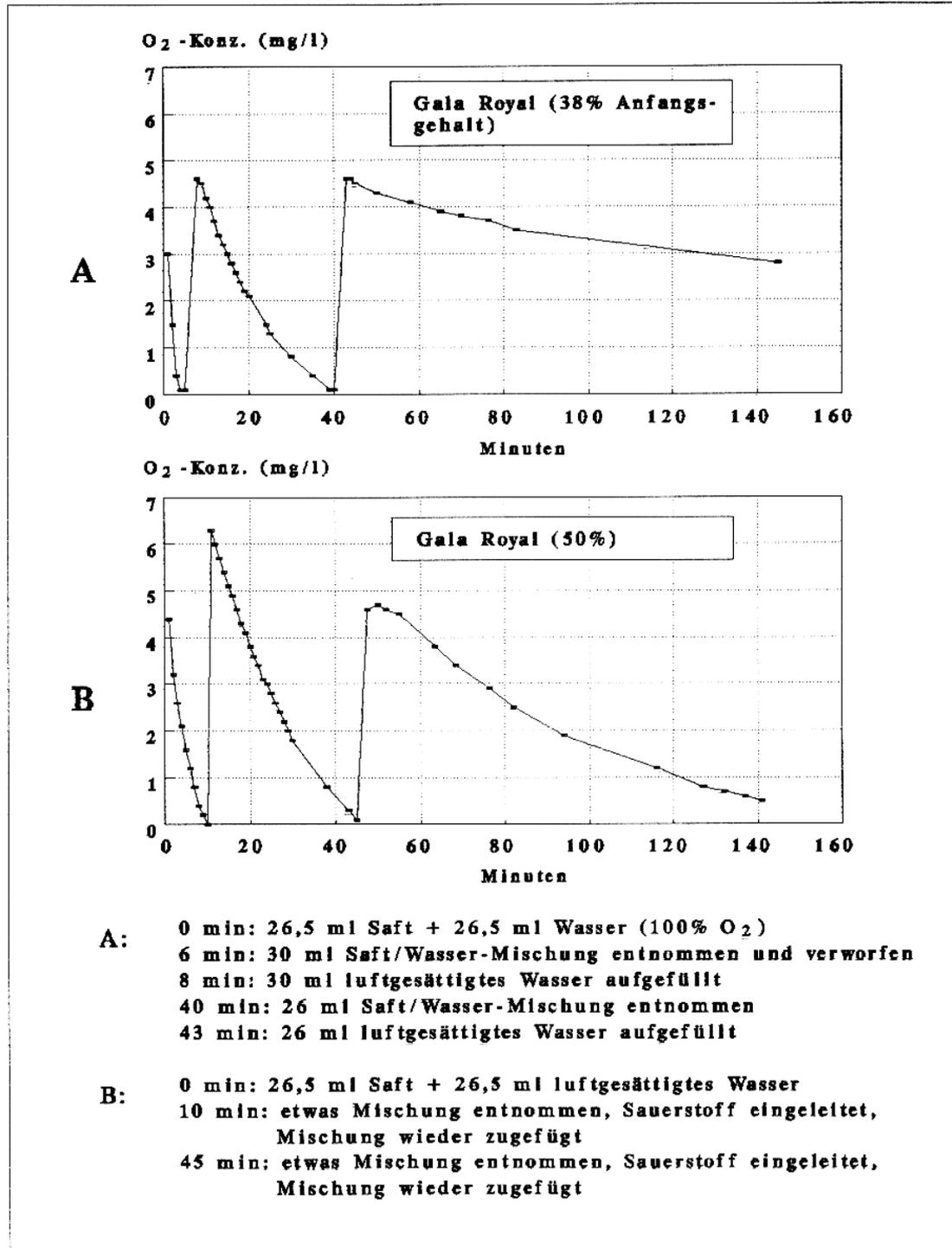


Abb. 40 Nachdosieren von Sauerstoff in Saft/Wasser-Mischungen, mit verschiedenen Methoden

Tests beruht. Weiterhin reagierten Zusätze wie EDTA oder Diehyldithiocarbaminat mit den Reagenzien und machten eine Sauerstoffmessung unmöglich.

Tabelle 4 zeigt einen Vergleich der beiden Bestimmungsmethoden für Sauerstoff in unterschiedlichen Medien. Ausgegangen wurde von sauerstoffhaltigem, destilliertem Wasser, welches nach der Meßwertaufnahme (Apparatur 2) mit einer sauerstofffreien Glucose-, Saccharose- oder Kochsalzlösung im Verhältnis 1:1 gemischt wurde. Nach der Sauerstoffbestimmung dieser Mischung durch die CLARK-Meßzelle wurde eine Probe aus der Apparatur entnommen und nach WINKLER bestimmt.

	Wasser vor der Mischung (nach CLARK)	Mischung (1:1) (nach CLARK)	Mischung (1:1) (nach WINKLER)	Mischung (1:1) erwarteter Wert
Saccharose (0,55 mol/l)	10,4	6,0	5,15	5,20
	9,9	5,9	4,90	4,95
Glucose (0,55 mol/l)	14,9	8,6	6,50	7,45
	9,0	5,0	3,95	4,50
Kochsalz (0,275 mol/l)	9,0	5,0	4,55	4,50
	16,3	9,2	8,05	8,15

**Tab.4 Vergleich der zweier O₂ -Bestimmungsmethoden
(Konzentrationsangaben in mg/l)**

Da Fruchtsäfte ein komplexes Gemisch darstellen, ist also nicht auszuschließen, daß es auch hier bei beiden Methoden zu Fehlern kommen kann. Daher wurde ein anderes Verfahren verwendet, um die Abweichungen, die mit der polarographischen Meßtechnik entstehen, zu korrigieren. Auch hier wurde wieder von O₂-haltigem destilliertem Wasser ausgegangen, welches mit ausoxidiertem, sauerstofffreiem Fruchtsaft gemischt wurde (Apparatur 2). Der Meßwert und der erwartete Wert der Mischung wurden ins Verhältnis gesetzt

und so ein Korrekturfaktor bestimmt (Tab.5). Das Mischungsverhältnis wurde so gewählt, daß es dem der Messung entsprach. Abbildung 41 zeigt eine typische Messung vor und nach der Korrektur.

O ₂ -Konzentration in dest. Wasser vor der Mischung (nach CLARK)	O ₂ -Konzentration in der Mischung (3:1), (CLARK)	erwarteter Wert für die Mischung (3:1)	berechneter Korrekturfaktor
7,4	5,6	4,93	0,88
7,7	5,4	5,13	0,95
25,3	19,5	16,87	0,86
26,3	19,8	17,53	0,89
15,3	11,3	10,20	0,90
			Mittelwert: 0,9

Tab.5 Bestimmung des O₂-Korrekturfaktors für eine Saft- Wasser-Mischung (Golden Delicious 33,3%), Konzentrationsangaben in mg/l

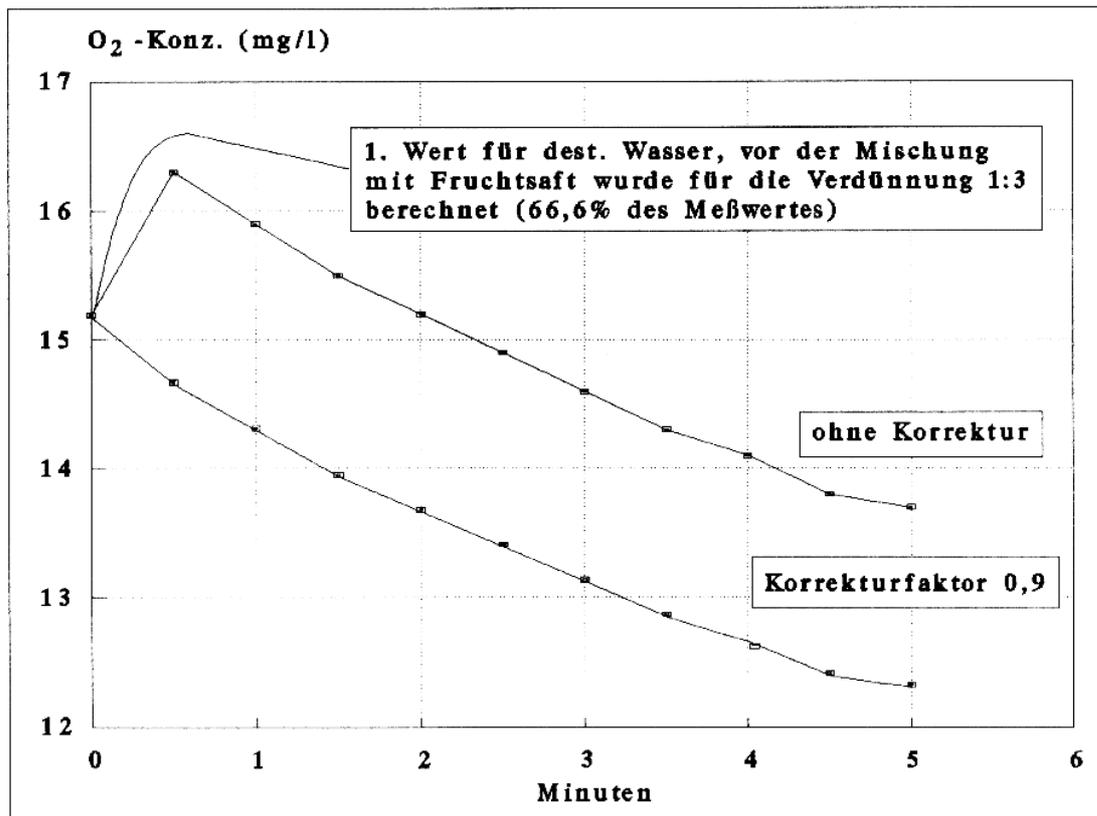


Abb.41 Sauerstoffverbrauch einer Saft-Wasser-Mischung (Golden Delicious 33,3%)

In ganz ähnlicher Weise wurde bei Lösungen mit den verwendeten Zusatzstoffen verfahren. Hierzu wurde zunächst die doppelte Konzentration als benötigt angesetzt und von gelöstem Sauerstoff durch Einleiten von Stickstoff befreit (Apparatur 1). Die Lösung wurde mit destilliertem Wasser einer definierten Sauerstoffkonzentration im Verhältnis 1:1 vermischt (Apparatur 2). Dieser Mischung wurde nun sauerstofffreier, ausoxidierter Fruchtsaft im gewünschten Verhältnis zugegeben und der Korrekturfaktor aus dem erwarteten Wert und dem Meßwert berechnet.

3.5 Sauerstoffverbrauch der Meßzelle

Die Vorgänge in dem membranbedeckten Sauerstoffsensor, die zu einem Meßsignal führen, sind mit einem Verbrauch von Sauerstoff verbunden. Bei großen Volumina und kurzen Meßzeiten ist dieser Sauerstoffverbrauch zu vernachlässigen. Bei einem kleinen Volumen fällt er jedoch ins Gewicht (Abb.42).

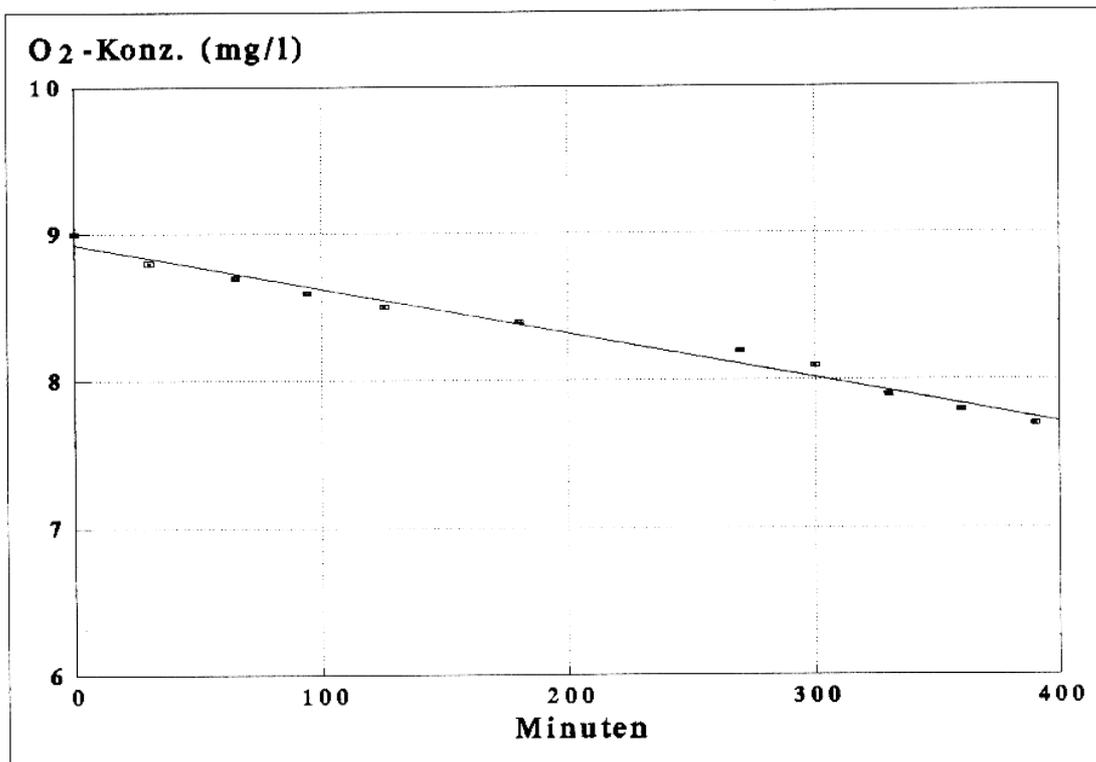


Abb.42 Sauerstoffverbrauch der Meßzelle bei einem Probevolumen von 20ml (Apparatur 2 mit dest. Wasser)

Um den Sauerstoffverbrauch einer Saft/Wasser-Mischung zu bestimmen muß der Verbrauch der Meßzelle berücksichtigt werden. Da unterschiedliche Volumina zum Einsatz kamen,

wurde der O₂-Verbrauch der Meßzelle in der Regel durch Extrapolation aus der Verbrauchskurve ermittelt. Diese Verfahrensweise ist zwar nicht ganz korrekt, da die Meßelektrode bei größeren O₂-Konzentrationen (wie sie am Anfang der Reaktion vorliegen) auch einen größeren Verbrauch aufweist. Da aber die Oxidation von Fruchtsäften gerade am Anfang relativ schnell verläuft, wird dieser Umstand nicht all zu sehr ins Gewicht fallen.

3.6 Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs eines Fruchtsaftes

Um den O₂-Verbrauch eines Fruchtsaftes zu bestimmen, muß die Sauerstofflöslichkeit und der Verbrauch der Meßzelle berücksichtigt werden. Weiterhin muß ein Sauerstoffverbrauch von Mikroorganismen ausgeschlossen werden. Wie später gezeigt wird, ist letzteres durch einen Zusatz von EDTA zu erreichen. Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

- *Verwendung einer Mischung von sauerstoffgesättigtem Wasser und sauerstofffreiem Fruchtsaft (Apparatur 2)*
- *Aufnahme der Meßwerte bis die Konzentrationsabnahme des Sauerstoffs einen linearen Verlauf zeigt*
- *Berechnung des Anfangswertes*
- *Löslichkeitskorrektur der Meßwerte nach 3.4*
- *Extrapolation des linearen Anteils der Kurve auf die y-Achse*
- *Berechnung des Verbrauchs für reinen Saft aus den erhaltenen Werten für die Fruchtsaft-Wasser-Mischung*

Die Anwendung dieser Arbeitsweise zeigt Abbildung 43. So ist in diesem Beispiel die Sauerstoffkonzentration der Mischung innerhalb von 10 Stunden von 28,2 mg/l auf 12,3 mg/l gesunken. Die Extrapolation ergibt einen Sauerstoffverbrauch für die Meßzelle von 1,7 mg/l in diesem Zeitraum. Damit ergibt sich für die 33,3%ige Saft/Wasser-Mischung ein Verbrauch von 14,2 mg/l. Der reine Saft würde dementsprechend das Dreifache verbrauchen, also 42,6 mg/l.

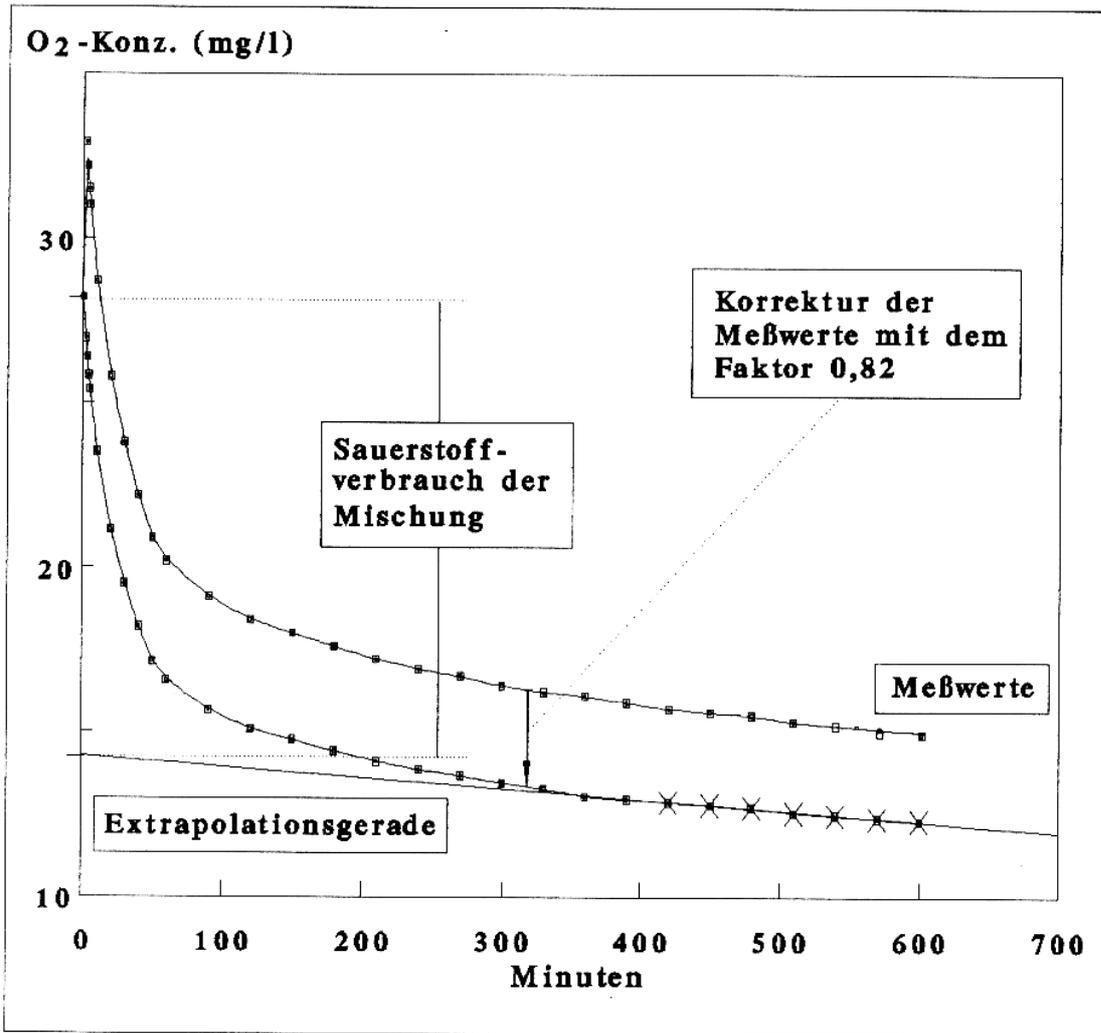


Abb.43 Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs einer Saft/Wasser-Mischung (Golden Delicious 33,3%) bei Zusatz von EDTA (Konzentration in der Mischung 0,66 mol/l)

3.7 Reagenzien und Geräte

Neben den schon besprochenen Sauerstoffmeßgeräten und einem pH-Meßgerät kamen zwei Photometer zur Anwendung. Außer für den Modellversuch (Aqualan-plus"-Photometer), wurde ausschließlich mit dem Beckmann DU7 UV/VIS Spektrophotometer gearbeitet.

Die meisten eingesetzten Chemikalien hatten Analysequalität. In einigen Fällen mußten die verwendeten Stoffe jedoch erst hergestellt bzw. aufgereinigt werden, und das Ansetzen der Reagenz-Lösungen beschränkte sich nicht immer auf das Einwiegen und einfache Lösen der Substanz. Daher soll an

dieser Stelle die Herstellung einiger Reagenzlösungen genauer beschrieben werden.

2,6-Dichlorphenolindophenol-Lösung (1mmol/l)

326 mg (1 mmol) des Natriumsalz-Dihydrats wurden in etwa 100 ml dest. Wasser bei 50°C unter Rühren in einem Becherglas gelöst. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung in einen 1000 ml Meßkolben überführt und mit dest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt und nicht gelöste Substanz abfiltriert. Mit einer Ascorbionsäure-Standardlösung (2000 mg/l) wurde ein Faktor von 0,9 ermittelt.

Die Lösung wurde kühl und dunkel aufbewahrt (Kühlschrank).

Natriummolybdatophosphat-Stammlösung (10 mmol/l)

1,7 g (12 mmol) Molybdänoxid (MoO_3) wurden mit ca. 40 ml dest. Wasser unter Rühren aufgeschwemmt und mit Natriumhydroxid versetzt bis sich alle Substanz gelöst hat. Nun wurden etwa 4 ml konz. Schwefelsäure zugefügt.

In einem 100 ml Meßkolben wurden 136 mg (1 mmol) wasserfreies Kaliumdihydrogenphosphat in ca. 40 ml dest. Wasser gelöst, die saure Natriummolybdat-Lösung langsam zugefügt und bis zur Marke mit dest. Wasser aufgefüllt.

Brenzcatechin-Stammlösung (1,5 mmol/l)

Um das technische Produkt von Verunreinigungen (hauptsächlich braune Oxidationsprodukte) zu befreien, wurde in Petroleumbenzin (Siedebereich 100 - 140°C) umkristallisiert. Dabei löst sich das Brenzcatechin in heißem Benzin, während die Verunreinigungen zwar schmelzen aber ungelöst bleiben. Die heiße Lösung wurde abdekantiert und filtriert, beim Abkühlen bilden sich weiße etwa 5 mm lange Nadeln. Diese Substanz wurde an der Luft getrocknet und unter Stickstoff aufbewahrt.

165 mg (1,5 mmol) so vorbereitetes Brenzcatechin wurde in 1 l sauerstoff-freiem dest. Wasser gelöst (Meßkolben). Die Entnahme der Lösung geschah dann immer unter Stickstoff (Abb. 44).

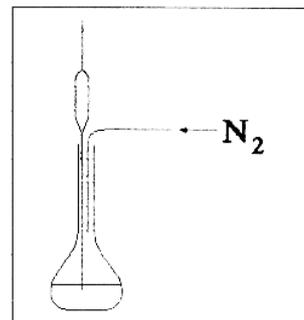


Abb.44 Entnahme unter N_2 -Begasung

Dopamin-Stammlösung (1,5 mmol/l)

Zur Herstellung der Lösung wurde eine 5 ml Ampulle Infusionslösungskonzentrat (Firma Giulini) verwendet, diese enthält 50 mg (52,8 mmol/l) 4-(2-Aminoethyl)brenzcatechin-hydrochlorid (Dopaminhydrochlorid, Abb.45) und 9,15 mg (9,6 mmol/l) Natriumdisulfit als Stabilisator.

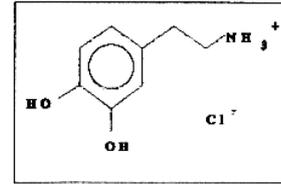


Abb.45 Dopaminhydrochlorid

5 ml dieser Lösung wurden in 171 ml dest. Wasser aufgenommen und sofort verwendet. Die Dopamin-Konzentration dieser Stammlösung beträgt 1,5 mmol/l, die Natriumdisulfit-Konzentration etwa 0,3 mmol/l.

Polyphenoloxidase-Lösung (10 mg/l)

Da der Vorrat an PPO (Tyrosinase aus Pilzen, Sigma) begrenzt war (insgesamt 12 mg Feststoff), wurden nur sehr geringe Mengen eingewogen und kleine Volumina angesetzt.

1 mg Tyrosinase wurden in einem 20 ml Becherglas eingewogen, unter Nachspülen dieses Gefäßes in einen 100 ml Meßkolben überführt und bis zur Marke mit dest. Wasser aufgefüllt. Diese Lösung (im Kühlschrank gelagert) ist etwa 3 - 4 Tage verwendbar.

Phosphatpuffer-Lösung (0,1 mol/l)

8,9 g (0,05 mol) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 6,8 g (0,05 mol) wasserfreies KH_2PO_4 wurden in einem Liter dest. Wasser gelöst und der pH-Wert bestimmt (pH 6,88).

