



**Ganzheitliche Untersuchungsmethoden
zur Erfassung und Prüfung der Qualität
ökologischer Lebensmittel:
Stand der Entwicklung und Validierung**

148

Herausgeberin:

Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau
in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)
53168 Bonn

Tel.: +49 228 6845-280 (Zentrale)

Fax: +49 228 6845-787

E-Mail: geschaeftsstelle-oekolandbau@ble.de

Internet: www.bundesprogramm-oekolandbau.de

Finanziert vom Bundesministerium für
Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau

Auftragnehmer:

Fachgebiet Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur
der Universität Kassel, KWALIS Qualitätsforschung Fulda GmbH,
EQC Elektrochemisches Qualitätsconsulting GmbH,
Institut für ökologischen Landbau der FAL,

Dieses Dokument ist über <http://forschung.oekolandbau.de> verfügbar.



Fachgebiet Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur

U N I K A S S E L
V E R S I T Ä T



in Kooperation mit



Bundesprogramm Ökologischer Landbau

Abschlussbericht

Projektnummer: 02OE170

Projekttitle: „Ganzheitliche Untersuchungsmethoden zur Erfassung und Prüfung der Qualität ökologischer Lebensmittel: Stand der Entwicklung und Validierung“*

Berichtszeitraum: 01.06.2002 - 31.12.2003

Gesamtkoordination: Universität Kassel, Fachgebiet Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur (<http://www.wiz.uni-kassel.de/nue>),
Dr. J. Kahl, Dr. N. Busscher, Prof. Dr. A. Meier-Ploeger

Teilprojekte: Validierung Kupferchlorid-Kristallisation
Universität Kassel, Fachgebiet Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur
Dr. N. Busscher, Dr. J. Kahl, G. Mergardt

Validierung Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie
KWALIS Qualitätsforschung Fulda GmbH
Fuldaer Str. 21, 36160 Dipperz
Dr. J. Strube, G. Mende, C. Negendank

Validierung Physiologischer Aminosäurestatus
KWALIS Qualitätsforschung Fulda GmbH
Fuldaer Str. 21, 36160 Dipperz
Dr. P. Stolz, B. Böhm, B. Köhl-Gies

Validierung Elektrochemische Messungen
EQC Elektrochemisches Qualitätsconsulting GmbH
Triesdorfer Str. 31A, 91746 Weidenbach
Dipl. Phys. B. Staller, Dipl. Biol. M. Merschel

HPLC-Messungen sekundäre Pflanzenstoffe
Universität Kassel, Fachgebiet Ökologische
Lebensmittelqualität und Ernährungskultur
A. Werries, Dr. J. Kahl

Probencodierung und -versand
Institut für ökologischen Landbau (FAL-OEL)
Trenthorst 32, 23847 Westerau
Dir. und Prof. PD. Dr. habil. G. Rahmann, K. Weirauch

weitere Kooperationen: TU München, Institut für Pflanzenwissenschaften und
Obstbau, Prof. Dr. Dieter Treutter (www.wzw.tum.de)

Papyrus GmbH, Andreas Degert
(www.papyrus-gmbh.de)

Dr. Stavros Kromidas, Rosenstr. 16, 66125 Saarbrücken

* Das Projekt wurde von den Projektpartnern Universität Kassel, FG Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur, der KWALIS Qualitätsforschung Fulda GmbH, der EQC Qualitätsconsulting GmbH und dem Institut für ökologischen Landbau der FAL kooperativ durchgeführt. Die wissenschaftliche Leitung der Projektteile lag beim jeweiligen Projektpartner. Die Kapitel wurden von den in der Überschrift genannten Autoren verfasst. Die Redaktion lag bei der Koordinationsstelle Kassel.