3.8 Lebensmittel

Alle Lebensmittel wurden aus dem normalen Handel bezogen. Zum Einsatz kamen frische Tomaten, Salatgurken, Bananen, Äpfel und trinkfertige Obst- und Gemüsesäfte bzw. Nektare. Zwar existieren bei Tomaten, Gurken und Bananen auch die unterschiedlichsten Sorten, es ist jedoch in Deutschland nicht üblich die Sortenbezeichnung anzugeben. Dies geschieht in der Regel nur bei Äpfeln, daher kann hier auch nur eine Sortenangabe für Äpfel erfolgen (vgl. Exkurs: Auswahl der Äpfel).

Folgende Fertigprodukte wurden untersucht:

- "Wertkost" Klarer Apfelsaft mit Vitamin C angereichert (30 mg/100 ml zum Zeitpunkt der Abfüllung), EUCO Hamburg
- "albi" Tomatensaft aus Konzentrat (gesalzen), albi Bühlenhausen
- "hohes C" Orangensaft aus Konzentrat mit Calcium und Milcheiweiß (Vitamin C: 38 mg/100 ml, Calcium: 135 mg/100 ml), Eckes-Granini Nieder-Olm
- "Wertkost" schwarzer Johannisbeernektar (Fruchtgehalt: 34%), EUCO Hamburg
- "Vitraletten Orange mit Calcium" Vitamin-Lutschbonbons, Beckerwerk Fulda GmbH, Zutaten: Traubenzucker, Calciumsalz mindestens 4 g in 100 g (Trennmittel E341*), Citronensäure, Stärke, Vitamin C 500 mg in 100 g, Vitamin B₁-nitrat 8,8 mg in 100 g, Orangenaroma

* E 341a = CaHPO₄, E 341b = Dicalciumorthosphat, E341c = Ca₅(PO₄)₃OH [34, S.86]

4. Ergebnisse und Diskussion

Zur Untersuchung oxidativer Vorgänge in Lebensmitteln wurde die polarographische Sauerstoff-Meßtechnik eingesetzt. Die hier angewandte Methode beruht auf der Abnahme der Sauerstoffkonzentration in Saft/Wasser-Mischungen von Obst- und Gemüse. Zum Einsatz kamen Apfel-, Tomaten- und Gurkensaft.

Der Einsatz von Zusatzstoffen und ein Modellversuch geben einen Einblick in die Vorgänge der enzymatischen Bräunung bei Äpfeln. Die Oxidationsvorgänge in Tomaten und Gurken konnten auf Vitamin C zurückgeführt werden und es wurde Bananenschale und Gurkensaft zur Herstellung von zwei Biosensoren verwendet, deren Funktion und Einsatzmöglichkeiten getestet wurden.

Exkurs: Auswahl der Äpfel

Das Bräunungsverhalten von Äpfeln hängt von der Sorte und Reifegrad ab; es schwankt auch von Apfel zu Apfel einer Sorte gleicher Herkunft. Um nun vergleichbare Ergebnisse zu erhalten muß eine Apfelsorte gefunden werden, die erstens mit der beschriebenen Pressmethode eine ausreichende Menge an Saft pro Apfel für Mehrfachmessungen liefert und zweitens ein mittleres Bräunungsverhalten zeigt. Die zweite Eigenschaft ist wichtig, da die Sauerstoffkonzentration und damit der verfügbare Sauerstoff in Lösung, von der begrenzten Sauerstofflöslichkeit abhängt. Daher kann nur in einem bestimmten Bereich gemessen werden. Es wurden die Sorten Granny Smith, Golden Delicious, Gala Royal, Jona Gold, Boskoop und Cox Orange auf diese Eigenschaften untersucht.

Hierfür wurden die Äpfel zunächst einfach aufgeschnitten und sich selbst überlassen (Abb.46). Boskoop zeigte hier die stärkste und Granny Smith die schwächste Bräunung. In ganz ähnlicher Weise wird nach einer sogenannten Boniturskala der

UPOV-Prüfungsrichtlinie TG/14/1 im Bundessortenamt verfahren. Das Bräunungsverhalten wird als eines von vielen Sortenkennzeichen* bestimmt (Abb.47), die Einstufung (Bonitur) erfolgt hier ebenfalls visuell, nach dem Durchschneiden mit einem Edelstahlmesser durch Vergleich mit dem Sortiment.

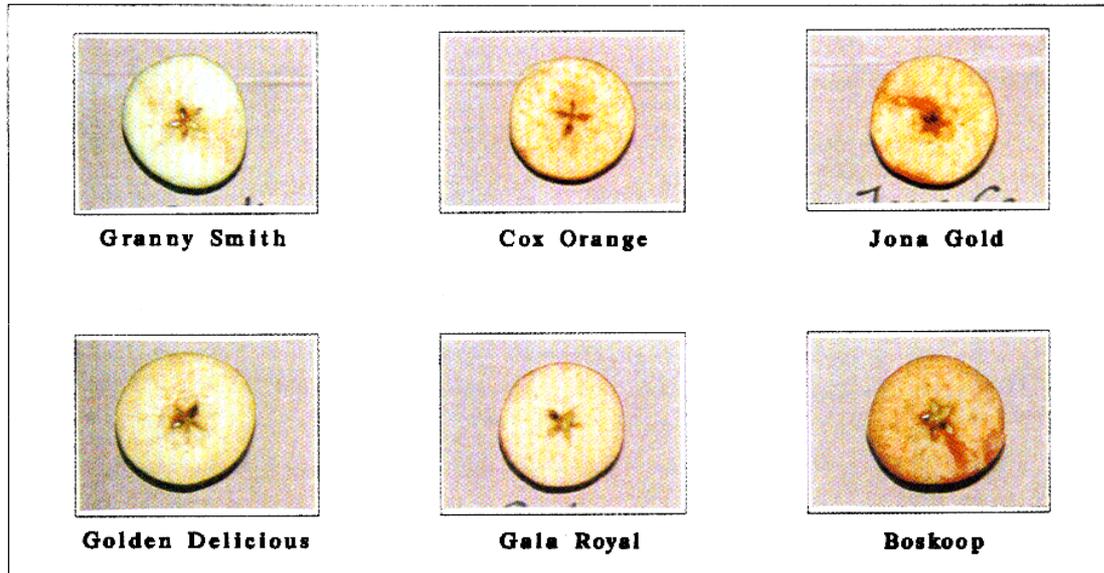


Abb.46 Bräunung verschiedener Äpfel nach 60 Minuten

Sorte	1992	1993	1994
Golden Delicious	4	3	4
Gala Royal	3	1	1
Jona Gold	3	4	5
Boskoop	5	6	7
Cox Orange	3	3	3

Boniturskala:
 1 fehlend oder sehr gering
 3 gering
 5 mittel
 7 stark
 9 sehr stark

Abb.47 Boniturdaten der Fruchtfleischbräunung 1992 - 1994

Neben dieser rein visuellen Kontrolle wurde der Sauerstoffverbrauch von 1:1 Saft/Wasser-Mischungen untersucht (Abb.48): Die Äpfel wurden unter Ausschluß von Luftsauerstoff gepreßt und in Apparatur 1 nach Variante 1 mit luftgesättigtem Leitungswasser vermischt und die Zeit für den vollständigen Verbrauch des angebotenen Sauerstoffs bestimmt.

* Telefonat und Schriftwechsel mit dem Bundessortenamt, Prüfstelle Wurzen. Die Fruchtfleischbräunung gilt dort als relativ unzuverlässiges Sortenkennzeichen, wird aber aufgrund der Prüfungsrichtlinien mitbestimmt.

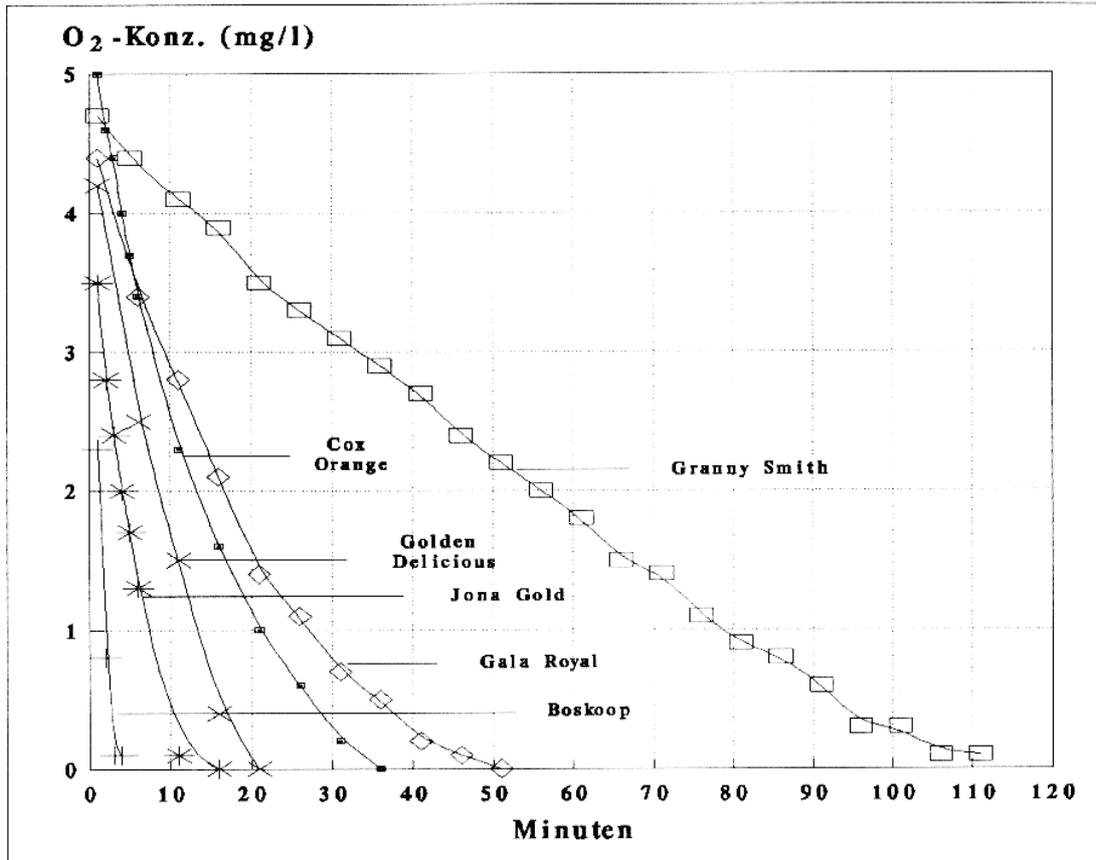


Abb.48 Vollständiger Sauerstoffverbrauch von Saft/Wasser-Mischungen im Verhältnis 1 : 1

Für Boskoop, Cox Orange, Golden Delicious und Gala Royal wurde ein mittlerer Sauerstoffverbrauch bestimmt. Dafür wurden jeweils drei Verbrauchskurven (ein Apfel pro Kurve), bei erhöhtem Sauerstoffangebot (Verwendung von O₂-gesättigtem Wasser bei einem Saftanteil von 33,3 %) aufgenommen und gemittelt. Lediglich bei Boskoop wurde der angebotene Sauerstoff nach etwa 90 min vollständig verbraucht, daher müßte der Wert für diese Sorte höher liegen. Mit Apparatur 1 nach Variante 2 wurden folgende Werte für den mittleren O₂-Verbrauch erhalten (in mg O₂/l reinem Saft): Gala Royal 34, Golden Delicious 42, Cox Orange 62 und Boskoop 63. Diese Werte sind als Richtwerte zu verstehen, da hier keine Korrektur der Meßwerte für die O₂-Konzentration in der Mischung vorgenommen wurde und damit der Anfangs- und

Endpunkt der Messung nicht korrekt bestimmt werden konnte. Für Golden Delicious wurde eine solche Korrektur vorgenommen und ein Verbrauchswert von 42,6 mg/l bestimmt (Abb.43).

Der Vergleich der drei Methoden (Abb.49) zeigt eine recht gute Übereinstimmung. Lediglich die Sorten Cox Orange und Golden Delicious zeigen eine Abweichung bei der Geschwindigkeitsmessung des Sauerstoffverbrauchs. Das könnte daran liegen, daß ein Apfel (Cox Orange) unbemerkt schon vor der O₂-Messung mit Luftsauerstoff in Kontakt getreten ist. Die Meßergebnisse für den mittleren Verbrauch bestätigen diese Vermutung. Nichtübereinstimmungen mit den Boniturdaten des Bundessortenamtes sind mit großer Sicherheit auf die unterschiedliche Herkunft der Äpfel zurückzuführen.

Für die meisten Experimente hat sich die Verwendung der Apfelsorte Golden Delicious bewährt. Der Apfel lieferte mit der angewendeten Pressmethode etwa 50 - 60 ml Saft, ist fast das ganze Jahr über in etwa gleichbleibender Qualität im Handel zu erhalten und zeigt einen mittleren

 Zunahme der Reak- tivität	Boskoop	Boskoop	Boskoop	Boskoop
	Jona Gold	Jona Gold		Jona Gold
	Cox Orange	Golden Delicious	Cox Orange	Golden Delicious
	Golden Delicious	Cox Orange	Golden Delicious	Cox Orange
	Gala Royal	Gala Royal	Gala Royal	Gala Royal
	Granny Smith	Granny Smith		
	visueller Vergleich	Sauerstoff- verbrauchs- geschwin- digkeit	mittlerer Sauerstoff- verbrauch	Bonitur (Bundessor- tenamt)

Abb.49 Reihenfolge der Reaktivität verschiedener Apfelsorten

Sauerstoffverbrauch. Während sich die Trübstoffe bei diesem Apfel durch Zentrifugieren nur sehr unzureichend entfernen ließen, gelang dies recht gut bei Verwendung der Sorte Boskoop.

4.1 Sauerstoffverbrauch von Apfelsaft

Am Beispiel der Herstellung von Apfelsaft wurde der Ablauf der enzymatischen Bräunung näher untersucht.

4.1.1 Zusammenhang zwischen Bräunung und Sauerstoffverbrauch

Für die Messung der Bräunung bietet sich eine photometrische Arbeitsweise an. Ausgehend von der Annahme, daß die Enzyme, die für die Bräunung von Apfelsaft verantwortlich sind, an Trübstoffe gebunden sind, muß die Reaktion in einem Trübsaft stattfinden, die photometrische Messung kann jedoch nur in klaren Lösungen geschehen.

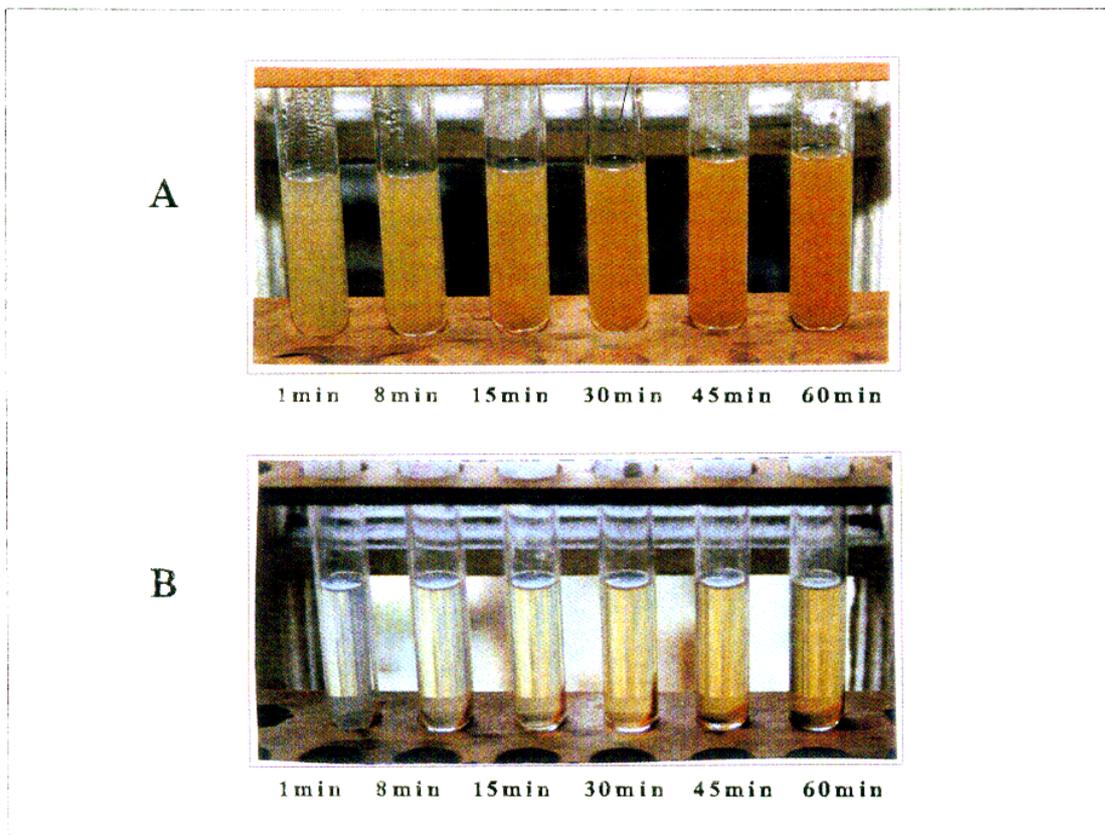


Abb.50 Bräunung einer Apfelsaft/Wasser-Mischung (Boskoop 35%)

A: Nach Erhitzen B: Nach Zentrifugation der erhitzten Mischung

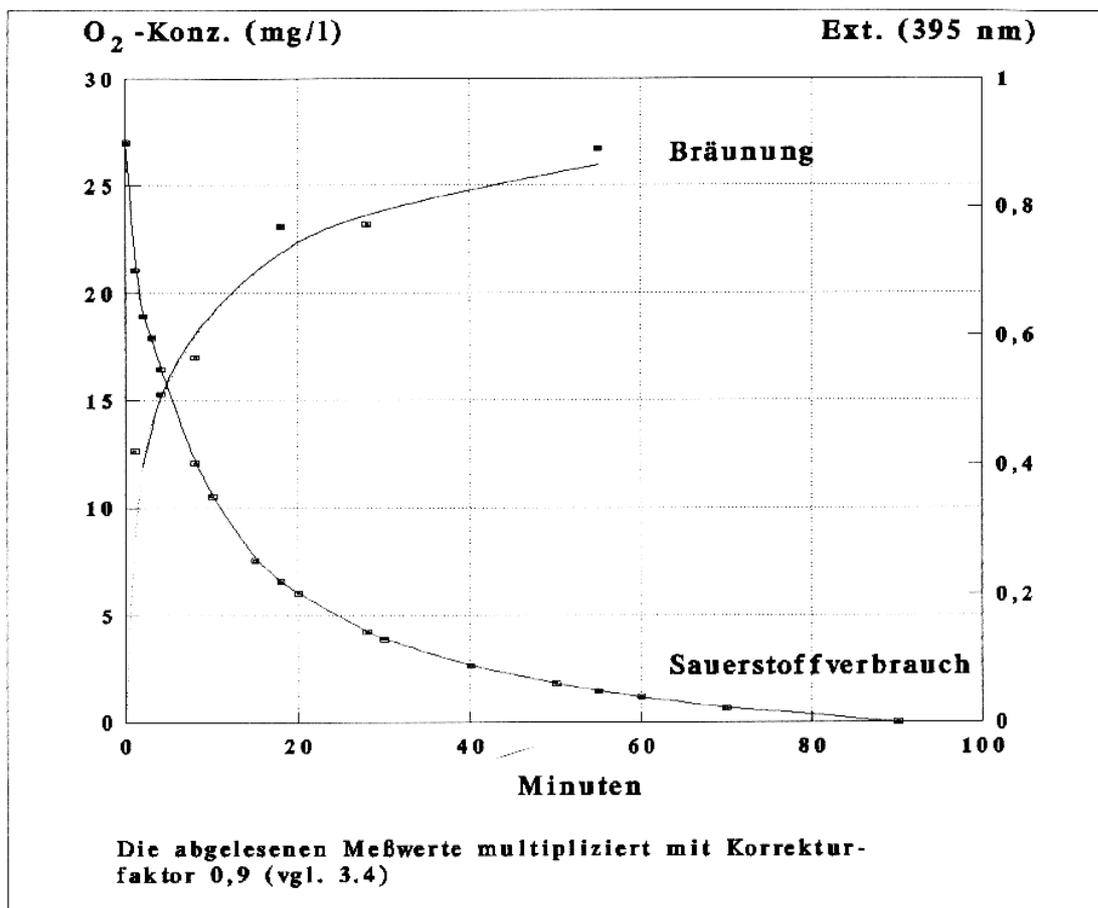


Abb.52 Zusammenhang zwischen Sauerstoffverbrauch und Bräunung einer Saft/Wasser-Mischung (Boskoop 35%)

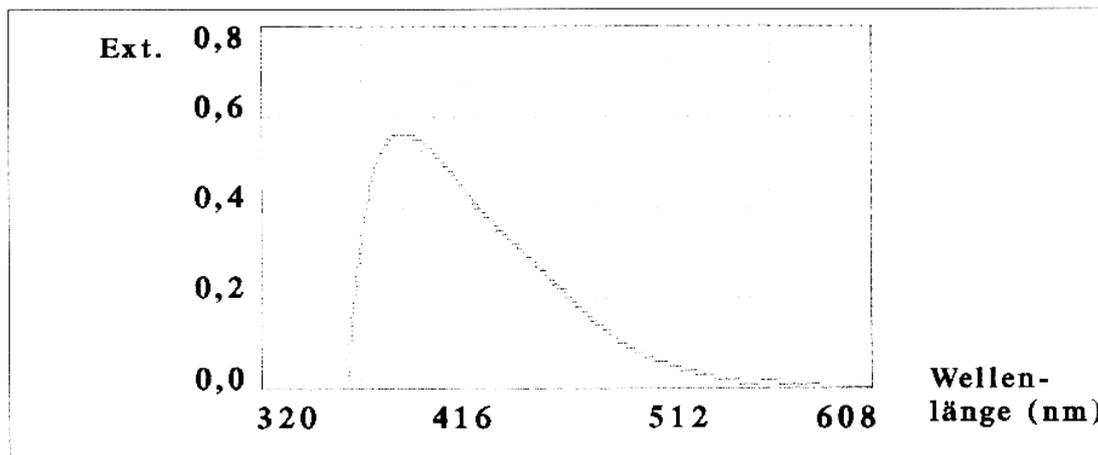


Abb.51 Absorptionsspektrum von oxidiertem Apfelsaft, gemessen gegen wenig oxidierten Apfelsaft (Mischung 1:3, Boskoop erhitzt und zentrifugiert)

Daher wurde der Saft (Boskoop) in Apparatur 2 mit O₂-gesättigtem Wasser gemischt und die Abnahme der Sauerstoffkonzentration aufgenommen. In bestimmten Zeitabständen wurden nun Proben entnommen und sofort im siedenden Wasserbad 2 Minuten erhitzt (Zerstörung der Enzyme). Die so behandelten Proben wurden in Eis aufbewahrt und eine Stunde bei 2000 Upm zentrifugiert (Abb.50).

Die Bräunungsprodukte zeigen ein Extinktionsmaximum bei etwa 395 nm (Abb. 51). Die Extinktion der Proben wurde bei dieser Wellenlänge gegen dest. Wasser aufgenommen und gegen die Zeit aufgetragen (Abb.52). Der Vergleich zeigt eine eindeutige Korrelation zwischen Bräunung und O₂-Verbrauch (Abb.53).

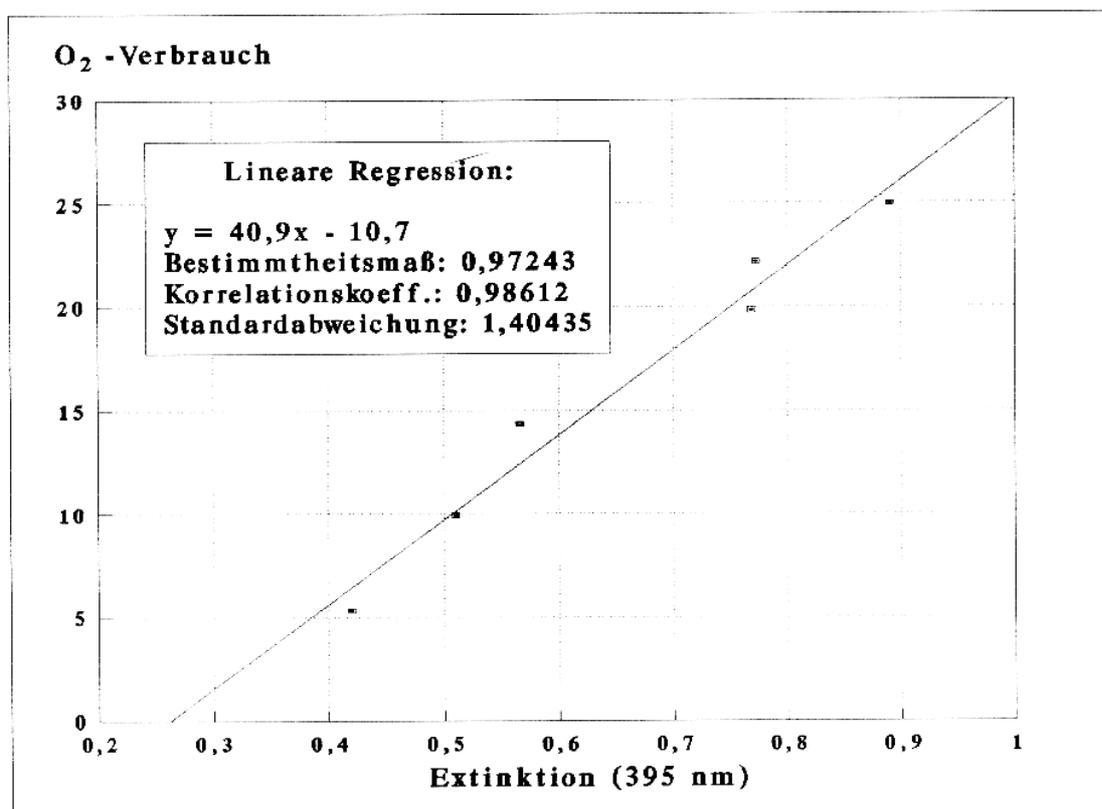


Abb.53 Korrelation der Bräunung mit dem Sauerstoffverbrauch (Boskoop 35%)

4.1.2 Beziehung zwischen Verbrauchsgeschwindigkeit und Sauerstoffkonzentration

Für den Ablauf der enzymatischen Bräunung sind (neben einem Enzym) Sauerstoff und mindestens ein Substrat notwendig. Daher wird die Reaktionsgeschwindigkeit also auch von mindestens zwei Ausgangsstoffen abhängen. Die Konzentration eines Ausgangsstoffes kann jedoch so hoch gewählt werden, daß hauptsächlich die Konzentration der anderen Komponente geschwindigkeitsbestimmend wirkt.

Da Sauerstoff sowohl als Meßgröße aufgenommen wird, als auch gleichzeitig als Substrat für die Reaktion dient, ist es sinnvoll, eine Sättigungskonzentration (für Sauerstoff) des Enzyms zu bestimmen. So können dann alle Messungen an einer Apfelsorte, wenn die Sauerstoffkonzentration während der Messung immer über diesem Wert liegt, als nahezu sauerstoffunabhängig angesehen werden.

Hierbei interessierte weniger die MICHAELIS-Konstante (Km-Wert) für Sauerstoff, sondern vielmehr die Konzentration, oberhalb derer ihre Änderung einen vernachlässigbar geringen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit ausübt.

Ein Km-Wert, im enzymkinetischen Sinne, bezieht sich auf ein definiertes Substrat und ein definiertes Enzym. Er gibt die Konzentration des Substrates an, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die halbe Maximalgeschwindigkeit ausmacht.

Da nun aber in Apfelsaft mehrere Substrate, mehrere Enzyme und verschiedene Nebenreaktionen an einer Oxidationsreaktion beteiligt sind, kann auch ein solcher Km-Wert nur den gesamten Vorgang wiedergeben.

Zunächst wurde die Sauerstoffkonzentration mit Apparatur 1 durch unterschiedlich lange Begasung mit Sauerstoff oder

Stickstoff eingestellt und in Apparatur 2 überführt. Danach erfolgte die Aufnahme der Änderung der Sauerstoffkonzentration in der Saft/Wasser-Mischung in halbminütigen Abständen (Abb.54).

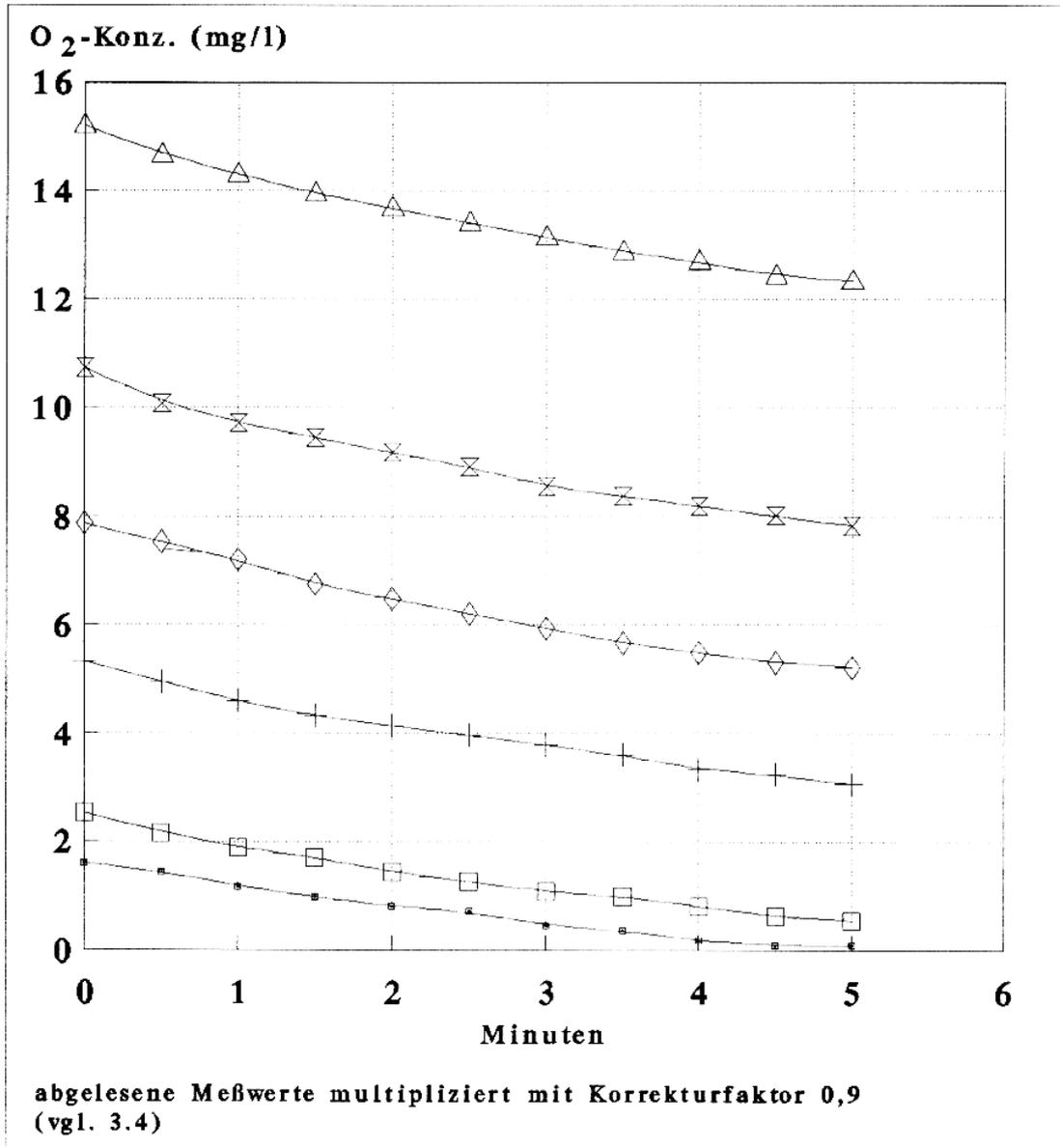


Abb.54 Reaktionsgeschwindigkeit einer Saft/Wasser- Mischung (Golden Delicious, 33,3%) bei unterschiedlichen Sauerstoff-Anfangskonzentrationen

Werden die daraus berechneten Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Sauerstoffanfangskonzentration aufgetragen (Abb.55), so wird deutlich, daß sich die Reaktionsgeschwindigkeit ab einer Konzentration über 10 mg/l nur noch wenig steigern läßt.

Bei einer Sauerstofflöslichkeit von 44 mg/l (Raumtemperatur und Normaldruck) läßt sich für eine 33%igen Saft/Wasser-Mischung maximal eine Konzentration von 29,3 mg/l erreichen. Somit bleibt ein Spielraum von 19,3 mg/l, ohne den Bereich der Sauerstoffsättigung des Enzyms zu verlassen. Der mittlere O₂-Verbrauch für eine Apfelsaft/Wasser-Mischung der Sorte Golden Delicious liegt bei etwa 14 mg/l. Damit können Geschwindigkeitsmessungen (Verwendung von O₂-gesättigtem Wasser vorausgesetzt) als weitgehend sauerstoffunabhängig eingestuft werden.

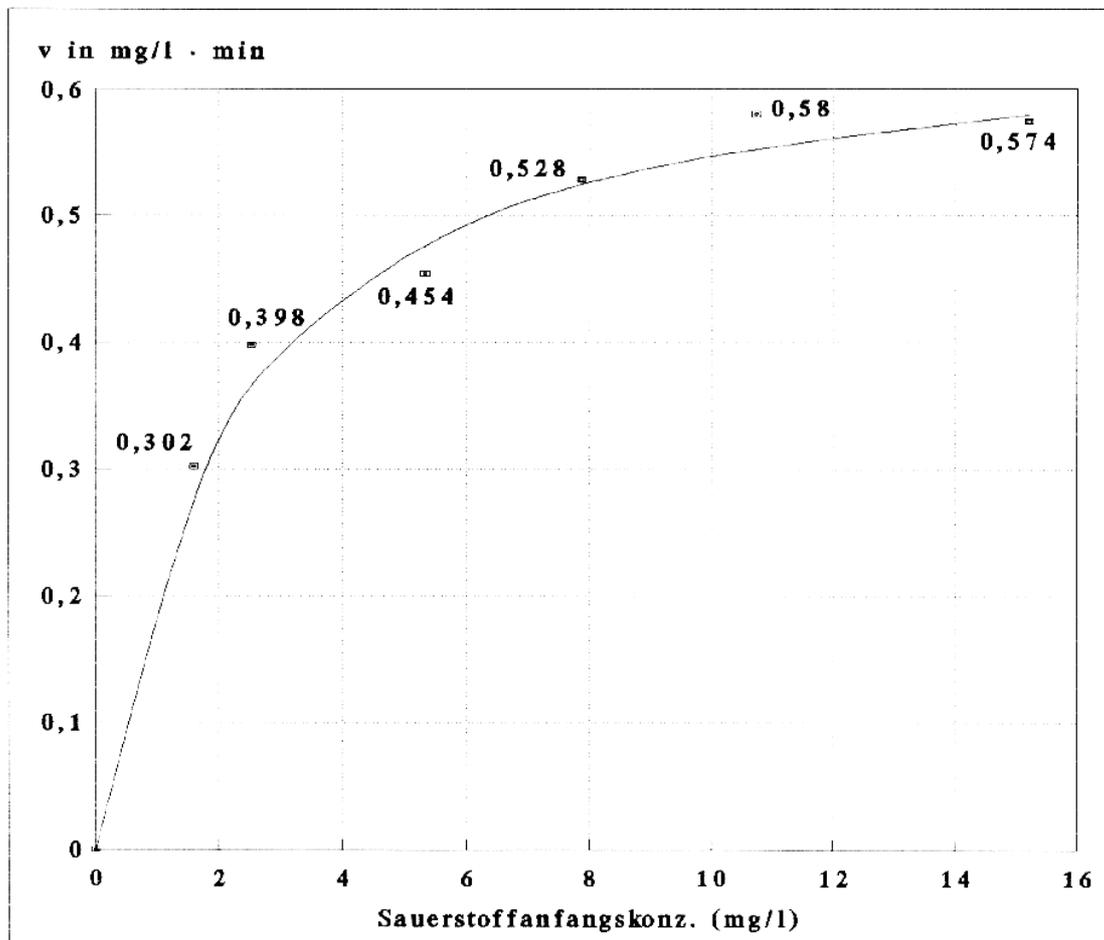


Abb.55 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Sauerstoff-Anfangskonzentration (Golden Delicious, 33,3%)

Werden die reziproken Werte für die Geschwindigkeit und die Sauerstoffanfangskonzentration gegeneinander aufgetragen (LINEWEAVER-BURK-Plot), so ergibt sich eine Gerade, aus der sich die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} und ein K_m -Wert (mit den bereits erwähnten Einschränkungen) bestimmen lassen (Abb.56).

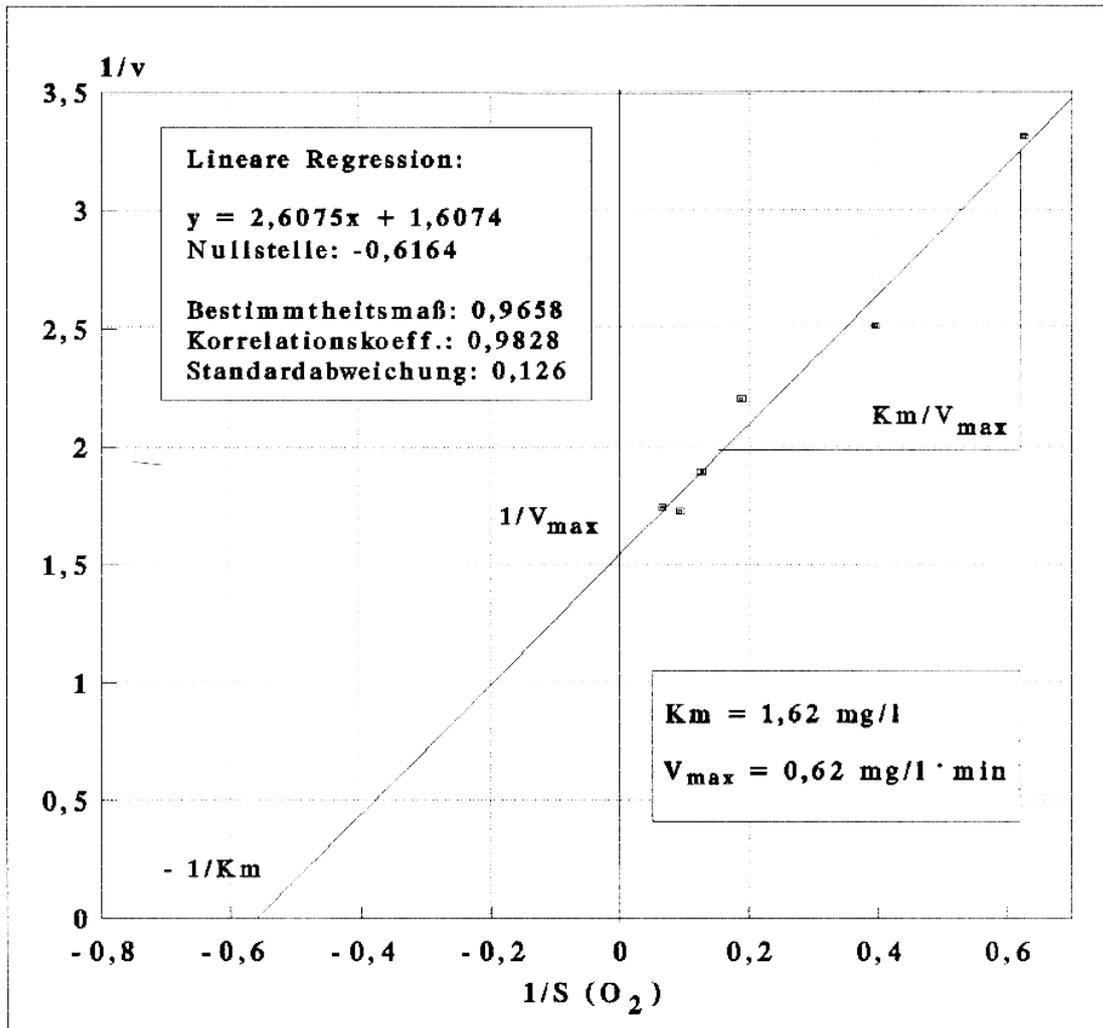


Abb.56 LINEWEAVER-BURK-Plot zur Bestimmung der MICHAELIS-Konstanten für O₂ (Golden Delicious, 33,3%)

4.1.3 Einfluß von Inhibitoren und Temperatureffekte

Da eine Beeinflussung durch die Sauerstoffanfängskonzentration ausgeschlossen werden konnte und die Substratzusammensetzung im Apfel die gleiche bleibt, kann die Wirkung von Zusatzstoffen und anderen Einflüssen auf die Reaktionsgeschwindigkeit in vergleichender Weise untersucht werden (Abb.57). Aus dem gleichen Grund war es möglich, aufgrund der besseren Übersicht die Differenz-Werte (Verbrauch) gegen die Zeit aufzutragen.

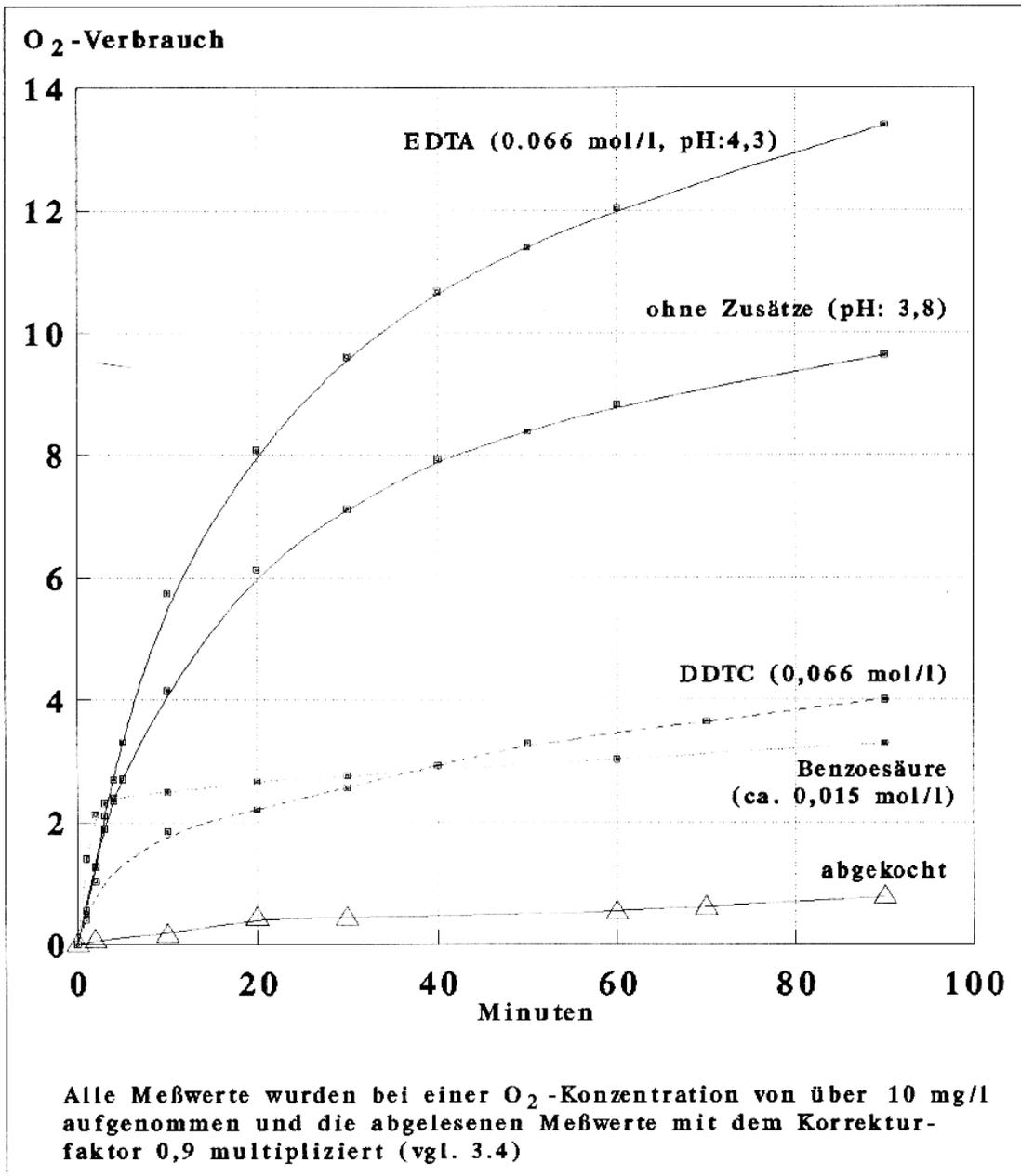


Abb.57 Sauerstoffverbrauch von Saft/Wasser-Mischungen (Golden Delicious, 33%) bei Verwendung verschiedener Zusatzstoffe

Durch einfaches Erhitzen des Saftes kam es zu einer deutlichen Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit. Dies stützt die vorweggenommene Annahme für die Existenz eines für die Bräunung verantwortlichen Enzyms. Aufgrund der Überlegung, Komplexbildner könnten die Verbindung zwischen Kupfer und Proteinkomponente im Enzym lösen und damit selektiv Polyphenoloxidasen zerstören, wurden EDTA und DDTC* eingesetzt.

Während EDTA keine Wirkung zeigt (es beschleunigt die Reaktion sogar etwas, wahrscheinlich durch Anhebung des pH-Wertes), findet bei Verwendung von DDTC nach einer kurzen Induktionsperiode eine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber der unbehandelten Saft/Wasser-Mischung statt. Diese Tatsache ist auf eine direkte Wechselwirkung zwischen DDTC und PPO zurückzuführen.

Daß EDTA keine Inhibition von PPO zeigt, könnte zwei Ursachen haben: zum einen wäre es möglich, daß eine sterische Hinderung vorliegt, also ein EDTA-Molekül zu groß ist um bis ins aktive Zentrum des Enzyms vorzudringen; zum anderen könnte die Stabilität des Histidin-Kupfer-Komplexes einfach größer sein, als die des EDTA.

Für die zweite Möglichkeit spricht ein einfacher Reagenzglas-Versuch, in dem eine EDTA-Kupferkomplex-Lösung mit DDTC versetzt wird. Die Farbe der Lösung wechselt von tiefblau nach braunrot. Das heißt, daß EDTA (in Bezug auf Kupfer) einen schwächeren Komplexbildner darstellt und damit wahrscheinlich nicht die Fähigkeit besitzt, Kupfer aus dem Enzym zu entfernen. Gegen die erste Hypothese spricht die Tatsache, daß selbst große Substrate (z.B. Chlorogensäure) und deren Polymerisate zum aktiven Zentrum vordringen und dort eine, wenn auch reversible, Bindung mit Kupfer eingehen. Somit läßt sich der Unterschied in der Wirksamkeit von EDTA und DDTC mit ihrer unterschiedlichen Affinität zu Kupfer erklären.

Benzoessäure zeigt ebenfalls Hemmwirkung auf die Oxidation von Apfelsaftinhaltsstoffen. Da die Struktur von Benzoessäure eine gewisse Ähnlichkeit mit der von Phenolen aufweist, ist eine Konkurrenz- bzw. Verdrängungsreaktion am Enzym möglich. Da jedoch die Carboxylgruppe der Benzoessäure nicht weiter

* Strukturformel Abb.59

oxidiert werden kann, wird die enzymatische Bräunung gehemmt.

Neben der Zerstörung von PPO durch Erhitzen kann auch das Tiefgefrieren zu einer Verlangsamung der Reaktion führen (Abb.58). Da für die Apfelsorte "Jona Gold" keine Korrekturfaktorbestimmung für die Sauerstoff-Gehalt vorgenommen wurde, sind hier lediglich die vom Gerät angezeigten Konzentrationsänderungen mit der Zeit wiedergegeben.