Inhaltsverzeichnis

1	Ziele und Aufgabenstellung (Dr. J. Kahl, Dr. N. Busscher, Prof. Dr. A. Meier-Ploeger)	1
1.1	Ausgangslage	1
1.2	Zielsetzung	1
1.3	Validierungsfragen	1
1.4	Aufgabenstellung	2
1.5	Zielgruppen	2
2	Planung (Dr. J. Kahl, Dr. N. Busscher, Prof. Dr. A. Meier-Ploeger)	3
2.1	Ergebnis	3
2.2	Validierung	3
2.3	Projektkoordination	4
2.4	Projekttablauf	5
2.5	Arbeitstreffen	5
2.6	Workshop	6
2.7	Abschlusskonferenz	7
2.8	Berichte	7
3	Probenmaterialien (PD Dr. G. Rahmann, K. Weirauch)	8
3.1	Einleitung	8
3.2	Weizen	8
3.3	Möhren	12
3.3.1	Möhren für die Untersuchung über die Sorten (FIBL-Möhren)	12
3.3.2	Möhren für die Untersuchung über die Anbauverfahren (Uni-Kassel)	14
4	Validierung der Methoden und Ergebnisse der Vergleichsmessungen	15
4.1	Kupferchlorid-Kristallisation (Dr. J. Kahl, Dr. N. Busscher)	15
4.1.1	Beschreibung des Verfahrens	15
4.1.1.1	Darstellung des Gesamtprozesses	15
4.1.1.2	Definitionen	15
4.1.1.3	Probenvorbereitung	17

4.1.1.4	Kristallisation und Scannen	17
4.1.1.5	Texturanalyse	18
4.1.1.6	Lineare Diskriminanzanalyse	19
4.1.2	Stand der Methoden zu Projektbeginn	21
4.1.3	Vorbereitung	22
4.1.3.1	Anpassung der computergestützten Auswertungsmethode an die Fragestellung	22
4.1.3.1.1	Anpassung der vorhandenen Software <i>LabDoc</i> und <i>acia</i>	22
4.1.3.1.2	Varianzanalyse	22
4.1.3.1.3	Diskriminanzanalyse	22
4.1.3.2	Vorversuche	23
4.1.3.2.1	Mischungsverhältnis Weizen	23
4.1.3.2.2	Mischungsverhältnis Möhren	25
4.1.4	Validierung	30
4.1.4.1	Systematische Beurteilung der Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen können	30
4.1.4.1.1	Eigenschaften der Kristallisationskammer und des Scanner	30
4.1.4.1.2	Methodenpräzision und Robustheit für Weizen	40
4.1.4.1.3	Methodenpräzision und Robustheit für Möhre	47
4.1.4.1.4	Dokumentation	52
4.1.5	Ergebnisse der Vergleichsversuche	53
4.1.5.1	Weizen DOK-Versuche FIBL	53
4.1.5.1.1	Probenmaterial	53
4.1.5.1.2	Ergebnisse Probenserie A-E (Feb. 2003)	53
4.1.5.1.3	Ergebnisse Probenserie A-E (Sept. 2003)	54
4.1.5.2	Möhren Düngungs-Versuch (Universität Kassel)	55
4.1.5.2.1	Probenmaterial	55
4.1.5.2.2	Ergebnisse Probenserie M11 / M44 (Feb. 2003)	55
4.1.5.2.3	Ergebnisse Probenserie M77/M88 (Sept. 2003)	56