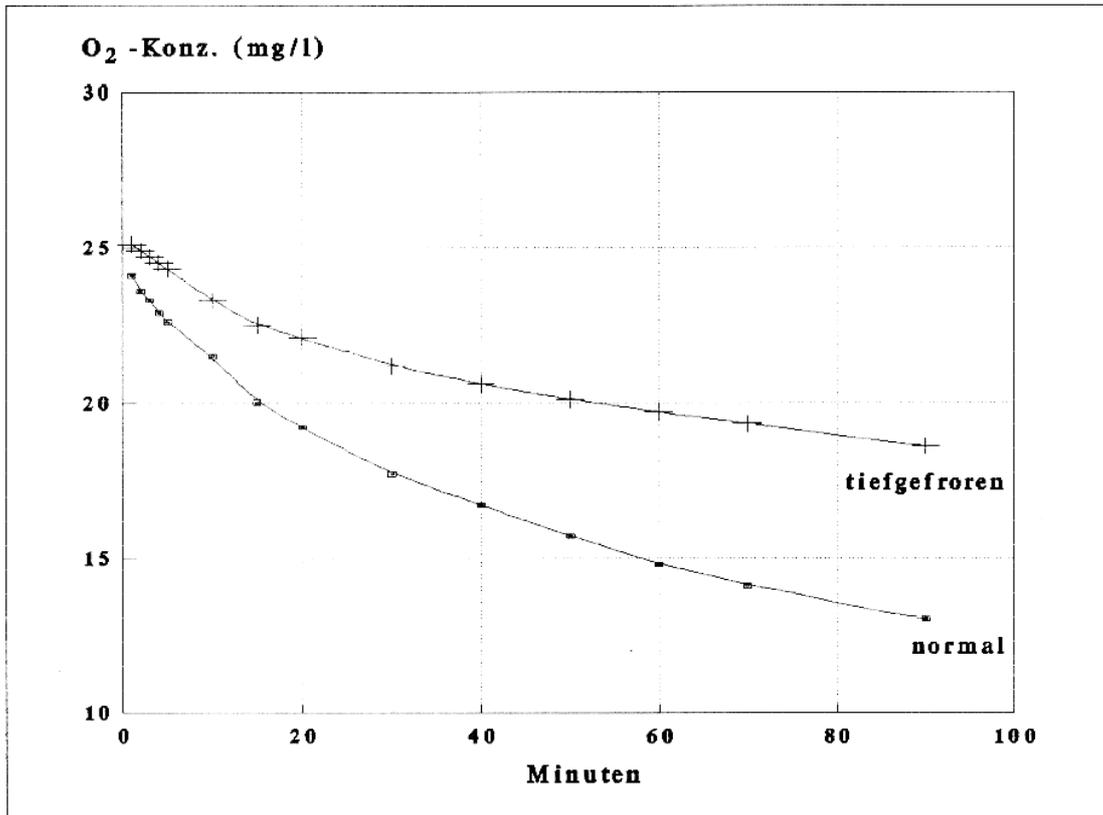


Abb.58 Einfluß des Tiefgefrierens auf die Oxidationsgeschwindigkeit (Jona Gold 40%)

Für die Messung wurde ein Apfel unter Stickstoff eingefroren und nach dem Auftauen gepreßt. Damit entstehen Eiskristalle, die eine vollständige Zerstörung der Zellen verursachen. Der so erhaltene Saft zeigte keinerlei Braunfärbung und war weniger trüb als herkömmlich gewonnener Saft. Außerdem ließ er sich nicht so gut pressen. Es war ein Phänomen zu beobachten, welches schon in Abschnitt 2.2.6 beschrieben wurde: die Bildung einer schleimigen Pulpe. Das war wahrscheinlich der Grund, warum Trübstoffe zurückgehalten wurden. Damit ergibt sich die Erklärung für die langsamere

Ausgehend von Literaturwerten [38] beträgt der Gehalt an Kationen in 50 g Apfelsaft etwa 1,7 mmol. 50 ml des unter Sauerstoffausschluß gepreßten Apfelsaftes wurden daher mit 0,75 g (etwa 2mmol) EDTA versetzt. Dieser so vorbereitete Apfelsaft wurde nun mit luftgesättigten DDTC-Lösungen unterschiedlicher Konzentration vermischt (Apparatur 2).

Es zeigte sich, daß DDTC-Konzentration von 0,03 - 0,1 mmol/l in der Mischung einen deutlichen Effekt aufwies. Dementsprechend müßte der Gehalt an Enzym in der Saft/Wasser-Mischung etwa in diesem Bereich liegen. Da PPO zwei Kupfer-Ionen besitzt, werden vier Moleküle DDTC benötigt, um das Kupfer vollständig aus dem Proteinkomplex zu entfernen. Daher kann von einer PPO-Konzentration von etwa 0,05 mmol/l in reinem Saft ausgegangen werden.

4.1.5 Einfluß von Mikroorganismen

Vorab sei darauf hingewiesen, daß Mikroorganismen nicht direkt nachgewiesen wurden. Der zeitliche Verlauf der O₂-Verbrauchsgeschwindigkeit und die Effektivität eines antimikrobiell wirksamen Stoffes lassen jedoch den Schluß zu, daß Mikroorganismen bei Langzeitmessungen (10 Stunden) einen erheblichen Anteil am Sauerstoffverbrauch einer Saft/Wasser-Mischung haben können und damit eine Störung der Messung bewirken.

Befinden sich einige Mikroorganismen in einem geeigneten Nährmedium, so findet nach einer gewissen Zeit eine Zellvermehrung statt. Unter optimalen Bedingungen tritt exponentielles Wachstum auf. Benötigen nun die Mikroorganismen Sauerstoff, so muß auch der Sauerstoffverbrauch exponentiell zunehmen.

Bei Apfelsaft findet nun eine Überlagerung zweier O₂-Verbrauchsursachen statt: anfangs überwiegt die Oxidation von Phenolen unter Mitwirkung von PPO (die Verbrauchsgeschwindigkeit nimmt mit der Zeit ab), zu einem späteren Zeitpunkt wird der Einfluß von sauerstoffverbrauchenden Mikroorganismen deutlich (es kommt zu einer Beschleunigung der Verbrauchsgeschwindigkeit).

Um Störungen durch Mikroorganismen auszuschließen, mußte eine Möglichkeit gefunden werden diese zu hemmen, ohne die

Wirkung von PPO zu beeinflussen. Konventionelle Konservierungsmittel wie Benzoesäure oder Sorbinsäure sind somit unbrauchbar (vgl. 4.1.3 und 2.2.6).

Nach ELLINGER [39, S.743] soll EDTA eine Großzahl von Organismen inhibieren, da für deren Zellwandaufbau einige Metallionen (z.B. Magnesium und Calcium) essentiell notwendig sind. Da EDTA keinen Einfluß auf die PPO-Aktivität besitzt, kann es als Hemmstoff eingesetzt werden. Abbildung 61 zeigt eine Langzeitmessung von Apfelsaft mit EDTA-Zusatz im Vergleich zu einem unbehandelten Saft.

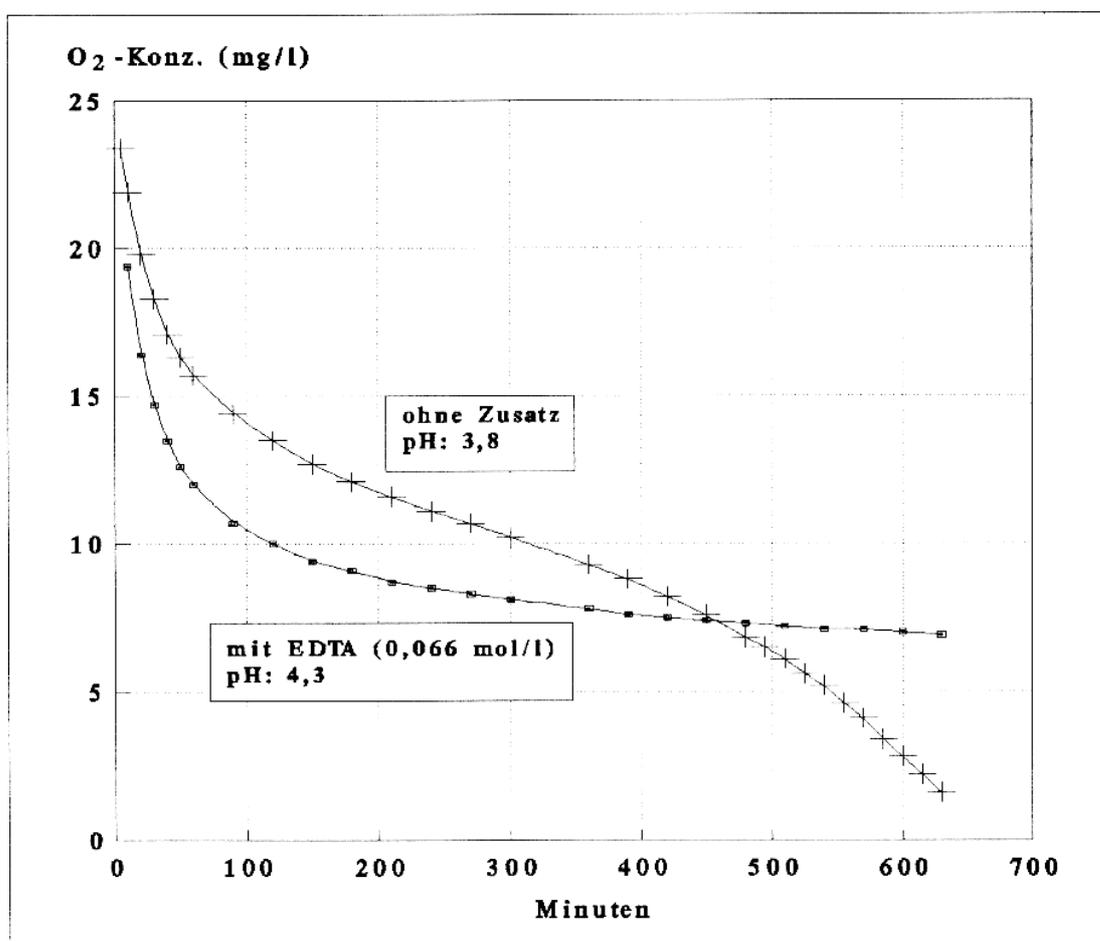


Abb.61 Einfluß von Mikroorganismen auf den Sauerstoffverbrauch von Saft/Wasser-Mischungen (Golden Delicious 33,3%)

4.2 Einfluß von Antioxidationsmitteln im Modellversuch

Unter dem Namen Tyrosinase wird ein Enzymgemisch aus Pilzen von der Firma Sigma vertrieben. Nach Herstellerangaben enthält das Produkt Catecholase und Cresolase. Es ist wasserlöslich und nicht an Trubpartikel gebunden. Als Substrat dient Brenzcatechin.

In den so erhältlichen klaren Lösungen ist neben der polarographischen Sauerstoffmessung auch eine photometrische Verfolgung der Reaktion möglich. Außerdem läßt sich durch genaue Einwaage des Substrates der Sauerstoffverbrauch im voraus berechnen. Durch die parallele Messung von Sauerstoffverbrauch und Bräunung konnten so auch die Folgereaktionen (Inhibitorwirkung und Polymerisation) untersucht werden. Da mit definierten Lösungen gearbeitet wurde, fielen die bei Obstsaften üblichen Schwankungen weg.

Rein visuell ist schon kurz nach der Enzymzugabe eine Gelbfärbung zu erkennen, welche sich vertieft später braun wird, aber spätestens am nächsten Tag ist die Lösung wieder fast farblos.

Die Oxidation von Brenzcatechin verläuft über o-Benzochinon (Primärprodukt), welches im sichtbaren Spektrum im kurzwelligen Bereich Licht absorbiert und so zur gelben Farbe der Lösung führt. Das Absorptionsmaximum liegt im UV-nahen Bereich bei ca 400nm. Zu einem späteren Zeitpunkt nimmt die Extinktion jedoch in diesem Bereich ab. Der Anstieg bei 292,5nm läßt sich als eine Zunahme von Polymeren (Sekundärprodukte) interpretieren (Abb.62).

Es läßt sich keine Wellenlänge angeben welche den Reaktionsverlauf vollständig charakterisiert (Abb.63). Zumal der Extinktionsverlauf von der Reaktionsgeschwindigkeit der Primärreaktion abhängt, welche in diesem Fall sicherlich durch unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen variiert. Da die Sekundärreaktionen jedoch sauerstoffunabhängig eingeleitet werden (Abb.11), aber die Reaktionsgeschwindigkeit von der o-Benzochinon-Konzentration aus der Primärreaktion abhängt, ergibt sich ein variables Konzentrationsverhältnis von o-Benzochinon und Polymeri-

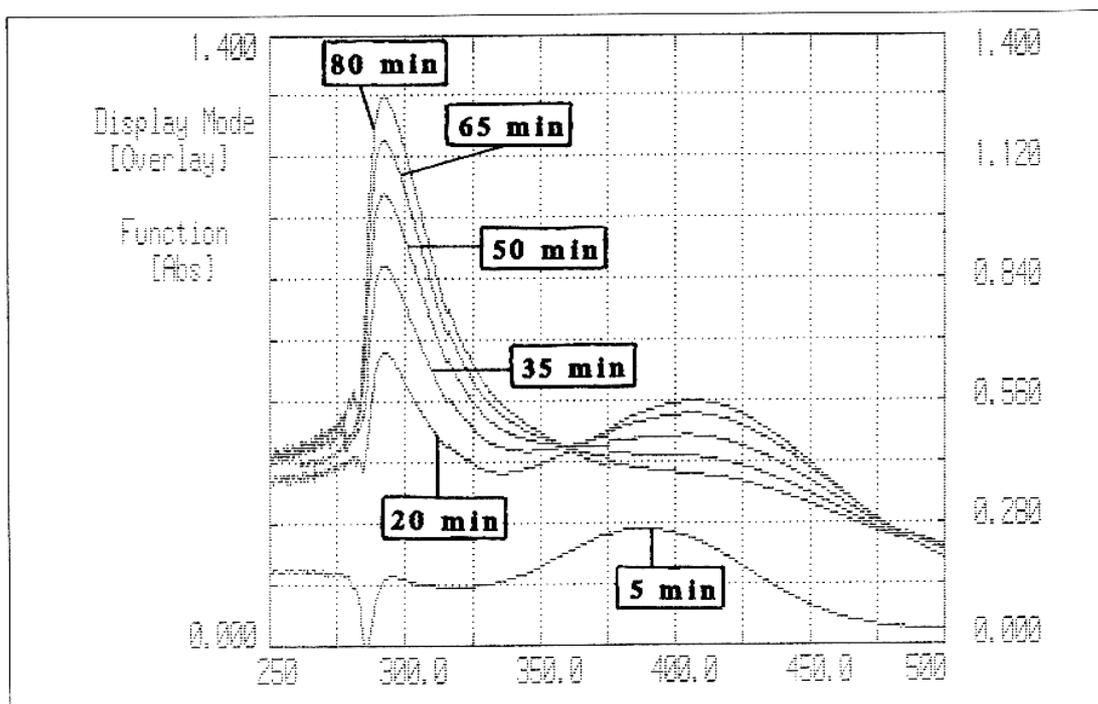


Abb.62 Absorptionsspektren für die Reaktion PPO / Brenzcatechin (zeitlicher Verlauf)

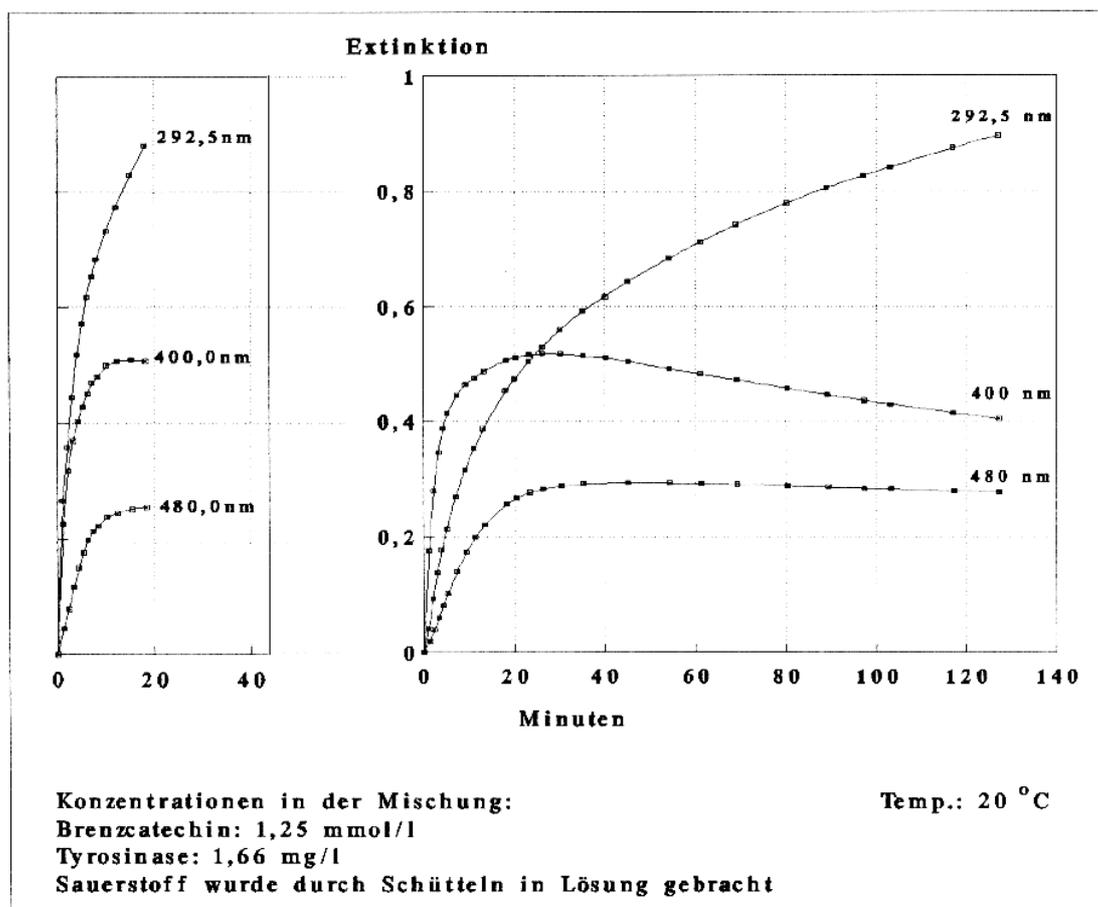


Abb.63 Enzymatische Oxidation von Brenzcatechin durch PPO (Extinktion bei drei Wellenlängen)

sationsprodukten. Dieses kommt durch den unterschiedlichen Kurvenverlauf bei 400nm und 292,5nm zum Ausdruck.

Für die praktische Messung mit Versuchsanordnung 3 (Abb.38) ist aus gerätetechnischen Gründen nur eine Extinktionsmessung bei 480nm möglich. Diese Wellenlänge ist insofern günstig, da vor allem der Anfang der Reaktion interessant ist (Ascorbinsäure und Natriumsulfit greifen vorwiegend in die Primärreaktion ein). Außerdem zeigt der Extinktionsverlauf bei 480nm nicht so große Schwankungen wie bei den anderen beiden Wellenlängen (Abb.63). Es ist sicherlich ein Kompromiß, günstiger wäre eine Verfolgung der Extinktion bei allen drei Wellenlängen. Da Ascorbinsäure aber ein Extinktionsmaximum bei 285nm aufweist (Abb.64) und somit die Messung stört, wäre diese Variante wenig zweckdienlich.

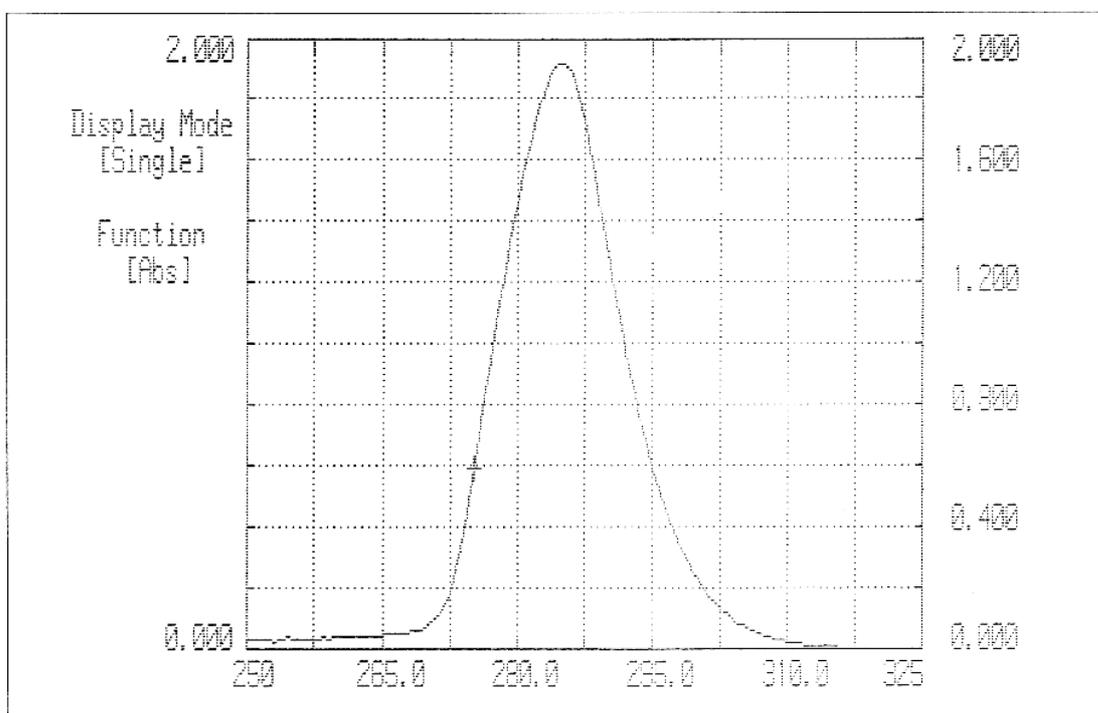
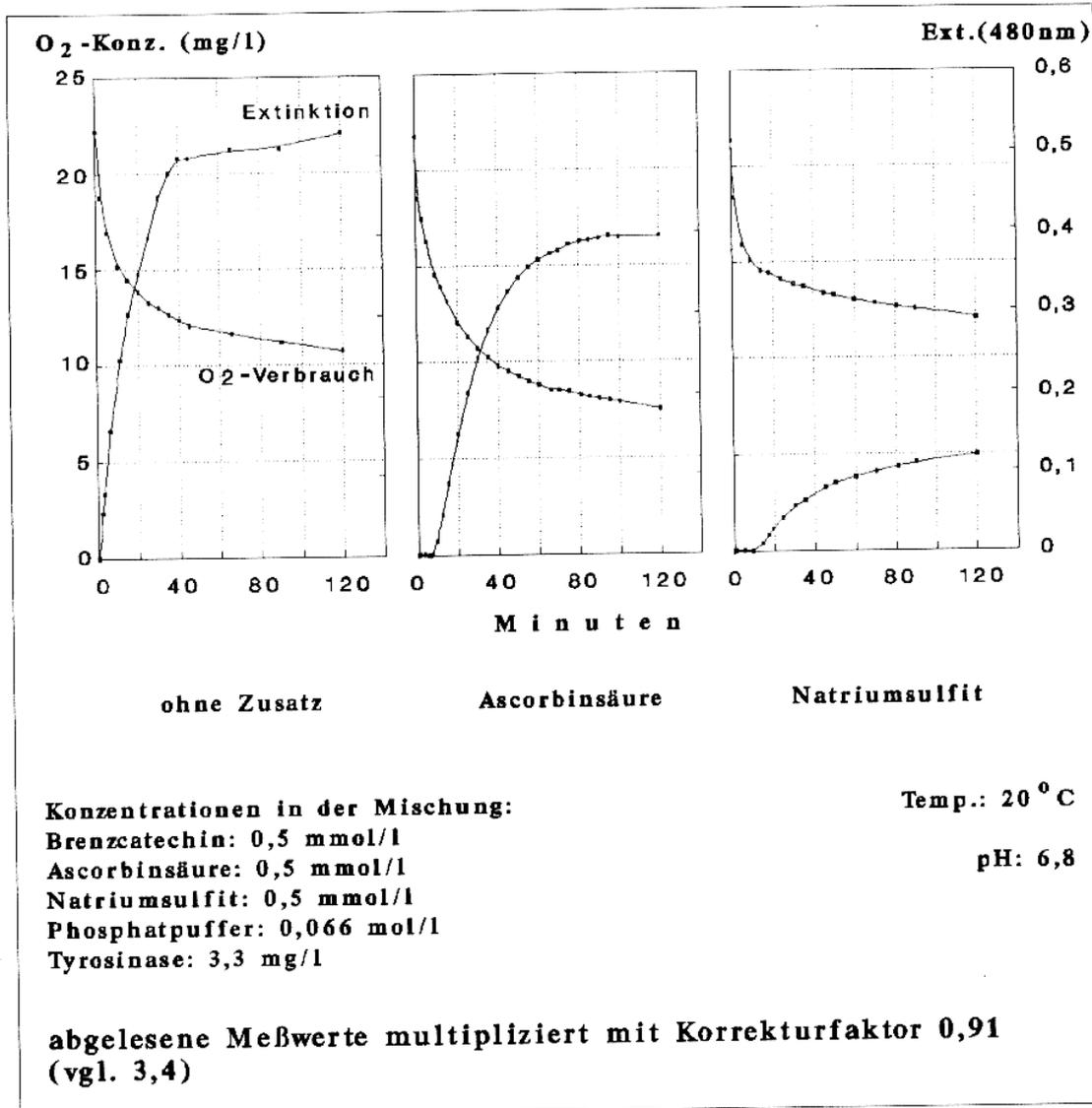


Abb.64 Absorptionsspektrum von Ascorbinsäure

Um die Wirkung von Inhibitoren auf dieses System näher zu untersuchen, wird zeitgleich neben der Sauerstoffkonzentration die Extinktion in dem gleichen Reaktionsgemisch gemessen. Hierzu dient Versuchsanordnung 3. Es werden L-Ascorbinsäure und Natriumsulfit als Bräunungsinhibitoren eingesetzt (Abb.65).