4.1.5.3	Möhren vom FIBL	56
4.1.5.3.1	Probenmaterial	56
4.1.5.3.2	Ergebnisse Probenserie HIKL Möhrensorten (Feb. 2003)	57
4.1.6	Zusammenfassende Abschätzung der Eignung der Methode für die Fragestellung	58
4.1.7	Aussage über den möglichen Einsatz der Methode für andere Fragestellungen	59
4.2	Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie (Dr. J. Strube)	61
4.2.1	Beschreibung des Verfahrens	61
4.2.1.1	Übersicht	61
4.2.1.2	Ursachen der Lumineszenz	62
4.2.1.3	Aspekte der Ganzheitlichkeit	63
4.2.2	Messmethoden	64
4.2.2.1	Messanordnung	64
4.2.2.1.1	Meßprinzip	64
4.2.2.1.2	Meß-Zyklus	65
4.2.2.1.3	Bewertungsgrößen der Emission	67
4.2.2.1.4	Spektrenbeispiel	68
4.2.2.1.5	Abhängigkeit der Messwerte von der Probenoberfläche	68
4.2.2.1.6	Probenmittelwerte und die Messung von Einzelexemplaren	69
4.2.2.1.7	Probenvergleiche	70
4.2.2.1.8	Gerätebeschreibung	72
4.2.2.2	Bewertungsverfahren	74
4.2.3	Stand der Methoden zu Projektbeginn	78
4.2.4	Vorversuche und Begleituntersuchungen	81
4.2.4.1	Weizen	81
4.2.4.1.1	Untersuchung des Einflusses des Wassergehalts der Proben	81
4.2.4.2	Möhren	86
4.2.5	Verfahrensbeschreibung	88

4.2.5.1	Verfahrensbeschreibung Weizen	88
4.2.5.1.1	Grundsätzliches zur Meß-Methode bei Weizen .	88
4.2.5.1.2	Standardisiertes Probenvolumen	89
4.2.5.1.3	Bezeichnungen	89
4.2.5.1.4	Methodenbeschreibung Weizen	91
4.2.5.2	Verfahrensbeschreibung Möhren	93
4.2.5.2.1	Methodenbeschreibung Möhren	93
4.2.6	Dokumentation und Rückverfolgbarkeit	95
4.2.7	Validierung	96
4.2.7.1	Validierungsfragen	96
4.2.7.2	Validierungsweg	96
4.2.7.3	Präzision und Wiederholbarkeit des instrumentellen Meßvorgangs	98
4.2.7.3.1	Eigenschaften des Gerätes	98
4.2.7.3.2	Systematische Beurteilung der Faktoren, die den instrumentellen Meßvorgang beeinflussen können	98
4.2.7.3.3	Meßpräzision des instrumentellen Meßvorgangs	104
4.2.7.3.4	Wiederholpräzision des instrumentellen Meßvorgangs	111
4.2.7.4	Präzision und Wiederholbarkeit des matrixabhängigen Meßvorgangs für die Probenart Weizen	111
4.2.7.4.1	Systematische Beurteilung der Faktoren, die den matrixabhängigen Meßvorgang bei Weizen beeinflussen können	111
4.2.7.4.2	Meßpräzision - bei einer Küvettenfüllung	112
4.2.7.4.3	Meßpräzision - mehrere Küvettenfüllungen am gleichen Meßtag	117
4.2.7.4.4	Meßpräzision - mehrere unabhängige Küvettenfüllungen am gleichen Meßtag	119
4.2.7.4.5	Wiederhol-Präzision - mehrere Küvettenfüllungen an verschiedenen Meßtagen	119