**Abb.65 Enzymatische Oxidation von Brenzcatechin
(Inhibition von Polyphenoloxidase)**

Beide Substanzen beschleunigen den Sauerstoffverbrauch und würden bei ausreichender Zugabe den Sauerstoff komplett aus der Lösung entfernen. Damit könnte dann auch keine enzymatische Oxidation mehr stattfinden. Weiterhin werden die gebildeten Chinone wieder zu den Ausgangssubstanzen reduziert. Sowohl Ascorbinsäure als auch Sulfit verhindern die Bräunung komplett. Erst nachdem sie verbraucht sind, ist eine Zunahme von Chinonen photometrisch zu messen.

Deutlicher ist dies in der Darstellung von Sauerstoffverbrauch gegen Extinktion zu erkennen (Abb.66). Ein Mol Ascorbinsäure oder Natriumsulfit werden durch ein halbes Mol O_2 oxidiert. Dabei wird die Oxidation über das System Brenzcatechin/PPO und damit schneller als die Spontanoxidation (Abb.67) ablaufen. Der vollständige Verbrauch von 0,5mmol/l Inhibitor deutet sich hier jedoch schon bei einem Sauerstoffverbrauch von 0,2mmol/l (entspricht 0,4mmol/l Inhibitor) an. Diese Diskrepanz ist mit dieser Versuchsanordnung nicht zu erklären. Es wäre jedoch möglich, daß eine Oxidation schon vor Beginn des Versuchs eingesetzt hat, oder die eingesetzten Substanzen haben bereits als Feststoffe mit Sauerstoff reagiert.

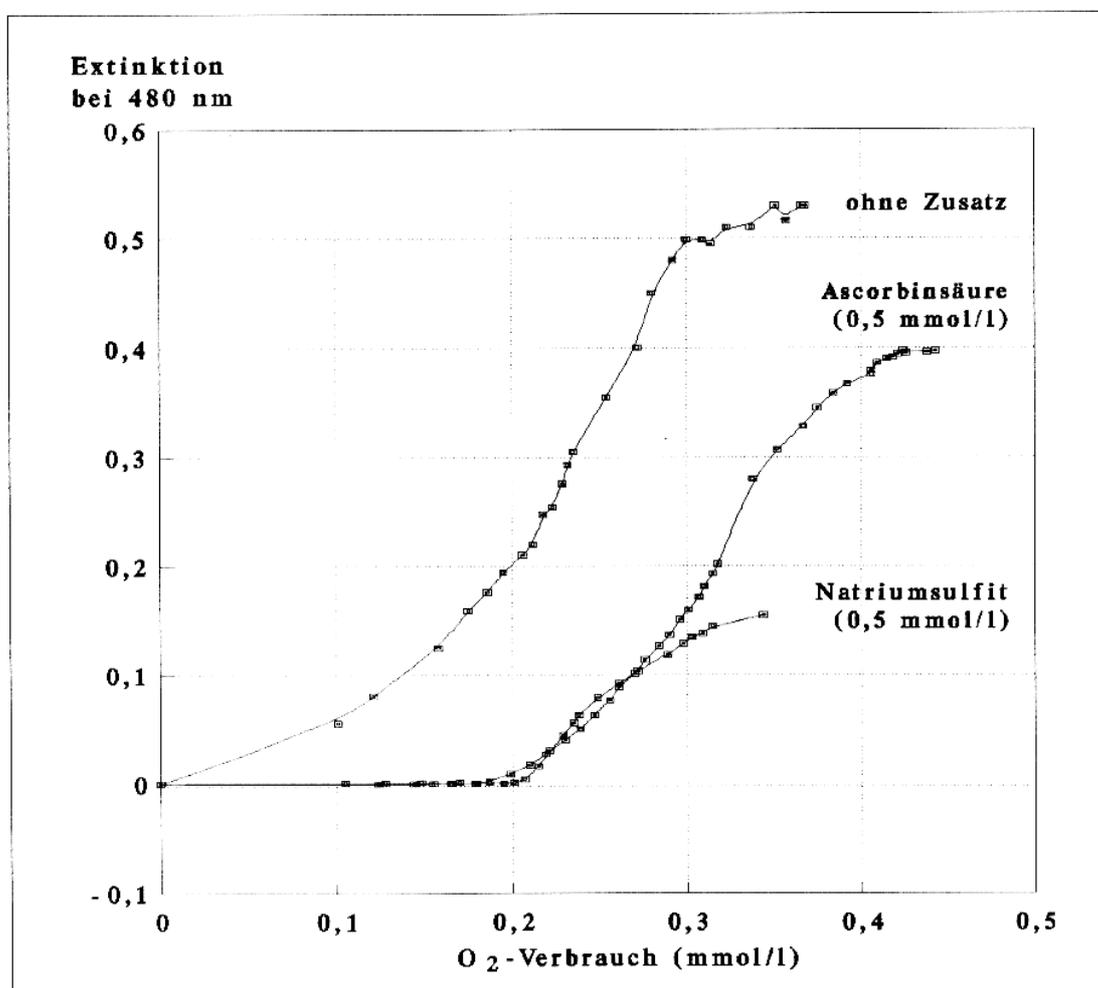


Abb.66 Korrelation von Sauerstoffverbrauch und Extinktion mit verschiedenen Inhibitoren.

Auch wenn dieser Sachverhalt in diesem Zusammenhang ungeklärt bleibt, so wird doch einiges über die Wirkungsweise dieser beiden Bräunungs-Inhibitoren deutlich.

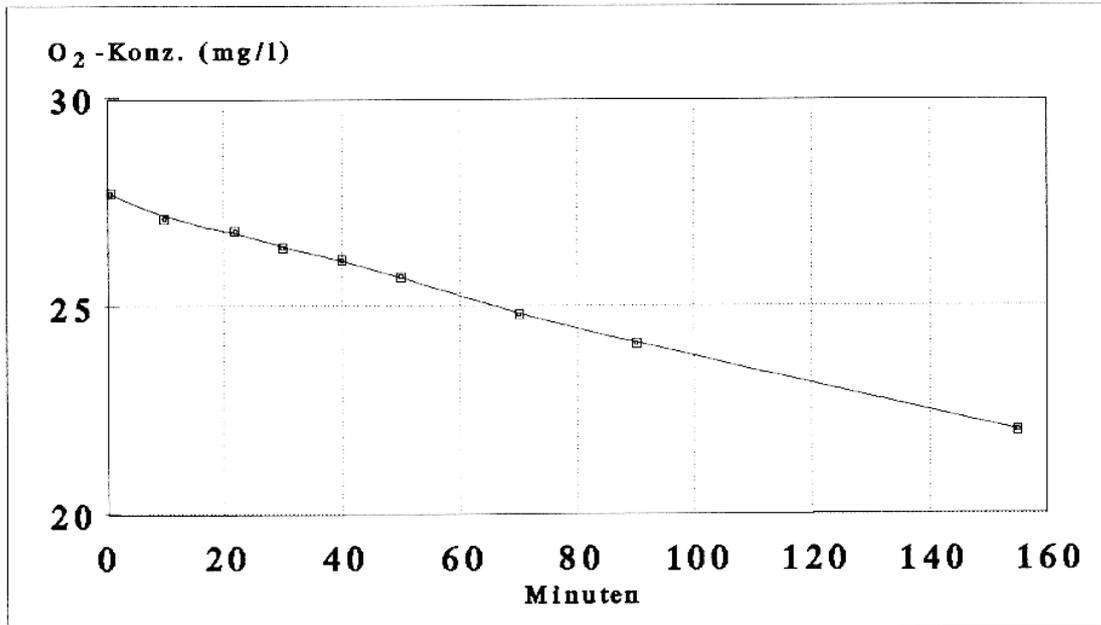


Abb.67 Spontanoxidation von Ascorbinsäure (0,5 mmol/l)

Eigentlich sollte man annehmen, daß die Oxidation des Brenzcatechins vollständig abläuft wenn der Inhibitor verbraucht ist, sofern noch ausreichend Sauerstoff vorhanden ist. Ascorbinsäure aber zeigt auch nach vollständigem Umsatz noch eine Bräunungsverhinderung im Vergleich zur Referenzlösung ohne Zusätze. Deutlicher ist dies bei Natriumsulfit zu beobachten. Somit ist die Inhibitorwirkung nicht nur auf die Reduktion der Chinone zurückzuführen. Ein Verbrauch von o-Benzochinon durch die Sekundärreaktion, und eine damit verbundene Abnahme der Maximal-Extinktion bei 480nm, ist weitgehend zu vernachlässigen, da gebildetes o-Chinon durch die Inhibitoren sofort zurückgebildet wird. Die Sekundärreaktion kann somit erst nach vollständigem Verbrauch der Inhibitoren verstärkt ablaufen. Auch eine Gerbwirkung durch die entstandenen Produkte ist als unerheblich anzusehen, da eine Hemmung vorwiegend beim Einsatz der Inhibitoren auftritt, also die Bildung der Produkte hinaus gezögert wird. Vermutlich ist die schwächere Bräunung bei Zugabe von Ascorbinsäure oder Natriumsulfit mit einer direkten Wirkung auf das Enzym verbunden. Weiterhin kann Natriumsulfit mit o-Benzochinon reagieren, also am Substrat angreifen.

4.3 Sauerstoffverbrauch von Tomatensaft

Auch bei frisch gepreßtem Tomatensaft ist eine Abnahme des angebotenen Sauerstoffs zu messen, er zeigt aber ein anderes Verhalten als Apfelsaft. Zum einen ist auffällig, daß mit dem Sauerstoffverbrauch keine feststellbare Intensivierung der Färbung auftritt, zum anderen weist der Kurvenverlauf nicht auf eine Beteiligung von Enzymen hin.

Die Bestimmung von Ascorbinsäure mit DCPIP zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Sauerstoffmessung (Probeentnahme aus Apparatur 2) deutet auf einen O_2 -Verbrauch aufgrund einer Spontanoxidation von anwesendem Vitamin C hin (Abb.68).

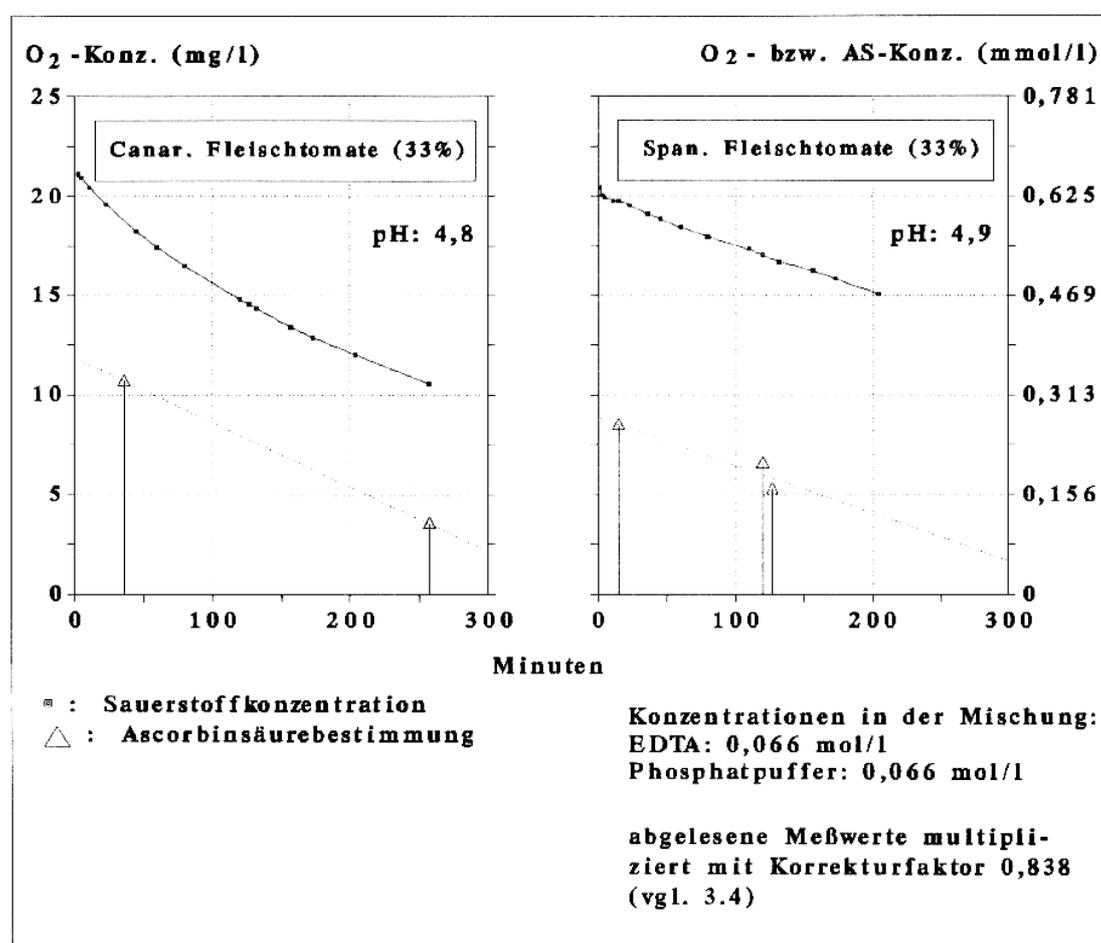


Abb.68 Sauerstoffverbrauch einer Saft/Wasser-Mischung (Fleischtomate)

Allerdings verhält es sich mit der Stöchiometrie hier anders als bei der Hemmung der enzymatischen Bräunung durch Ascorbinsäure. Im Modellversuch (4.2) wurden 2 Mol Ascorbinsäure durch 1 Mol Sauerstoff über das Enzymsystem PPO/Brenzcatechin oxidiert, während bei Tomatensaft ein molares Verhältnis von 1 : 1 zu beobachten ist.

Nach LIAO und SEIB [3, S.298] soll die Spontanoxidation von Ascorbinsäure über Wasserstoffperoxid, als Zwischenprodukt, ablaufen (Abb.23). Dabei wird Wasserstoffperoxid im zweiten Reaktionsschritt durch ein weiteres Molekül Ascorbinsäure reduziert. Für die Gesamtreaktion ergibt sich damit ein stöchiometrisches Verhältnis von 2 : 1. Um diese Diskrepanz zu klären, wurde der Sauerstoffverbrauch einer reinen Vitamin C-Lösung gemessen und in bestimmten Abständen die Konzentration der Ascorbinsäure mit DCPIP bestimmt (Abb.69). Die Ascorbinsäurekonzentration wurde so bemessen, daß sie in etwa der des Tomatensaftes entspricht.

Hierbei verläuft die Meßreihe der Ascorbinsäurekonzentration nahezu parallel zu der, der Sauerstoffkonzentration. Dies zeigt eindeutig, daß unter diesen Bedingungen Vitamin C im Verhältnis 1 : 1 mit Sauerstoff reagiert. Weiterhin konnte in dieser Mischung Wasserstoffperoxid mit Titan(IV)-sulfat qualitativ nachgewiesen werden (schwache Gelbfärbung), während Peroxid-Teststäbchen der Firma Merck kein Ergebnis erbrachten*. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß der zweite Reaktionsschritt (Reduktion von Wasserstoffperoxid) unter diesen Bedingungen nicht, oder nur sehr langsam abläuft.

* In einem Reagenzglasversuch, bei dem eine Ascorbinsäurelösung höherer Konzentration mit Sauerstoff begast wurde konnte nach einer halben Stunde Wasserstoffperoxid deutlich mit Titan(IV)-sulfat nachgewiesen werden. Die Teststäbchen zeigten, selbst in einer etwa 3%igen H₂O₂-Lösung die mit Ascorbinsäure versetzt war, keinerlei Wasserstoffperoxid an. Die Erklärung hierfür ist mit Sicherheit in den unterschiedlichen Testprinzipien zu sehen. Während der Nachweis mit Titan(IV)-sulfat auf der Bildung eines Komplexes ([TiO(O₂)(H₂O)₄]) beruht, wird Peroxidsauerstoff bei dem Teststäbchensystem enzymatisch auf einen organischen Redoxindikator übertragen, der dadurch in ein blaugefärbtes Oxidationsprodukt überführt wird (Information der Packungsbeilage). Bei den Teststäbchen handelt es sich also um ein Redoxsystem welches durch die Anwesenheit von Ascorbinsäure empfindlich gestört wird.

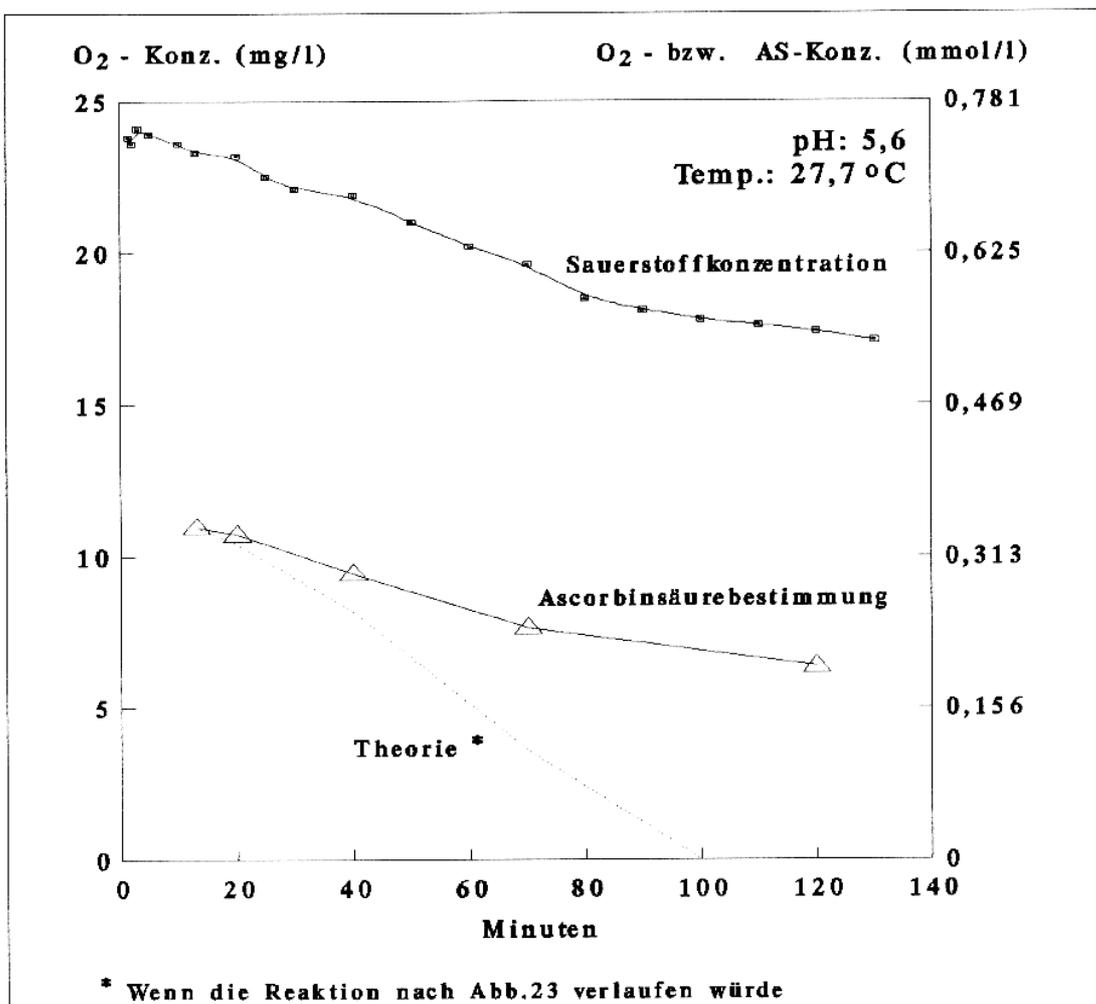


Abb.69 Oxidation von Ascorbinsäure

Nun stellt sich jedoch die Frage, was mit dem entstehenden Wasserstoffperoxid im Tomatensaft passiert. Könnte dieses nicht durch eventuell anwesende Katalase wieder zu Sauerstoff umgesetzt werden? Ein Reagenzglasversuch verschaffte Klarheit in diesem Punkt. So zeigte eine Mischung aus frisch gepreßtem Tomatensaft und 3%iger Wasserstoffperoxidlösung keine deutliche Gasentwicklung, im Vergleich zu der Reaktion mit Kaliumpermanganat. Da die entstehenden Wasserstoffperoxidmengen bei der Oxidation von Ascorbinsäure wesentlich niedriger (im Millimol-Bereich) liegen, ist ein Umsatz von Wasserstoffperoxid durch Katalase zu vernachlässigen.

Damit kann der Sauerstoffverbrauch von Tomatensaft auf eine nichtenzymatische Oxidation von Ascorbinsäure zurückgeführt werden.

4.4 Sauerstoffverbrauch von Salatgurkensaft

SCHORNMÜLLER [33, S.207] weist darauf hin, daß u.a. Gurken ein kupferhaltiges Enzym (Ascorbatoxidase) beinhalten. Dieses konnte im Versuch bestätigt werden (Abb.70). Da auch hier keinerlei Färbung auftritt, ist eine Oxidation von Phenolen auszuschließen.

So zeigt unter Sauerstoffausschluß gepreßter Gurkensaft gegenüber Tomatensaft eine beschleunigte Oxidation. Zugesezte Ascorbinsäure wird schneller umgesetzt als dies ohne Anwesenheit von Gurkensaft geschieht. Leider konnte Ascorbinsäure, aufgrund der Schnelligkeit mit der die Reaktion abläuft, nicht titrimetrisch erfaßt werden.

EDTA zeigt auch hier keine Wirkung auf die Reaktionsgeschwindigkeit (Abb.71). Somit wird auch bei Zusatz von EDTA, wie dies bei Tomatensaft geschah, eine Anwesenheit von Ascorbatoxidase nicht unbemerkt bleiben.

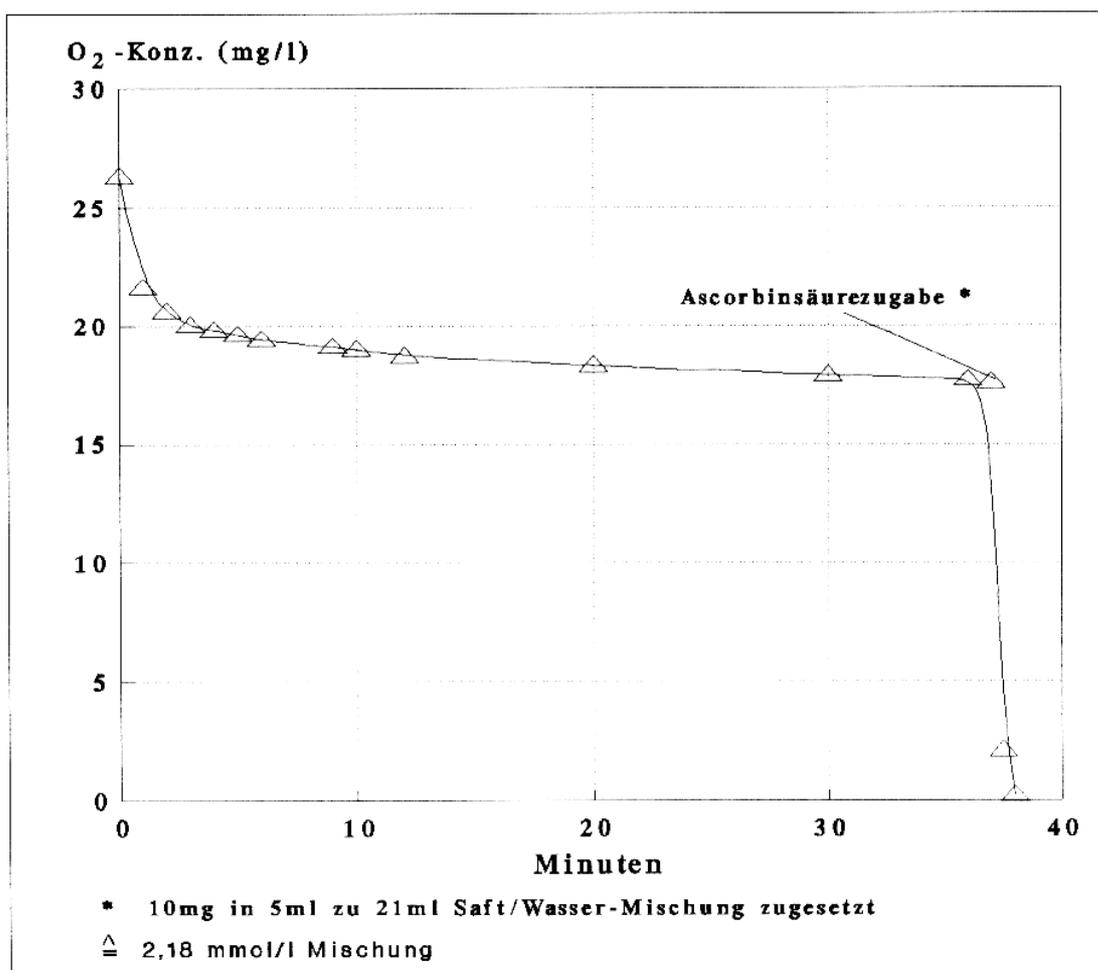


Abb.70 Sauerstoffverbrauch einer Saft/Wasser-Mischung (Salatgurke 33,3%)

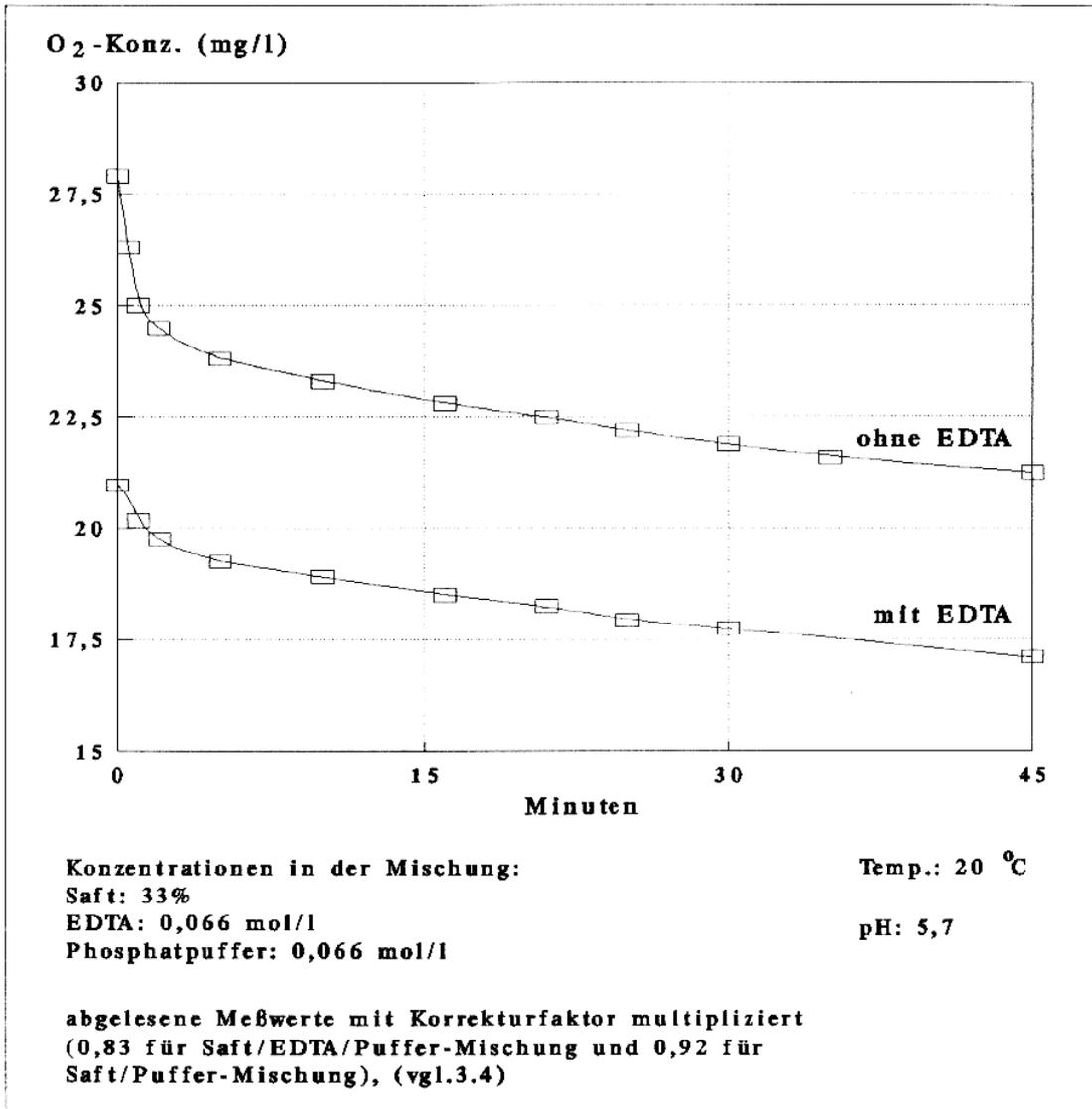


Abb.71 Sauerstoffverbrauch von Saft/Wasser-Mischungen (Gurke)

4.5 Zwei Biosensoren

Bisher wurde die Oxidation von Lebensmitteln oder deren Inhaltsstoffen untersucht. Dabei spielten die Enzyme PPO und Ascorbatoxidase eine wichtige Rolle. Nun sollen die Lebensmittel, welche diese Enzyme enthalten, direkt eingesetzt werden, um mit Hilfe der CLARK-Meßzelle, die Substrate quantitativ zu bestimmen. 1985 beschrieben SIDWELL und RECHNITZ einen elektrochemischen Biosensor für Dopamin [40] - die sogenannte "Bananatrode". Hier werden zwei nach

diesem Prinzip arbeitende Sensoren zur Bestimmung von o-Dihydroxyphenolen und Ascorbinsäure vorgestellt.

4.5.1 Die "Bananatrode"

SIDWELL und RECHNITZ verwendeten als Basis die Clark-Elektrode in Verbindung mit einer dünnen Bananenscheibe, welche mit einer Dialysemembran auf der Membran der Meßzelle fixiert wird. Da das Enzymsystem PPO hier immobilisiert ist, kann man anhand des angezeigten Sauerstoffmeßwertes die Konzentration von Dopamin oder anderer geeigneter Phenole feststellen.

Der Nachbau dieses Biosensors gestaltete sich als schwierig, da die Scheiben der Banane nicht in der gewünschten Dicke (0,75 mm) geschnitten werden konnten und, weil die vorhandene Dialysemembran oder handelsübliche Einmachhaut in Verbindung mit dem Bananenfruchtfleischgewebe eine zu große Barriere für Substrat und Sauerstoff darstellten. In reinem luftgesättigtem Wasser wurden so Sättigungswerte von etwa 3% gemessen.

In den folgenden Versuchen wurde dann auf die Dialysemembran vollständig verzichtet und, anstatt Bananenfruchtfleisch Bananenschale verwendet (Versuchsaufbau und Vorbereitung der Bananenschale siehe Abschnitt 3., Abb.38 und 39) . Als zu messende Substanzen wurden Brenzcatechin und Dopaminhydrochlorid eingesetzt. Nach der Messung von Dopamin stellte der Sensor allerdings seine Funktion komplett ein, vermutlich weil der verwendeten Infusionslösung aus dem klinischen Bedarf als Stabilisator Natriumdisulfit zugesetzt war.

Nach der Vorbereitung verblieb der Sensor einen Tag in luftgesättigter Phosphatpufferlösung (0,1 mol/l, pH = 6,88). Diese Zeitperiode ist notwendig, damit alle pflanzeigenen phenolischen Inhaltsstoffe der Bananenschale vollständig umgesetzt werden. Danach ist der Biosensor etwa 3-4 Tage einsatzfähig. Die Substrate wurden in destilliertem Wasser gelöst. Der Meßbereich liegt im Bereich von etwa 0,05 - 0,5 mmol/l für gelöstes Brenzcatechin bzw. Dopamin. Die unterschiedlichen Konzentrationen der Probelösungen wurden durch Verdünnung einer 1,5 millimolaren Stammlösung hergestellt. Anwesende Ascorbinsäure stört die Messung erheblich, da

umgesetztes Substrat, welches sich in der Bananenschale anreichert, wieder zu oxidierbaren Stoffen umgewandelt wird. Weiterhin wäre es möglich, daß andere in der Banane vorkommende Enzyme (Ascorbatoxidase ?) direkt die Ascorbinsäure oxidieren und damit den Meßwert verfälschen.

Funktionsweise des Biosensors. Das Prinzip der Elektrode basiert darauf, daß gelöster Sauerstoff das Bananenschalengewebe passieren muß, bevor er an der CLARK-Elektrode das Meßsignal auslösen kann. Aufgrund des damit verbundenen größeren Diffusionswiderstandes resultiert ein geringeres Signal. Das Gerät zeigt in diesem Fall bei luftgesättigtem destillierten Wasser einen Sättigungsindex von ca. 60% (theoretisch = 0 mmol Substrat) an. Gleichzeitig mit dem Sauerstoff diffundiert Substrat in die Bananenschale, wo es enzymatisch oxidiert wird. Das Resultat ist eine Erniedrigung des Sauerstoffsättigungsmeßwertes. Da nun in der Problelösung die Sauerstoffkonzentration konstant gehalten wird (Durchleiten von Luft), ist der angezeigte Meßwert in einem gewissen Bereich direkt proportional zur Substratkonzentration in der Lösung. Aus dem größeren Diffusionswiderstand resultiert allerdings eine längere Ansprechzeit der Elektrode, nach der sich ein konstanter Wert einstellt.

Messungen. Die Aufnahme der Meßwerte geschah nach 5 Minuten; zu diesem Zeitpunkt stellte sich eine konstante Sauerstoffsättigung an der Elektrodenmembran ein. Das Probevolumen betrug 80 ml und wurde während der Messung durch Rühren und Einleiten von Luft bei einer konstanten Sauerstoffkonzentration gehalten. Für Brenzcatechin und Dopamin wurden Kalibriergeraden aufgenommen (Abb.72). Dabei zeigt das Medikament Dopamin eine geringere Reaktion mit dem Sensor als Brenzcatechin. Das könnte sicherlich an den unterschiedlichen Oxidationsgeschwindigkeiten liegen. Allerdings wurde der Einfluß des als Stabilisator zugesetzten Natriumdisulfits nicht weiter untersucht, da der Inhibitor dem Dopamin bereits vom Hersteller beigemischt wurde.

Es zeigte sich, daß die "Bananatrode" in dieser Form nicht besonders stabil war. Während die Reaktion des Biosensors am 1. Tag noch weitgehend linear verlief, war sie an den darauffolgenden Tagen charakteristisch verändert (Abb.73).

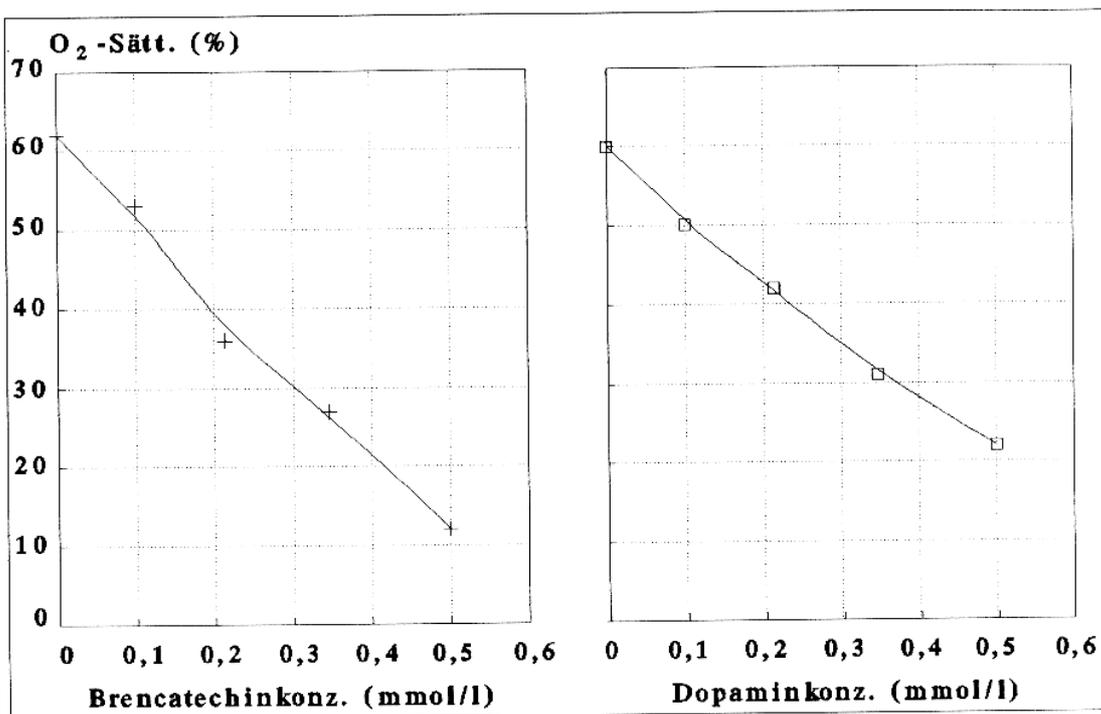


Abb.72 Typische Reaktion des Biosensors

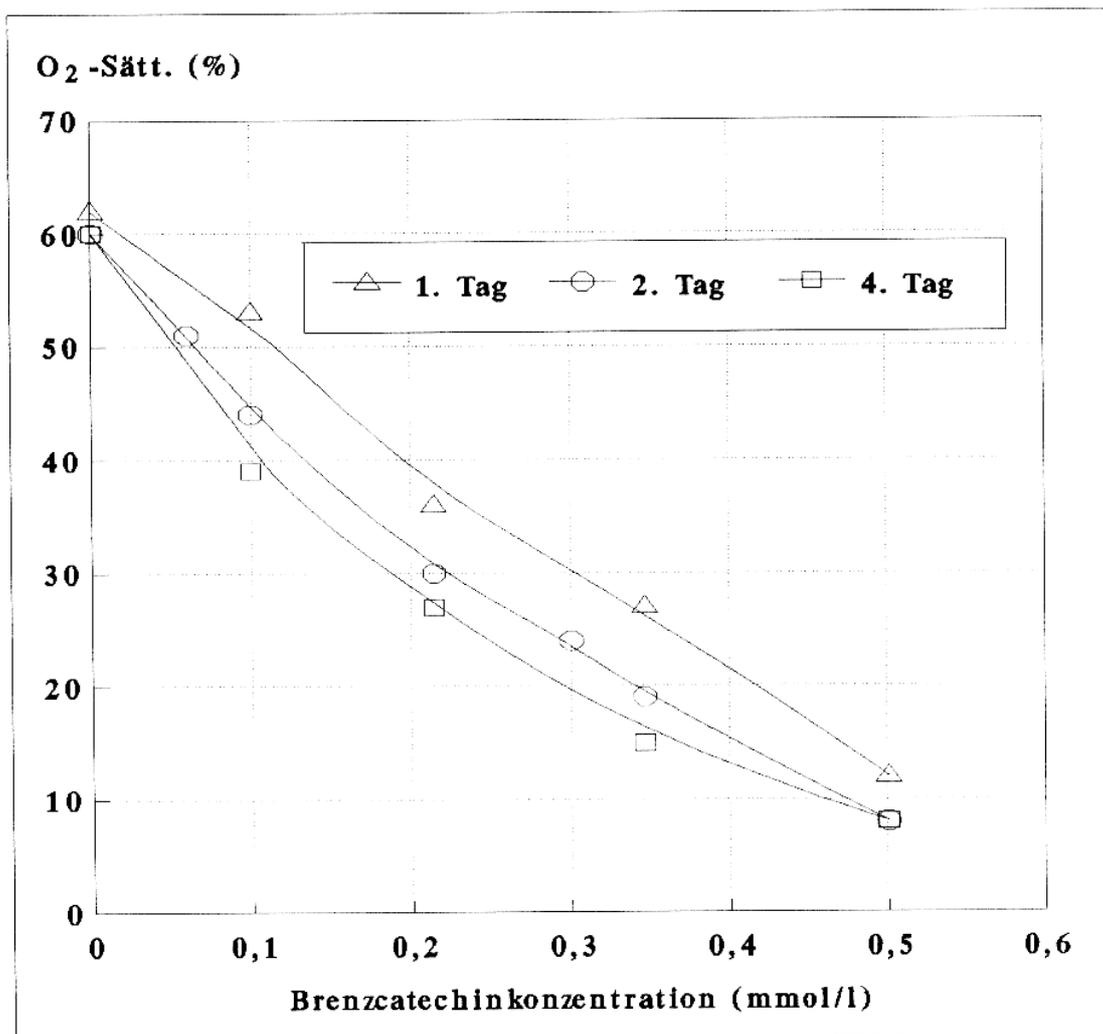


Abb.73 Haltbarkeit des Biosensors

So deutet sich bei den geringeren Konzentrationen eine größere Empfindlichkeit an als bei den größeren Konzentrationen. Das Resultat ist ein kurvenförmiger Verlauf der Meßwerte. Wahrscheinlich überlagern sich hier zwei Effekte. Zum einen konnte eine korrekte Eichung der CLARK-Meßzelle nicht mehr vorgenommen werden, da der Diffusionswiderstand durch die Bananenschale erhöht ist, zum anderen nimmt sicherlich die Aktivität der Polyphenoloxidasen im Pflanzengewebe mit der Zeit ab.

In Vorversuchen war eine irreversible Empfindlichkeitserniedrigung nach Kontakt mit Brenzcatechinlösungen hoher Konzentration zu beobachten. Der Grund dafür ist mit größter Wahrscheinlichkeit eine Gerbung der Proteinkomponente des Enzyms durch die Reaktionsprodukte. Es ist daher anzunehmen, daß dieser Gerbungseffekt sich auch bei Messungen mit niedrigen Konzentrationen (0,1-0,5 mmol/l) auswirkt.

4.5.2 Ein Biosensor für Ascorbinsäure auf der Basis von Gurkensaft

Wie in Abschnitt 4.3 gezeigt werden konnte, enthalten Salatgurken das Enzym Ascorbatoxidase. Es lag nahe, auch dieses System auf seine Tauglichkeit zur quantitativen Bestimmung von Vitamin C zu prüfen. Da für die Bestimmung von Ascorbinsäure mehrere Verfahren vorliegen, bietet sich ein Vergleich mehrerer Methoden an. Neben dem Biosensor (Abb.74) wurden eine photometrische und eine maßanalytische Bestimmung von Ascorbinsäure angewendet. Alle Methoden basieren auf Redoxvorgängen und beinhalten damit die unter 2.1.4 beschriebenen Fehlerquellen. Der Vorteil besteht allerdings darin,

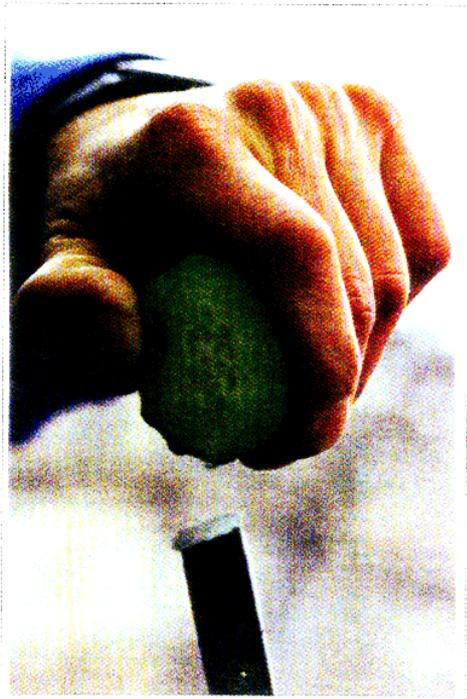


Abb.74 Vorbereitung des Ascorbinsäuresensors

daß sie einfach und schnell durchzuführen sind und bei Nichtanwesenheit störender Stoffe gute Ergebnisse liefern. Die Chemie und die Herstellung, der zum Verfahren benötigten Lösungen, wurden bereits in den vorangegangenen Abschnitten ausführlich behandelt.

Ausgehend von einer frisch angesetzten Vitamin C-Stammlösung (2000 mg/l) wurde eine Verdünnungsreihe (76, 181, 245, 333 und 571 mg/l) hergestellt. Das Probevolumen betrug jeweils 60 - 80 ml. Davon wurden 2 ml für die Photometrie, zwei mal 1 ml für die Titration und der Rest für den Biosensor verwendet. Zur Bestimmung des Blindwertes wurde destilliertes Wasser benutzt.

Bestimmung mit Molybdätosphat. Durch Ascorbinsäure zu Molybdänblau reduzierte Natriummolybdätosphat-Lösung zeigt ein Extinktionsmaximum bei etwa 720 nm (Abb.75).

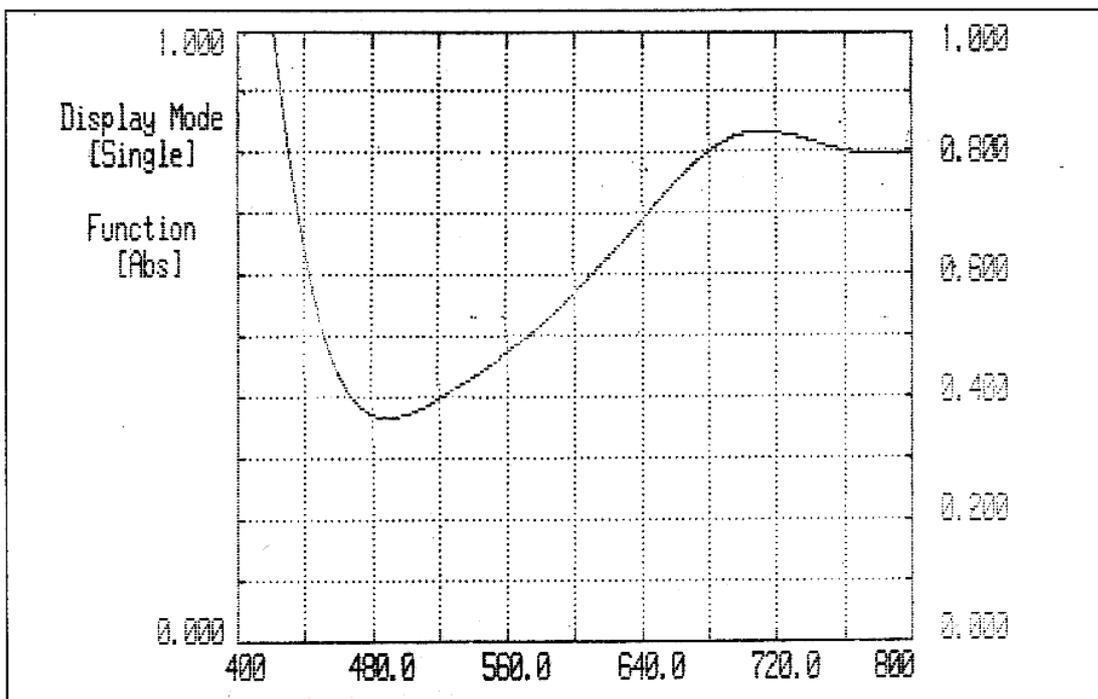


Abb.75 Absorptionsspektrum von Molybdänblau

Die Molybdatophosphat-Stammlösung wurde 1 : 1 verdünnt und davon 5 ml mit 2 ml Probe versetzt und nach ca. zwei Minuten die Extinktion gegen den Blindwert (2 ml destilliertes Wasser + 5 ml Molybdatophosphat-Lösung) gemessen. Wie Abbildung.76 zeigt, ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen Ascorbinsäurekonzentration und Extinktion.