4.2.7.4.6	Kompensation von Veränderungen des Probenmaterials Weizen im Meßzeitraum	122
4.2.7.4.7	Verfahrenspräzision	124
4.2.7.4.8	Wiederholbarkeit der Probentrennung bei Variation der Bedingungen	125
4.2.7.5	Präzision und Wiederholbarkeit des matrixabhängigen Meßvorgangs für die Probenart Möhren	130
4.2.7.5.1	Zu erwartende Einflußgrößen auf die Methodenpräzision bei Möhren	130
4.2.7.5.2	Meßpräzision bei einer Möhre (gleicher Oberflächenabschnitt)	131
4.2.7.5.3	Meßpräzision bei einer Möhre (mehrere Oberflächenabschnitte)	131
4.2.7.5.4	Wiederholpräzision Möhren	132
4.2.7.6	Zusammenfassende Übersicht Kenn- und Einflußgrößenbestimmung	134
4.2.7.6.1	Gerätetechnische Einfluß- und Kenngrößen . . .	134
4.2.7.6.2	Probenbedingte Einflußgrößen	135
4.2.7.6.3	Verfahrens - Kenngrößen	136
4.2.8	Ergebnisse der Vergleichsversuche	137
4.2.8.1	Weizen aus dem DOK-Versuch des FIBL	137
4.2.8.1.1	Probenmaterial	137
4.2.8.1.2	Auswerteverfahren	137
4.2.8.1.3	Ergebnisse der 1. Probenserie Code I-V (Okt 2002)	138
4.2.8.1.4	Ergebnisse Probenserie A-E (Feb. 2003)	144
4.2.8.1.5	Ergebnisse Probenserie A-E (Sept. 2003)	147
4.2.8.2	Möhren aus Düngungsversuch Uni Kassel	151
4.2.9	Zusammenfassende Abschätzung der Eignung der Methode für die vorliegende Fragestellung	156
4.2.10	Aussage über den möglichen Einsatz der Methode für andere Fragestellungen	157

4.3	Physiologischer Aminosäurestatus (Dr. P. Stolz)	158
4.3.1	Beschreibung des Verfahrens	158
4.3.1.1	Prozessualer Ansatz als Ergänzung zu stoffbezogenen Ansätzen	158
4.3.1.2	Physiologischer Aminosäurenstatus als Verfahrensbezeichnung	159
4.3.1.3	Grundzüge der Physiologie des Stickstoff-Stoffwechsels der Pflanze	159
4.3.1.4	Ganzheitliche Aspekte	160
4.3.1.5	Gesamtverfahren und Methodenkombination	161
4.3.1.6	Beschreibung der Einzelprüfmethoden	162
4.3.1.6.1	Gesamtproteinbestimmung in Weizen und Möhren	162
4.3.1.6.2	Nitratbestimmung in Möhren	162
4.3.1.6.3	Bestimmung freier Aminosäuren in Möhren	163
4.3.1.6.4	Bestimmung proteinogener Aminosäuren in Weizen nach Hydrolyse	163
4.3.2	Stand der Methoden zu Projektbeginn	164
4.3.3	Vorversuche	166
4.3.4	Validierung	167
4.3.4.1	Validierung des Gesamtverfahrens	167
4.3.4.2	Matrixspezifische Einzelprüfmethoden	168
4.3.4.3	Verifizierung der Einzelprüfmethoden	168
4.3.4.3.1	Probenvorbereitung	168
4.3.4.4	Präzision (Betrachtung zufälliger Fehler)	169
4.3.4.5	Richtigkeit (Betrachtung systematischer Fehler)	170
4.3.4.5.1	Präzision und Richtigkeit der Bestimmung des Rohprotein-N	171
4.3.4.5.2	Präzision und Richtigkeit der Bestimmung von Nitrat in Möhren	173
4.3.4.5.3	Präzision und Richtigkeit der Bestimmung extrahierbarer Aminosäuren	175
4.3.4.5.4	Präzision und Richtigkeit der	

	Aminosäurenbestimmung nach Hydrolyse	178
4.3.4.6	Fließschema Validierung des Gesamtverfahrens am Beispiel Weizen	182
4.3.4.7	Übersicht zur Validierung des Gesamtverfahrens	183
4.3.4.7.1	Differenzierung der Weizenproben	183
4.3.4.7.2	Differenzierung der Möhrenproben Uni Kassel	185
4.3.4.7.3	Differenzierung der Möhrenproben FIBL	187
4.3.5	Ergebnisse der Vergleichsversuche	190
4.3.5.1	Weizen DOK-Versuch	190
4.3.5.1.1	Probenmaterial	190
4.3.5.1.2	Gesamtprotein	190
4.3.5.1.3	Glutamin/-säure und Prolin	191
4.3.5.2	Möhren Universität Kassel	193
4.3.5.2.1	Probenmaterial	193
4.3.5.2.2	Gesamtprotein	193
4.3.5.2.3	Nitrat	194
4.3.5.2.4	Summe freier Aminosäuren/Amidierungsgrad Asparaginsäure	195
4.3.5.3	Möhren FIBL	197
4.3.5.3.1	Probenmaterial	197
4.3.5.3.2	Gesamtprotein	197
4.3.5.3.3	Nitrat	198
4.3.5.3.4	Summe freier Aminosäuren/Amidierungsgrad Asparaginsäure	199
4.3.6	Zusammenfassende Abschätzung	201
4.3.7	Aussage über den möglichen Einsatz der Methode für andere Fragestellungen	202
4.4	Elektrochemische Messungen (Dipl. Phys. B. Staller)	203
4.4.1	Beschreibung des Verfahrens	203
4.4.1.1	Messprinzip	203
4.4.1.2	Interpretation der Messparameter	204
4.4.1.2.1	pH	204

	4.4.1.2.2	Leitfähigkeit	204
	4.4.1.2.3	Redoxpotenzial	205
4.4.2		Stand der Methoden zu Projektbeginn	205
4.4.3		Vorversuche	208
	4.4.3.1	Weizen	208
	4.4.3.2	Karotten	210
	4.4.3.3	Redoxpuffer	212
	4.4.3.4	Wein	213
4.4.4		Validierung	214
	4.4.4.1	Charakterisierung der Methode	214
	4.4.4.1.1	Systematische Beurteilung der Faktoren	214
	4.4.4.1.1.1	Mischungsverhältnis	215
	4.4.4.1.1.2	Rührgeschwindigkeit	215
	4.4.4.1.1.3	Entsafter	215
	4.4.4.1.1.4	Kalibrierung	216
	4.4.4.1.2	Schätzung der Ergebnisunsicherheit	217
	4.4.4.1.3	Kalibrierung	217
	4.4.4.1.3.1	pH-Elektrode	217
	4.4.4.1.3.2	Redoxelektrode	217
	4.4.4.1.3.3	Leitfähigkeitssensor	217
	4.4.4.2	Dokumentation	218
	4.4.4.2.1	Allgemeine Dokumentation	218
	4.4.4.2.2	Standard Arbeitsanweisungen	218
	4.4.4.3	Verfahrensmerkmale	220
	4.4.4.3.1	Richtigkeit Redoxpuffer	220
	4.4.4.3.2	Wiederholpräzision	220
	4.4.4.3.3	Laborpräzision	221
	4.4.4.3.4	Vergleichspräzision	224
	4.4.4.3.5	Stabilität der eingesetzten Lösungen	225
	4.4.4.3.6	Konzentrationsbereiche	226
4.4.5		Ergebnisse der Vergleichsversuche	228
	4.4.5.1	Weizen DOK Herbst 2002	228
	4.4.5.2	Weizen DOK Frühjahr 2003	229