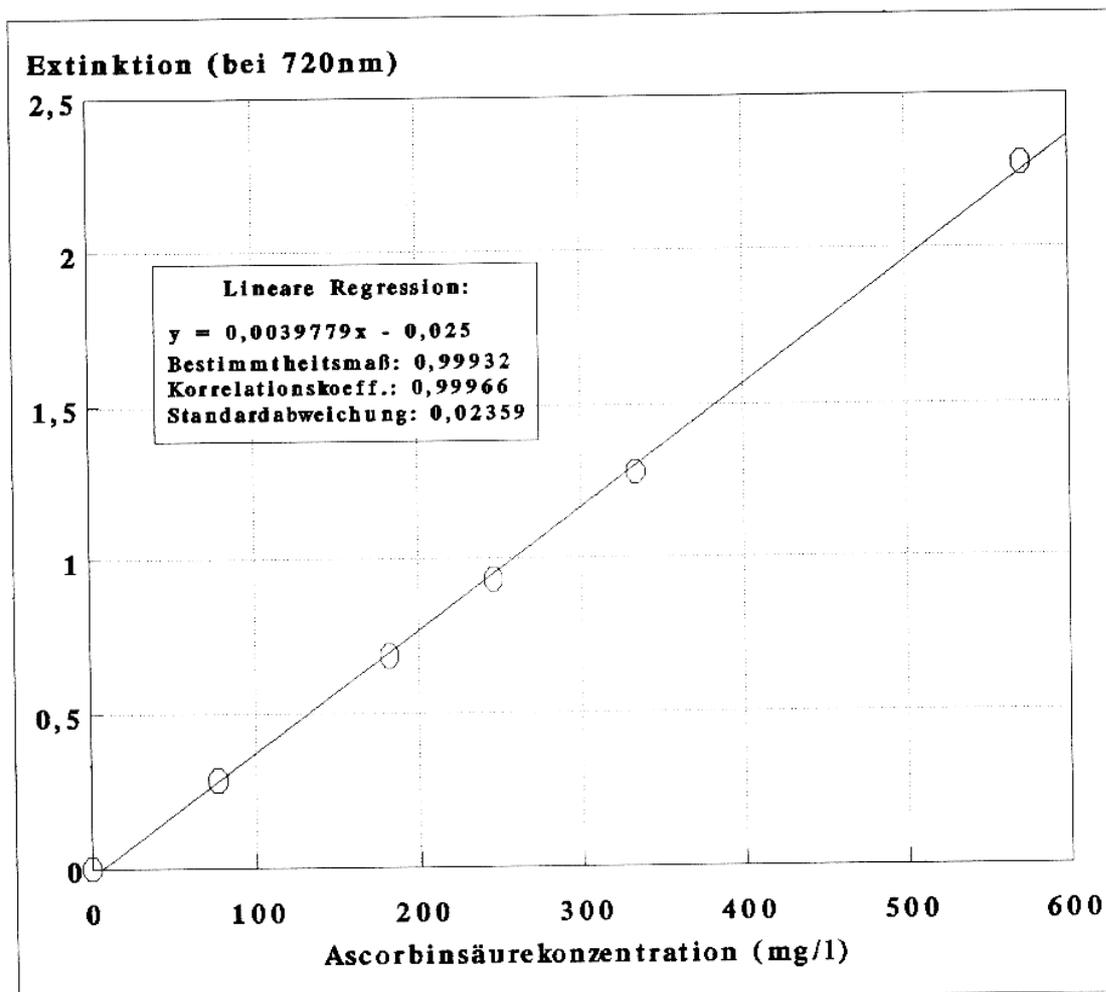


Abb.76 Kalibriergerade für Photometrische Ascorbinsäurebestimmung mit Natriummolybdatophosphat

Methode nach TILLMANN. Normalerweise wird bei der maßanalytischen Meßtechnik nach TILLMANN die Ascorbinsäurekonzentration direkt aus dem Verbrauch an 2,6-Dichlorphenolindophenol-Lösung (DCPIP), nach einer Titerbestimmung, ermit-

telt. Der Titer wird dann aus dem Verbrauch an DCPIP-Lösung (a) für eine Ascorbinsäurestandardlösung, nach Abzug des Verbrauchs für den Blindwert (b) und dem Gehalt an Vitamin C (x), der zugesetzten AS-Standardlösung nach Gleichung 12 berechnet.

$$12 \quad F(\text{DCPIP}) = \frac{x}{(a - b)} = \frac{\text{mg AS}}{\text{ml DCPIP}}$$

In diesem Fall wurde jedoch der Verbrauch für die unterschiedlichen Ascorbinsäurelösungen der Verdünnungsreihe gegen die Konzentration aufgetragen (Abb.77) und die Konzentration einer Probe aus der Geradengleichung bestimmt.

Die Titration wurde für jede Probe doppelt durchgeführt und gemittelt.

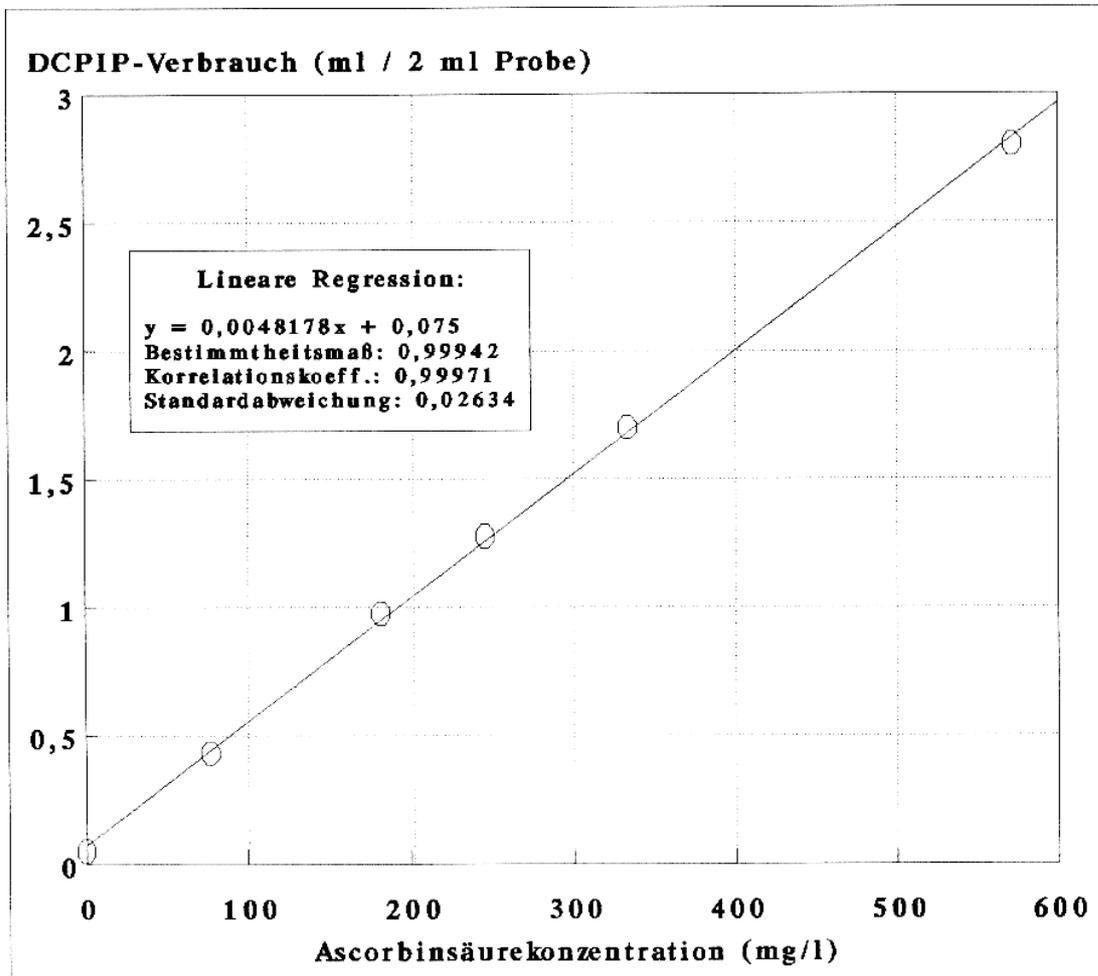


Abb.77 Maßanalytische Ascorbinsäurebestimmung mit 2,6-Dichlorophenolindophenol

Biosensor. Ascorbatoxidase oxidiert unter Verbrauch von Sauerstoff die Ascorbinsäure. Das Prinzip dieses enzymatisch arbeitenden Biosensors ist sonst das gleiche wie bei der Bananatrode, nur wurde hier anstatt Pflanzengewebe saugfähiges, getränktes Papier unter einer semipermeablen Membran (Einmachhaut) auf der CLARK-Elektrode fixiert. Als Enzymlösung wurde frisch gepreßter Salatgurkensaft verwendet. Wegen der Benutzung von Einmachhaut und Papier reduziert sich der Sauerstoffsättigungsindex für luftgesättigtes Wasser von 100 auf ca. 42 %. Damit ergibt sich, bei einem Meßbereich von 0 - 600 mg Ascorbinsäure pro Liter und einer Meßwertauflösung von 1%, eine Ablesegenauigkeit von 14,3 mg/l (Abb.78). Die Meßwerte wurden nach sieben Minuten aufgenommen.

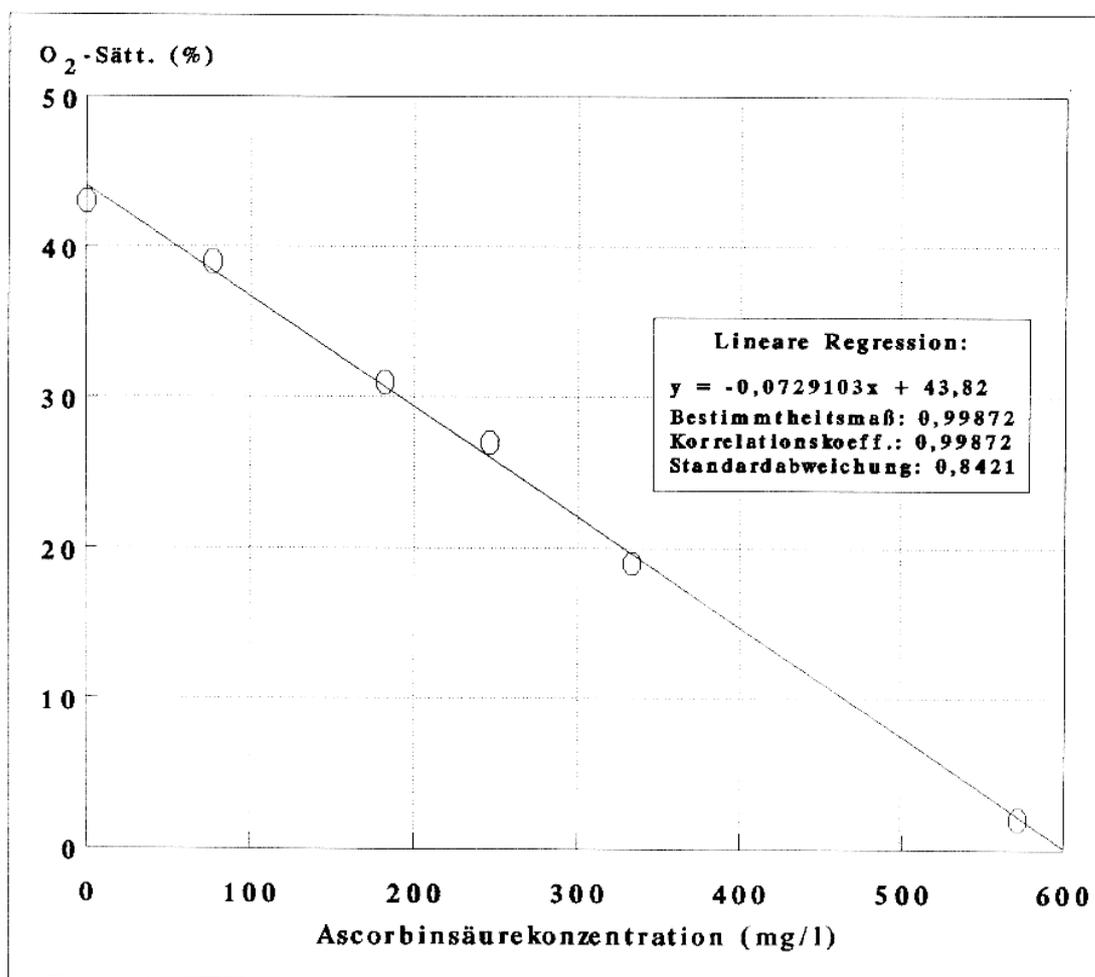


Abb.78 Biosensor für Ascorbinsäure (Kalibriergerade)

Da alle drei Methoden für reine Ascorbinsäurelösungen gute Ergebnisse lieferten, wurden nun Vitamin C-Bestimmungen an einer Auswahl von Lebensmitteln durchgeführt. Es handelte sich dabei um handelsübliche Fruchtsäfte und in einem Fall um Vitaminlutschbonbons, die hauptsächlich aus Traubenzucker bestanden. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Tabelle 6 wiedergegeben. Es zeigten sich starke Abweichungen zwischen den einzelnen Testmethoden.

	Photometrie	Titration	Biosensor	Packungs- aufdruck bzw. Literaturwert
Vitraletten (Vitamin- bonbons)	558 mg/100g	560 mg/100g	429 mg/100g	500 mg/100g
Apfelsaft	224 mg/l	374 mg/l	434 mg/l	300mg/l (Zusatz)
sw. Johannis- beernektar	737 mg/l	Farbe stört	626 mg/l	300 mg/kg [9]
Orangensaft	419 mg/l	452 mg/l	516 mg/l	380 mg/l
Tomatensaft	57 mg/l	29 mg/l	272 mg/l	170 mg/kg [9]

Tab.6 Ascorbinsäure-Bestimmung in Lebensmitteln mit verschiedenen Testmethoden

Als Gründe für dieses Verhalten lassen sich für jeden Einzelfall nur Mutmaßungen anstellen. Generell kann jedoch gesagt werden, daß die Lebensmittel (von den Vitaminbonbons einmal abgesehen) neben Ascorbinsäure noch andere reduzierende Inhaltsstoffe enthalten können und die zur Bestimmung eingesetzten Substanzen zeigen dann eine unterschiedliche Empfindlichkeit auf diese Stoffe.

In dem komplexen biologischen System Gurkensaft erwartet man neben Ascorbatoxidase sicherlich noch eine Reihe weiterer oxidativ wirkender Enzyme. Angenommen, die untersuchten Lebensmittel enthalten neben oxidierbaren Substanzen auch noch inhibitorisch wirksame Stoffe, so ist mit Abweichungen nach unten und oben zu rechnen.

Um hier mehr Gewissheit zu bekommen, wären Aufstockungsversuche sicherlich hilfreich.

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

a) Ergebnisse der Messungen des O₂-Verbrauchs von Apfelsaft/Wasser-Mischungen

- Verschiedene Apfelsorten zeigen eine unterschiedliche Reaktivität mit Sauerstoff. Von den untersuchten Sorten reagierte Boskoop am schnellsten und Granny Smith am langsamsten
- Den für die Messungen günstigsten Sauerstoffverbrauch zeigte Golden Delicious. In einigen Fällen kamen jedoch auch die Sorten Jona Gold und Boskoop zum Einsatz.
- Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Apfelsaftbräunung und Sauerstoffverbrauch
- Die Reaktionsgeschwindigkeit läßt sich durch eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration bis zu einem Wert von etwa 10 mg/l steigern, darüberhinaus ist keine nennenswerte Steigerung mehr möglich.
- Es ließ sich eine MICHAELIS-Konstante für Sauerstoff von Apfelsaft der Sorte Golden Delicious bestimmen. Diese ist aus enzymkinetischer Sicht ein Mischwert, der durch mehreren Enzyme und Substrate entsteht, dementsprechend gilt sie nur mit Einschränkungen.
- Folgende Behandlungen führten zu einer Abnahme der Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs:
 - Kochen
 - Tiefgefrieren
 - DDTC-Zusatz
 - Benzoessäure-Zusatz
- EDTA zeigte keine Wirkung auf die Reaktionsgeschwindigkeit
- Mit DDTC konnte eine Abschätzung des Enzymgehalts vorgenommen werden.

- Mikroorganismen können die Messungen stören. EDTA wurde erfolgreich als Hemmstoff eingesetzt werden.

b) Ergebnisse aus den photometrischen und polarographischen Messungen bei Verwendung von Antioxidationsmitteln im Modellversuch

- Es konnte eine inhibierende Wirkung von Ascorbinsäure und Natriumsulfit auf die enzymatische Bräunung festgestellt

werden. Neben der Rückführung der Produkte in ihre Ausgangsstoffe müssen noch weitere direkte Wechselwirkungen zwischen Enzym und diesen Zusatzstoffen bestehen.

- Über photometrische Messungen war es möglich, am System PPO/Brenzcatechin die aufeinanderfolgende Bildung unterschiedlicher Produkte nachzuweisen. Diese können als End- und Zwischenprodukte einer Polymerisationsreaktion gedeutet werden.

c) Ergebnisse der Messungen des O₂-Verbrauchs von Tomatensaft/Wasser-Mischungen

- Der Sauerstoffverbrauch von Tomatensaft ließ sich eindeutig auf eine Spontanoxidation von Ascorbinsäure zurückführen. Das hier auftretende stöchiometrische Verhältnis von 1 : 1 konnte einem Modellversuch bestätigt werden. Hier konnte als eines der entstehenden Produkte Wasserstoffperoxid mit Titan(IV)-sulfat nachgewiesen werden, während das Teststäbchensystem der Firma Merck durch Ascorbinsäure empfindlich gestört wird.

d) Ergebnisse der Messungen des O₂-Verbrauchs von Gurkensaft/Wasser-Mischungen

- Die Messungen an Gurkensaft bestätigten Literaturangaben, nach denen Gurken das Enzym Ascorbatoxidase enthalten sollen.

- EDTA zeigte keine Wirkung auf die Reaktionsgeschwindigkeit

e) Ergebnisse der Messungen mit den konstruierten Biosensoren

- Die Biosensoren auf der Basis der CLARK-Meßzelle wurden zu folgenden Messungen erfolgreich eingesetzt:

Die Bananatrode ermöglichte die Bestimmung von zwei verschiedenen o-Dihydroxyphenolen mit einer Empfindlichkeit von 0,1 - 0,5 mmol/l.

Der Biosensor auf der Basis von Gurkensaft ermöglichte Ascorbinsäurebestimmungen im Bereich von etwa 50 - 600 mg/l.

- Bei vergleichenden Ascorbinsäurebestimmungen an Lebensmitteln mit drei Methoden (Bestimmung mit DCPIP, Molybdatophosphat und dem Biosensor) zeigten sich starke Unterschiede zwischen den einzelnen Testsystemen.

5. Abschließende Betrachtungen

Ziel dieser Arbeit war es, den Sauerstoffverbrauch von Lebensmittelinhaltsstoffen, mit der Methode nach CLARK zu bestimmen. Es sind verschiedene Methoden zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs bekannt, sie lassen sich grundsätzlich in zwei unterschiedliche Techniken einteilen.

a) Messung im Gasraum über der Probe

- Gaschromatographische Bestimmung
- Manometrische Bestimmung nach WARBURG

b) Gelöst-Sauerstoffmessung

- Stöchiometrische Methode nach WINKLER
- Polarographische Methode nach CLARK

In vielen Fällen, gerade im schulischen Bereich, scheitert die gaschromatographische Bestimmung am Fehlen der Apparate. Somit muß auf einfache Methoden zurückgegriffen werden.

Die manometrische Bestimmung nach WARBURG ist eine ältere Methode aus den 20er Jahren [41]. Diese mißt die Druckänderung in einer, über der Probe stehenden, Gasphase (Luft).

Im Gegensatz dazu wird bei der WINKLER-Methode und der hier angewandten Methode nach CLARK, direkt der Sauerstoff in der Probe bestimmt. Dabei muß die Probe nicht mit einer Gasphase im Gleichgewicht stehen.

Aufgrund der geringen Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser, treten bei gleichem Sauerstoffverbrauch, in einem abgeschlossenen nur wässrigen System, größere Änderungen der Sauerstoffaktivität auf, als in dem Gasraum eines Zwei-Phasen-Systems, mit gleichen Volumina Luft und Wasser (Abb. 79).

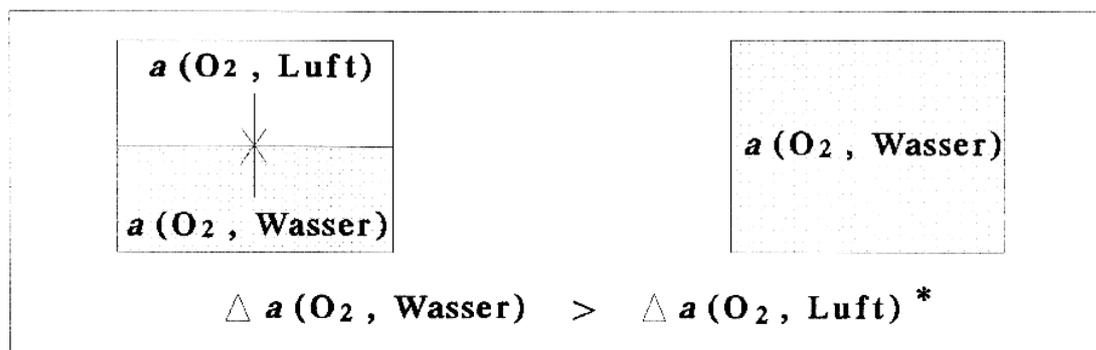


Abb.79 Ein- und Zwei-Phasen-System

* Erläuterung im Text

Dieser Unterschied kann durch die Wahl des Volumenverhältnisses des Zwei-Phasen-Systems ausgeglichen werden. Wird der Gasraum verkleinert, so werden sich die Änderungen, bei gleichbleibendem Sauerstoffverbrauch der Probe, vergrößern.

Dementsprechend können Messungen beider Verfahren mit etwa gleicher Empfindlichkeit durchgeführt werden. Wobei der apparative Aufwand bei der manometrischen Messung in der Gasphase größer ist [41].

Die Methode nach WINKLER besitzt zwei Nachteile: erstens läßt sich der Verlauf einer schnellen Oxidation schlecht verfolgen und zweitens können Störungen durch Lebensmittelinhaltsstoffe auftreten.

Somit sind polarographische Messungen in der wässrigen Phase anderen Meßtechniken vorzuziehen. Bei der Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs von festen oder sehr viskosen Lebensmitteln (z.B. Butter, Kartoffelchips, Kaffee usw.), muß jedoch auf eines der anderen Verfahren zurückgegriffen werden.

Verwendete Literatur:

- [1] ANTON DEIFEL, Die Chemie der Ascorbinsäure in Lebensmitteln; Chemie in unserer Zeit / 27. Jahrg. 1993 / Nr.4
- [2] A.F. HSU, J.J. SHIEH, D.D. BILLS, and K. WHITE, Inhibition of Mushroom Polyphenoloxidases by Ascobic Acid Derivatives; Journal of Food science Vol. 53, Nr.3, 1988
- [3] MING-LONG LIAO and PAUL A. SEIB, Chemistry of L-Ascorbic Acid Related to Foods; Food Chemistry 30 (1988)
- [4] P.J. DE RIJKE und W. VAN DER VEER, Quantitative Untersuchungen von Vitamin C und vitamin-C-haltigen Stoffen einschließlich qualitativer Schulversuche; Praxis der Naturwissenschaften - Chemie 4/41. Jahrg. 1992
- [5] H. ZONNEVELD in Bestimmung von Vitamin C in Früchten, Fruchtsäften, Gemüse und Konserven nach der Methode nach Tillmanns unter Ausschaltung reduzierender Stoffe; Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung Band 119 (1962/1963)
- [6] H. MOOR, Bestimmung der Ascorbinsäure in Lebensmitteln und biologischem Material; Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, Band - Vol. 47, Bern 1956
- [7] RÜDIGER BLUME, HANS JOACHIM BADER und MANFRED PLAUSCHINAT, Neue Aspekte der Ascorbinsäure-Chemie; Praxis der Naturwissenschaften - Chemie, Heft 10, 15. Okt. 1982, 31. Jahrg.
- [8] FRIEDHELM KOBER, Vitamin C als Lebensmittel; Praxis der Naturwissenschaften - Chemie, Nr.3, 1988, Jahrg.37
- [9] WERNER GROSCH, Übersichtsbericht: Ablauf und Analytik des oxidativen Fettverderbs; Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und -Forschung, Nr.157, 1975

- [10] **A. JÄGER**, Vitamin C (Ascorbinsäure) als Antioxidationsmittel in Schulversuche mit Lebensmittelzusatzstoffen, Fachgruppe in der GDCh, Behr's Verlag, Hamburg 1990
- [11] **REINHARD MATISSEK, FRANK-M. SCHNEPEL, GABRIELE STEINER**: Lebensmittelanalytik 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg / New York
- [12] **W. TERNES**, Die naturwissenschaftliche Zubereitung von Lebensmitteln, Behr's Verlag, Hamburg, 1990.
- [13] **WALTER POETHKE und WERNER KUPFERSCHMID**: Praktikum der Maßanalyse, 3. Auflage, Verlag Harry Deutsch, Thun und Frankfurt (Main) 1987.
- [14] **PETER SCHULER**: Oxi-Fibel, Einführung in die Gelöstsauerstoff-Meßtechnik, WTW, Weilheim 1987
- [15] **K. HERRMANN** im Handbuch der Lebensmittelchemie, Band V/2. Teil "Obst, Gemüse, Kartoffeln, Pilze", Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg / New York 1968
- [16] **GERD WEDLER**: Lehrbuch der physikalischen Chemie, Verlag Chemie, Weinheim / Deerfield Beach, Florida / Basel 1982
- [17] **OTTO-ALBRECHT NEUMÜLLER**: RÖMPPS Chemie Lexikon, 8. Auflage, Franck'sche Verlagshandlung, Stuttgart 1983
- [18] **KLAUS BECKER**, Bestimmung der Gasdurchlässigkeit von Kunststoff-Flaschen, Verpackungsrundschau (Technisch-wissenschaftliche Beilage) 6/1969
- [19] **ROLF KALTOFEN (Autorenkollektiv)**: Tabellenbuch Chemie, 8. Auflage, Deutsche Verlag für Grundstoffchemie, Leipzig 1986
- [20] **F. LEDL** in Encyclopaedia of food science, food technology, and nutrition, academic press, London / San Diego / New York / Boston / Sydney / Tokyo / Toronto 1993

[21] **WOLFGANG KAIM und BRIGITTE SCHWEDERSKI:** Bioanorganische Chemie: Zur Funktion chemischer Elemente in Lebensprozessen, Teubner-Studienbücher, Stuttgart 1991

[22] **A.G.H. LEA:** Farb und Gerbstoffe in englischen Mostäpfeln, Flüssiges Obst, Heft 8 / 1984,

[23] **W. DIEMAIR, J. KOCH, D. HESS:** Über den Einfluß der schwefligen Säure und Ascorbinsäure bei der Weinbereitung, Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, Band 113, 1960

[24] **WERNER GROSCH,** Übersichtsbericht: Ablauf und Analytik des oxydativen Fettverderbs, Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, Band 157, 1975

[25] **R. HEISS und K.EICHNER:** Haltbarmachen von Lebensmitteln, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg / New York / London / Paris / Tokyo / Hong Kong, 1990

[26] **PETER NEHRING und HANS KRAUSE:** Konserventechnisches Taschenbuch, 14. Auflage, Verlag Günter Hempel, Braunschweig 1963

[27] **ERWIN RIEDEL:** Anorganische Chemie, 2.verbesserte Auflage, Walter de Gruyter, Berlin / New York 1990

[28] **RUDOLF HEISS:** Wichtige Erkenntnisse aus Forschungsarbeiten über sauerstoffarme Lebensmittelverpackungen und daraus ableitbare Marktchancen, neue Verpackung 5/84,

[29] **W. HERLITZE, R. HEISS, K.BECKER und K. EICHNER:** Die Sauerstoffempfindlichkeit von Lebensmitteln und die Berechnung einer Verkaufsgerechten Kunststoff-Verpackung, Chemie Ingenieur Technik 1973, Heft 8

[30] **JANDER, BLASIUS:** Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum, 13. Auflage von STRÄHLE und SCHWEDA, Hirzelverlag Stuttgart 1990

- [31] Bedienungsanleitung für das Sauerstoffmeßgerät OXI 92, wissenschaftlich-technische Werkstätten G.M.b.H
- [32] **ULRICH SCHOBINGER und AHMED ASKAR:** Handbuch der Lebensmitteltechnologie - Frucht- und Gemüsesäfte, 2. Auflage, Stuttgart 1987
- [33] **JOSEF SCHORNMÜLLER:** Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg / New York 1974
- [34] **MAURICE HANSSEN und JILL MARSDEN:** E=essbar?, Gesellschaft für Literatur und Bildung, Köln 1990
- [35] **VAUGHN, LAX, DUKE:** PPO: the Chloroplast with no established function, *Physiol. Plantarum*, Band 72. (1988)
- [36] **E.H. COULSON** (organizer): special study Food science, Penguin Books Ltd., Nuffield Foundation 1971
- [37] **E.H. COULSON** (organizer): Teachers' guide to the special studys, Penguin Books Ltd., Nuffield Foundation 1970
- [38] **ELMADFA, AIGN, MUSKAT, FRITZSCHE, CREMER:** Die große GU-Nährwert-Tabelle: Kalorien/Joule- und Nährstoffgehalte unserer Lebensmittel, 2.Auflage, München 1992
- [39] **R.H. HELLINGER** in THOMAS E. FURIA (Hrg.), CRC Handbook of Food Additives, Second Edition, Volume I, CRC-Press Inc., Boca Raton, Florida 1981
- [40] **J. S. SIDWELL, G. A. RECHNITZ,** "Bananatrode" - An electrochemical biosensor for dopamine, *Biotechnology Letters*, Vol 7 No 6 1985, Seiten 419 - 422
- [41] **O. KOELLE,** Manometrie, B. Braun Apparatebau, Melsungen



Merckoquant® 10 023

Ascorbinsäure-Test

Teststäbchen zum Nachweis und zur halbquantitativen Bestimmung von Ascorbinsäure

ut.
engl.
franz.
span.