4.4.5.3	Weizen DOK Herbst 2003	231
4.4.5.4	Möhren Uni Kassel M22 / M55	232
4.4.5.5	Möhren Uni Kassel M11 / M44	233
4.4.5.6	Möhren Uni Kassel	234
4.4.5.7	Möhren FIBL E, F, G	235
4.4.5.8	Möhren FIBL H bis L	236
4.4.5.9	Möhren FIBL A - D	237
4.4.6	Abschätzung der Eignung der Methode für die Fragestellung	238
4.4.7	Aussage über den möglichen Einsatz der Methode für andere Fragestellungen	238
4.5	HPLC-Messungen - Test Methode Polyphenole (A. Werries)	240
4.5.1	Beschreibung der Methode	240
4.5.2	Stand der Methoden zu Projektbeginn	242
4.5.3	Vorbereitung	243
4.5.3.1	Möhren (2002, WZW)	243
4.5.3.1.1	Probenmaterial	243
4.5.3.1.2	Methoden	244
4.5.3.2	Möhren (2003, Universität Kassel)	245
4.5.3.2.1	Probenmaterial	245
4.5.3.2.2	Methoden	246
4.5.3.3	Weizen (2002, WZW)	248
4.5.3.3.1	Probenmaterial	248
4.5.3.3.2	Methoden	248
4.5.3.4	Weizen (2003, Universität Kassel)	249
4.5.3.4.1	Probenmaterial	249
4.5.3.4.2	Methoden	250
4.5.3.5	HPLC Bedingungen (2002, WZW)	250
4.5.3.6	HPLC Bedingungen (2003, Universität Kassel)	252
4.5.6	Zusammenfassende Abschätzung zur Eignung der Methode	267
5	Vergleich der Methodenergebnisse an definiertem Probenmaterial (Dr. J. Kahl, Dr. N. Busscher, Prof. Dr. A. Meier-Ploeger)	269
5.1	Validierung jeder einzelnen Methode	269

5.2	Ergebnisse der Vergleichsmessungen	271
6	Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse für den ökologischen Landbau (Dr. J. Kahl, Dr. N. Busscher, Prof. Dr. A. Meier-Ploeger)	276
7	Literatur	
7.1	Kupferchlorid-Kristallisation	278
7.2	Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie	282
7.3	Physiologischer Aminosäurestatus	286
7.4	Elektrochemische Messungen	289
7.5	HPLC-Methode	291
8	Anhang	292
8.1	Anhang 1: Netzplan	292
8.2	Anhang 2: Messapparatur elektrochemische Methoden	294

Tabellen

Tabelle 1:	Probenmaterial für Winterweizen aus dem DOK-Versuch für das Erntejahr 2002 und 2003 (kg)	10
Tabelle 2:	Probencodierung für die Weizenproben der Ernte 2002 und Lieferung an die Forschungspartner im Oktober 2002 und Februar 2003	11
Tabelle 3:	Probencodierung für die Weizenproben der Ernte 2003 und Lieferung an die Forschungspartner im September 2003	12
Tabelle 4:	Möhren für Untersuchungen zum Zuchtstatus vom FIBL 2002 und ihre Codierung	13
Tabelle 5:	Codierung der Möhren aus dem FIBL-Anbau des Anbaujahres 2003	13
Tabelle 6:	Codierung der Möhren für Untersuchungen über die Anbauverfahren aus dem Versuch Uni Kassel 2002, Frankenhausen	14
Tabelle 7:	Codierung der Möhren für Untersuchungen über die Anbauverfahren aus dem Versuch Uni Kassel 2003, Frankenhausen (Verteilt am 29.09.03)	14
Tabelle 8:	Messfolgetabelle für mehrere Messreihen (Teilmengen) der gleichen Probe(Weizen)	92
Tabelle 9:	Messfolgetabelle für mehrere Messreihen (Teilmengen) der gleichen Probe(Möhre)	94
Tabelle 10:	Wiederholpräzision bei Glasprüfkörper an 6 Messtagen	111
Tabelle 11:	Messpräzision des Messwertes Mw1 bei Weizen (gleiche Küvettenfüllung) ..	113
Tabelle 12:	Messpräzision des Messwertes R40w bei Weizen (gleiche Küvettenfüllung) .	114
Tabelle 13:	Messpräzision des Messwertes R40gelb/blau bei Weizen (gleiche Küvettenfüllung)	115
Tabelle 14:	Messpräzision des Messwertes Chi/H50w bei Weizen (gleiche Küvettenfüllung)	116
Tabelle 15:	Messpräzision bei Weizen bei mehreren Küvettenfüllungen am gleichen Messtag	117
Tabelle 16:	Zeitliche Folge der Variationskoeffizienten bei Weizen bei mehreren Küvettenfüllungen am gleichen Messtag	117
Tabelle 17:	Messpräzision bei Weizen bei Küvettenfüllungen aus verschiedenen Teilproben am gleichen Messtag	119

Tabelle 18:	Messpräzision bei Weizen bei Küvettenfüllungen aus verschiedenen Teilproben ermittelt an verschiedenen Messtagen	119
Tabelle 19:	Messpräzision bei Weizen ermittelt an 6 Teilproben je Messreihe (7 Messreihen an 5 Tagen)	120
Tabelle 20:	Verfahrenspräzision bei Weizen für die Meßgrößen Mw1w, R40w, R40gelb/blau u. ChiE/H50w, angegeben als mittlerer Variationskoeffizient, berechnet aus 10 Bestimmungen des Variationskoeffizienten.	124
Tabelle 21:	Übersicht über die Bedingungen beim Vergleich mehrerer Trocknungsverfahren	125
Tabelle 22:	Messpräzision bei einer Möhre (gleicher Oberflächenabschnitt)	131
Tabelle 23:	Messpräzision bei einer Möhre (mehrere Oberflächenabschnitte)	131
Tabelle 24:	Messpräzision bei einer Möhre (mehrere Oberflächenabschnitte, Möhre gedreht)	131
Tabelle 25:	Wiederholpräzision bei Möhren.	133
Tabelle 26:	Übersicht über Untersuchungszeitpunkte und Kennzeichnung der Weizenproben aus dem DOK-Versuch des FIBL	137
Tabelle 27:	Anzahl der Messwiederholungen der Weizenprobe bei der ersten Probenserie	138
Tabelle 28:	Zusammenfassung signifikanter Trennung ($p < 0,05$) bei den DOK-Weizenproben (Oktober 2002).	146
Tabelle 29:	Zusammenfassung signifikanter Trennungen ($p < 0,05$) bei den DOK-Weizenproben (Sept. 2003). Gleiche Buchstaben markieren nicht unterschiedene Proben.	150
Tabelle 30:	Daten zur Präzision der für die Untersuchung angewandten Verfahren	170
Tabelle 31:	Daten zur Wiederfindung der für die Untersuchung angewandten Verfahren	171
Tabelle 32:	Daten zur Präzision und Richtigkeit der Bestimmung freier Aminosäuren ($n=4$)	176
Tabelle 33:	Daten zur Präzision und Richtigkeit der Aminosäurebestimmung nach Hydrolyse ($n=6$)	179
Tabelle 34:	Daten zur Eignung des Gesamtverfahrens zur Differenzierung und Identifizierung von Proben verschiedener Kulturverfahren	183
Tabelle 35:	Vergleich Soll/Istwert von Redoxpuffern verschiedener Hersteller	212
Tabelle 36:	Redoxpotenzial von verschiedenen Weinen	213
Tabelle 37:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen auf die elektrochemischen Parameter	

	215
Tabelle 38:	Überprüfung der Richtigkeit des Standardpuffers	220
Tabelle 39:	Elektrochemische Wiederholpräzisionsmessungen für verschiedene Medien ..	221
Tabelle 40:	Elektrochemische Laborpräzisionsmessungen an Wein	222
Tabelle 41:	Elektrochemische Laborpräzisionsmessungen an Karotten	223
Tabelle 42:	Elektrochemische Laborpräzisionsmessungen an Weizen	224
Tabelle 43:	Elektrochemische Vergleichspräzisionsmessungen TUM und EQC an Redoxpuffern	225
Tabelle 44:	Elektrochemische Parameter in Abhängigkeit von der Mehl-Konzentration ..	227
Tabelle 45:	UV-Absorption ausgewählter phenolischer Substanzen (nach: FEUCHT und TREUTTER 1989)	242
Tabelle 46:	Methanolische Extraktion der Probe "Möhre 88". Variationskoeffizienten für die einzelnen Peaks	256
Tabelle 47:	Saure Hydrolyse der Probe "Möhre 88". Variationskoeffizienten für die einzelnen Peaks.	257
Tabelle 48:	Weizenextrakt, Extraktion mit saurer Hydrolyse (Probe A1). Variationskoeffizienten der einzelnen Peaks	258
Tabelle 49:	Linearität einzelner Peaks einer Möhrenprobe (methanolische Extraktion) in verschiedenen Konzentrationsstufen	262
Tabelle 50:	Linearität einzelner Peaks einer Möhrenprobe (methanolische Extraktion) in verschiedenen Konzentrationsstufen	262