Allgemeines

Mit dem Ascorbinsäure-Test kann nicht nur die natürlich vorkommende Ascorbinsäure (Vitamin C) in Lebensmitteln, z.B. Obst- und Gemüsesäfte, Erfrischungsgetränke, wie auch in Bier und Wein rasch bestimmt werden, sondern es kann auch die zur Stabilisierung und als Antioxidanz in vielen Lebensmitteln, Wurstprodukten und Getränken zugesetzte Ascorbinsäure überprüft werden.

Auch der Vitamin C-Verlust bei Lagerung, Verarbeitung bzw. Zubereitung von Lebensmitteln ist feststellbar.

Mit dem Test läßt sich nicht nur in flüssigen Proben die Bestimmung durchführen, sondern es kann auch eine Direktbestimmung auf Oberflächen, z.B. auf frisch angeschnittenen Oberflächen von Obst, Gemüse oder Kartoffeln durchgeführt werden.

Bei der Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten in vielen Lebensmittelbetrieben kann er hier die Betriebskontrolle rationalisieren und u.U. eine aufwendige labormäßige Bestimmung der Ascorbinsäure unnötig machen oder wenigstens reduzieren.

Analytik

Die Farbreaktion beruht auf der Reduktion des gelb gefärbten Phosphormolybdatkomplexes durch Ascorbinsäure zu Molybdänblau.

Gebrauchsanweisung

1. Teststäbchen 1 Sekunde in die zu untersuchende Lösung so eintauchen, daß die Reaktionszone voll benetzt wird.
2. Teststäbchen herausnehmen, überschüssige Flüssigkeit abschütteln und nach 10 Sekunden Reaktionszone mit der Farbskala vergleichen.

Anmerkung

Da der Test auf einer Reduktionsreaktion beruht, können auch andere, mit Ascorbinsäure vergleichbare, Reduktionsmittel zu einer positiven Reaktion führen.

In stark gefärbten Flüssigkeiten, z.B. rotem Johannisbeersaft, wird die Anzeige durch Farbüberlagerung gestört. Bei Anwendung von Entfärbungsmitteln ist zu prüfen, ob dies Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure oxydiert. Dies ist vor allem bei der Verwendung von Aktivkohle zu erwarten. Günstige Ergebnisse können u. U. bei Anwendung von Cellulosepulvern Avicel® (Artikel 2330 und 2331) erzielt werden.

Eine Abschätzung des Ascorbinsäuregehaltes in gefärbten Lösungen kann auch bei Einsatz des Leerstäbchens Artikel 11860 erfolgen. Das Leerstäbchen enthält eine Papierzone ohne Reagenzzusatz. Beim Eintauchen in die gefärbte Lösung nimmt das Papier eine Färbung an, die an die Stelle des Null-Wertes der Farbskala tritt. Die bei Durchführung des Tests im Nachweisstäbchen dann auftretende Färbung wird mit der des Leerstäbchens verglichen. Bei negativem Ausfall sind beide Stäbchen gleich angefärbt. Bei positivem Nachweis erhält man eine Mischfarbe aus dem entsprechenden Farbton der Vergleichsskala und der Farbe des Leerstäbchens.

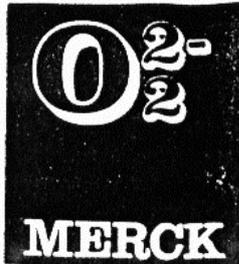
Lagerung

Die Packung sollte kühl (15-25 °C) und trocken gelagert werden. Dose sofort nach Entnahme der benötigten Teststäbchen wieder verschließen.

Weitere Schnellteste

Für die Untersuchung von Lebensmitteln und Wein stehen weitere Merckoquant®-Teststäbchen, z.B. für Weinsäure, Sulfit, Nitrit, Nitrat, Aluminium, Eisen, Kupfer, Zink und andere Tests zur Verfügung. Klein- und Mittelbetriebe können mit Aquamerck®/Aquaquant®-Reagenziensätzen auf einfache Weise schnell und zuverlässig das zur Reinigung, Kesselspeisung, Kühlung oder zu anderen Zwecken verwendete Wasser überprüfen.

Über das Gesamtprogramm informiert unser Prospekt Schnelltests zur Untersuchung von Wasser, Böden, Feststoffen, Lebensmitteln.



Merckoquant® 10011

Peroxid-Test

 dt.
 engl.
 frz.
 span.

Teststäbchen zum Nachweis und zur halbquantitativen Bestimmung von Peroxiden

Allgemeines

Mit dem Peroxid-Test lassen sich anorganische und organische Verbindungen nachweisen, die eine Peroxid- oder Hydroperoxid-Gruppe enthalten. Der Test ist daher zur Routinekontrolle einfacher Ether, wie Diethylether, Tetrahydrofuran und Dioxan, gut geeignet. Polymere Peroxide, die sich u. U. auch in einfachen Ethern bilden können, werden nicht oder nur mit verminderter Empfindlichkeit angezeigt. In diesen Fällen sollte jeweils mit einer Labormethode eine Kontrollbestimmung auf Eignung des Peroxid-Teststäbchens durchgeführt werden.

Neben der Überprüfung von Ethern kann der Test u. a. zur Überprüfung von H-Milch auf Restperoxide, zur Bestimmung von Perboraten in Waschmitteln, zur Kontrolle von peroxidhaltigen Beizbädern und Entkupferungsbädern in der Galvanik, zur Konzentrationsüberprüfung von Peroxiden, als Bleichmittel oder als Oxidationsmittel bei der Papier- und Textilherstellung und zur Peroxidbestimmung in Schwimmbadwasser erfolgreich eingesetzt werden.

Peroxid ist allein und in Kombination mit Peressigsäure ein universell einsetzbares Desinfektionsmittel, das optimal aufgrund seiner bakteriziden, fungiziden und viruziden Eigenschaften und ohne daß problematische Zersetzungsprodukte entstehen, auch im Lebensmittelbereich eingesetzt werden kann. Hier eignet sich der Test zur Überwachung der vorgeschriebenen Einsatzkonzentration sowie auch zur Restkonzentrationsbestimmung nach einer erfolgten Desinfektion, wenn die Anlage oder das Produkt desinfektionsmittelfrei gespült sein muß.

Bestimmungsmethode

Peroxidase (POD) überträgt Peroxidsauerstoff auf einen organischen Redoxindikator, der dadurch in ein blaugefärbtes Oxidationsprodukt überführt wird.

Die für die Reaktion erforderliche Feuchtigkeit wird im Falle der Überprüfung organischer Lösemittel einmal durch kurzes Eintauchen in destilliertes Wasser oder durch mehrfaches Anhauchen der Reaktionszone nach dem Eintauchen in das Lösemittel erzielt.

Wäßrige Lösung

Gebrauchsanweisung

1. Teststäbchen entnehmen und Dose sofort wieder verschließen.
2. Teststäbchen 1 Sekunde in die zu untersuchende Lösung eintauchen, daß die Reaktionszone voll benetzt wird.
3. Teststäbchen herausnehmen, überschüssige Flüssigkeit abschütteln und Reaktionszone nach 15 Sekunden mit der Farbskala vergleichen.

Organische Lösemittel (leicht flüchtige Ether)

1. Teststäbchen entnehmen und Dose sofort wieder verschließen.
2. Teststäbchen 1 Sekunde in das zu prüfende Lösemittel so eintauchen, daß die Reaktionszone voll benetzt wird.
3. Reaktionszone nach Verdunstung des Lösemittels (Teststäbchen 3–30 Sekunden lang leicht hin- und herbewegen).
 - a) 1 Sekunde in destilliertes Wasser eintauchen, überschüssiges Wasser abschütteln oder
 - b) viermal je 3–5 Sekunden anhauchen.
4. Anschließend Reaktionszone nach 15 Sekunden mit der Farbskala vergleichen.

Anmerkungen

Einsatz in schwer flüchtigen Ethern siehe Gebrauchsanweisung im Prospekt Merckoquant®.

Jede Blaufärbung innerhalb von 3 Min. kann noch als positiver Befund gedeutet werden.

Entsteht eine tiefdunkelblaue bis braune oder eine grüne bis braune Färbung, so ist die Peroxidkonzentration für die Zuordnung zur Farbskala zu hoch. Es ist dann mit Wasser bzw. mit peroxidfreiem Ether oder Petroleumbenzin (40–60 °C) zu verdünnen und nach der Gebrauchsanweisung zu prüfen.

Anorganische Peroxide werden in wäßriger Lösung bei pH 2–12 bestimmt. (Messung des pH-Wertes mit nichtblutenden Universalindikatorstäbchen pH 0–14.) Gegebenenfalls wird die Lösung mit Citronensäure oder Salzsäure 1 mol/l bzw. mit Natriumcitrat oder Natriumacetat entsprechend eingestellt.

Für weitergehende Informationen (z. B. Störungen durch andere Anionen und Kationen) fordern Sie bitte unseren Prospekt Merckoquant®-Tests an.

Lagerung

Nicht angebrochene Packungen des Merckoquant® Peroxid-Tests sollen im Kühlschrank gelagert werden. Angebrochene Packungen dagegen sind möglichst trocken und kühl, jedoch außerhalb des Kühlschranks aufzubewahren, da sonst bei häufigem Öffnen der abgekühlten Packung soviel Luftfeuchtigkeit in der Dose kondensiert, daß die Kapazität des im Stopfen enthaltenen Trockenmittels überbeansprucht wird.

Weitere Schnelltests

Für die Bestimmung weiterer Ionen und Verbindungen stehen zahlreiche kolorimetrische und titrimetrische Schnelltests sowie ionenspezifische Merckoquant®-Teststäbchen zur Verfügung.

Über das Gesamtprogramm informiert unser Prospekt „Schnelltests zur Untersuchung von Wasser, Böden, Feststoffen, Lebensmitteln“.

E. Merck, 64271 Darmstadt, Germany, Tel. (061 51) 720, Telex 4 19328 O em d

GIULINI PHARMA GMBH • HANNOVER

Dopamin Giulini® 200

Wirkstoff: 4-(2-Aminoethyl)brenzcatechinhydrochlorid (Dopaminhydrochlorid)

Infusionslösungskonzentrat**Zusammensetzung:**

10 ml Infusionslösungskonzentrat (= 1 Ampulle) enthalten: 200 mg 4-(2-Aminoethyl)brenzcatechinhydrochlorid (Dopaminhydrochlorid) und max. 6,9 mg Natriumdisulfid (entspricht: max. 4,65 mg SO₂) als Stabilisator; außerdem als Hilfsstoffe: Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Wasser für Injektionszwecke.

Anwendungsgebiete:

Schockzustände, z. B. bei Herzversagen, auch infarktbedingt (kardiogener Schock); nach Operationen (postoperativer Schock); bei großen Flüssigkeitsverlusten (hypovolämischer Schock) erst nach Volumenauffüllung; bei schweren Infektionen (septischer Schock); bei Überempfindlichkeitsreaktionen (anaphylaktischer Schock). Starker Blutdruckabfall (schwere Hypotensionen); drohender Schock (Prächock); drohendes Nierenversagen.

Gegenanzeigen:

Schilddrüsenüberfunktion (Thyreotoxikose), Tumor des Nebennierenmarks (Phäochromozytom). Bestimmte Formen des grünen Stars (Engwinkelglaukom). Vergrößerung der Vorsteherdrüse (Prostataadenom) mit Restharrbildung. Tachyarrhythmien, Kammerflimmern.

Anwendung in der Schwangerschaft nur, wenn der Nutzen für die Mutter das potentielle Risiko für den Feten überwiegt.

Warnhinweis:

Dopamin Giulini 200 darf nicht bei Bronchialasthmatikern mit Sulfit-Überempfindlichkeit angewendet werden.

Nebenwirkungen:

Gelegentlich leichte Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Unruhe, Fingertremor, pektanginöse Beschwerden, Herzklappen, Blutdruckanstieg. Mit steigender Dosis nimmt das Risiko der Auslösung von Herzrhythmusstörungen (Sinustachykardie, supraventrikuläre und ventrikuläre Ektopien) und eines unerwünschten Anstiegs des linksventrikulären enddiastolischen Füllungsdruckes zu.

Seite 1

Soweit nicht anders verordnet, gelten folgende Richtdosen:

- Niedrigdosisbereich (z. B. internistische Intensivmedizin und nephrologische Indikation):
100-250 µg/min = 1,5-3,5 µg/kg/min
- Mittlerer Dosisbereich (z. B. chirurgische Intensivmedizin):
300-700 µg/min = 4-10 µg/kg/min
- Hochdosisbereich (z. B. septischer Schock):
750-1500 µg/min = 10,5-21,5 µg/kg/min

Dopamin Giulini 200 ist für sämtliche Dosisbereiche geeignet. Außerdem stehen für den Niedrigdosisbereich Dopamin Giulini 50, für den niedrigen und mittleren Dosisbereich Dopamin Giulini 250 und für den Hochdosisbereich Dopamin Giulini 500 zur Verfügung.

Stehen Zunahme der Inotropie und der Diurese im Vordergrund des Behandlungszieles, dann empfehlen sich Dosen von 100-250 µg/min.

Das Maximum der Diuresesteigerung liegt bei ca. 250 µg/min und bleibt über einen weiten Dosisbereich (bis ca. 1200 µg/min) weitgehend konstant erhalten. Bei weiterer Dosissteigerung muß mit einem Rückgang der Diurese gerechnet werden.

Muß eine Einflußnahme auf den arteriellen Druck erfolgen, so ist eine Dosissteigerung auf ca. 500 µg/min oder mehr angezeigt, oder es muß bei gleicher Dopamin-Dosierung eine zusätzliche Verabreichung von Noradrenalin in einer Dosis von 5 µg/min bei einem Körpergewicht von ca. 70 kg erfolgen.

Unabhängig von den applizierten Dosen ist beim Auftreten einer ausgeprägten Frequenzsteigerung oder dem gehäuftem Auftreten von Rhythmusstörungen eine weitere Dosissteigerung kontraindiziert.

Dosierung bei Kindern:

4-6 µg/kg/min

Im Gegensatz zu der Erwachsenen-anwendung sollte man bei Kindern einschleichend dosieren, also mit niedriger Dosis beginnen.

Dauer der Anwendung:

Die Infusionsdauer richtet sich nach den individuellen Gegebenheiten; es liegen positive Erfahrungen mit einer Infusionsbehandlung von 28 Tagen Dauer vor.

Art der Anwendung:

Dopamin Giulini 200 ist nur für die i.v. Infusion geeignet und ist nur verdünnt durch Verbringen in geeignete Infusionslösungen anzuwenden. Nach Stabilisierung der klinischen Situation sollte die Infusion nicht abrupt abgebrochen, sondern ausschleichend beendet werden.

Dopamin ist alkaliempfindlich und sollte daher nicht in Infusionslösungen mit einem pH über 8 für längere Zeit (über 4 Stunden) verbracht werden.

Seite 3

Eine Dopamin-Infusion kann zu Hautnekrosen führen (Umverteilung des Blutflusses zugunsten des Splanchnikusbereiches und zu Lasten von Haut und Muskulatur). Die Gefahr besteht besonders bei Patienten mit akralen Durchblutungsstörungen und bei Verabreichung hoher Dosen.

Nach Operationen im Splanchnikusbereich oder bei Patienten mit Blutungsneigung im Gastrointestinaltrakt besteht Blutungsgefahr wegen Umverteilung des Blutflusses.

Eine versehentliche paravenöse Infusion kann zu paravenösen Nekrosen führen. Die Infusion sollte deshalb möglichst über einen Venenkatheter erfolgen. Notfalls empfiehlt sich als Gegenmaßnahme die sofortige lokale Infiltration von Phentolamin (5-10 mg, gelöst in 10 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung) in das Extravasat.

Besonderer Hinweis:

Aufgrund des Gehältes an Natriumdisulfid kann es im Einzelfall, insbesondere bei Bronchialasthmatikern, zu Überempfindlichkeitsreaktionen kommen, die sich als Erbrechen, Durchfall, keuchende Atmung, akuter Asthmaanfall, Bewußtseinsstörungen oder Schock äußern können.

Wechselwirkungen mit anderen Mitteln:

Bei gleichzeitiger Verabreichung von Dopamin und Guanethidin wird die sympathomimetische Wirkung verstärkt. Patienten, die mit Monoaminoxidaseinhibitoren (MAO-Hemmer) behandelt werden, benötigen eine wesentlich geringere Dosis Dopamin (ca. 1/10 der Normaldosis).

Gleichzeitige Verabreichung von Dopamin und Diuretika kann additive und potenzierende Effekte haben. Weitere Wechselwirkungen sind bekannt zwischen Dopamin und trizyklischen Antidepressiva, Anästhetika (verstärkte Neigung zu Rhythmusstörungen) oder Phenytoin (Blutdruckabfall und Bradykardie). Die Kombination von Dopamin und Mutterkornalkaloiden kann zu maximaler peripherer Gefäßverengung mit Gangrängefahr führen.

Besonderer Hinweis:

Natriumdisulfid ist eine sehr reaktionsfähige Verbindung. Es muß deshalb damit gerechnet werden, daß mit dem Präparat zusammen verabreichtes Thiamin (Vitamin B₁) abgebaut wird.

Dosierungsanleitung:

Die Dosis ist individuell anzupassen und richtet sich nach dem Schweregrad des Schocks sowie dem Ansprechen auf die Therapie. Trotz Anwendung von Dopamin dürfen die zusätzlich erforderlichen Maßnahmen, wie ausreichende Volumensubstitution des Kreislaufs und exakte Überwachung der Elektrolytverhältnisse usw. nicht außer acht gelassen werden. Bei somnolenten Patienten ist wegen evtl. Aspirationsgefahr auf Freihaltung der Atemwege zu achten. Eine Volumensubstitution sollte möglichst vor Behandlungsbeginn erfolgen.

Seite 2

Die Infusionslösung sollte jeweils vor Gebrauch frisch angesetzt werden. Nur klare, nach Zugabe von Dopamin Giulini 200 unverfärbte Infusionslösung verwenden.

Anwendungsfertige Infusionslösungen mit Dopamin Giulini 200 sind während üblicher Infusionsdauer stabil (mindestens 24 Stunden).

Das Arzneimittel soll nach Ablauf des Verfalldatums nicht mehr angewendet werden.

Arzneimittel, unzugänglich für Kinder aufbewahren!**Hinweis:**

Bei erhöhtem Preload oder Afterload empfiehlt sich zur Herzentlastung die Kombination mit Nitroglycerin oder Natriumnitroprussid.

Eigenschaften:

Dopamin wirkt positiv inotrop, fördert die Koronar-, Mesenterial- und Nierendurchblutung mit Steigerung der Diurese bei vermehrter Natrium- und Kaliumausscheidung.

Empfohlene Infusionslösungen:

0,9 %ige Natriumchlorid-Lösung
5,0 %ige Glucose – Lösung
5,0 %ige Glucose – in 0,9 %iger Natriumchlorid-Lösung
5,0 %ige Glucose – in Ringer-Lactat-Lösung
5,0 %ige Glucose – in 0,45 %iger Natriumchlorid-Lösung
1/6 molare Natriumlactat-Lösung
Ringer-Lactat-Lösung

Hinweis: Dopamin Giulini 200 wird jetzt in OPC-Ampullen geliefert. Bitte zum Öffnen die punktförmige Farbmakierung auf der Ampullenzweifel nach oben halten und wie gewohnt den Spieß abbrennen.

Packungsgrößen:

Ampullen zu 10 ml (200 mg): 10, 50, 100 Ampullen

Außerdem:

Dopamin Giulini 50: 30, 300 Ampullen zu 5 ml (50 mg)
Dopamin Giulini 250: 10, 50 Ampullen zu 50 ml (250 mg)
Dopamin Giulini 500: 10, 50 Ampullen zu 50 ml (500 mg)

Seite 4

Product No. T-7755

TYROSINASE

(Monophenol monooxygenase; Polyphenol Oxidase: Catechol Oxidase;
Monophenol, dihydroxyphenylalanine: oxygen oxidoreductase; EC 1.14.18.1)

from Mushroom

Lot 24H9542

Enzyme ActivitiesTyrosinase Activity: 4,400 Units/mg solid

Unit Definition: One unit will cause an increase in A_{280nm} of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25°C in a 3 ml reaction mixture containing L-tyrosine.

Polyphenol Oxidase Activity: 84,000 Units/mg solid

Unit Definition: One unit will cause a decrease in A_{265nm} of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25°C in a 3 ml reaction mixture containing L-β-3,4-dihydroxyphenyl alanine (L-DOPA).

Catechol Oxidase Activity: 400,000 Units/mg solid

Unit Definition: One unit will cause a decrease in A_{265nm} of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25°C in 3 ml reaction mixture containing catechol and ascorbic acid.

Specific details as assay procedures are available upon request.

SIGMA warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Satisfaction is always guaranteed when you use SIGMA Reagents.

In the USA/Canada call:
1-800-325-3010 for orders
and **1-800-325-8070**
for customer service.

Outside the USA/Canada call
collect: **314-771-5750** for orders
and **314-771-5765**
for customer service.

SIGMA[®]**CHEMICAL COMPANY**

P.O. BOX 14508, ST. LOUIS, MO 63178 USA

Hiermit versichere ich, die Arbeit ohne fremde Hilfe
angefertigt und alle verwendeten Hilfsmittel angegeben zu
haben. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich
entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Hannover, 28. Juli. 1995

Marco Nicolai