Fotografien

Foto 1	Der DOK-Langzeitversuch verschiedener Anbauverfahren in Therwil, Schweiz (Foto: FIBL, Schweiz)	9
Foto 2	Andere Ansicht des DOK-Versuches (Foto: FIBL, Schweiz)	9

Abbildungen

Abbildung 1	Verlauf der relativen Feuchte (%) gegen die Tageszeit in einer Kammer . .	17
Abbildung 2	Verlauf der Temperatur (°C) gegen die Tageszeit in einer Kammer	18
Abbildung 3	Von der Platte zur Variable der Texturanalyse	19
Abbildung 4	Muster einer Weizenprobe mit gleicher Probenmenge und unterschiedlichen Mengen an Kupferchlorid pro Platte	24
Abbildung 5	Ergebnis der Linearen Diskriminanzanalyse für die Vergleichsmessung Ernte 2003 mit zwei verschiedenen Mischungsverhältnissen	25
Abbildung 6	Variable <i>inertia</i> für zwei verschiedene Möhrenproben	25
Abbildung 7	Variable <i>inverse different moment</i> (ROI 100%) verschiedener Substanzen .	27
Abbildung 8	Schematischer Aufbau der Klimakammern	31
Abbildung 9	Einfluss der Kammerfeuchte auf den Kristallisationsvorgang	34
Abbildung 10	Einfluss des Scanvorgangs auf ein Weizenmuster, ROI=100%	35
Abbildung 11	Einfluss des Scanvorgangs auf ein Möhrenmuster, ROI=70%	35
Abbildung 12	Einfluss der Kammern auf den Weizenstandard	37
Abbildung 13	Einfluss der Zeit (Tage) auf Weizenstandard	38
Abbildung 14	Einfluss der Extraktionszeit auf eine Weizenprobe	42
Abbildung 15	Einfluss der Extraktionszeit auf zwei verschiedene Weizenproben, (öko: grün, konv.: gelb)	42
Abbildung 16	Einfluss der Alterung des Extraktes auf das Ergebnis einer Weizenprobe . .	43
Abbildung 17	Einfluss der Kammer auf das Ergebnis von zwei Weizenproben (öko: grün, konv.: gelb)	45
Abbildung 18	Einfluss der Tage (Probenvorbereitungen) auf das Ergebnis von zwei verschiedenen Weizenproben	45
Abbildung 19	Wiederholpräzision von zwei verschiedenen Weizenproben (öko: grün, konv.: gelb)	46

Abbildung 20	Einfluss der Alterung des Möhrensaftes auf das Ergebnis einer Möhrenprobe	48
Abbildung 21	Einfluss der Kammern auf das Ergebnis zweier unterschiedlicher Möhrenproben	49
Abbildung 22	Wiederholpräzision für zwei Möhrenproben	51
Abbildung 23	LD2 gegen LD1 für alle fünf Weizenproben DOK-Versuch, Ernte 2002 (Kontrolle: grau, öko: grün, konv.: gelb)	53
Abbildung 24	LD2 gegen LD1 für alle fünf Weizenproben DOK-Versuch, Ernte 2003 (Kontrolle: grau, öko: grün, konv.: gelb)	54
Abbildung 25	LD1-Wert für zwei verschiedene Möhrenproben (N-Düngungsversuch, Ernte 2002) ab zwei verschiedenen Tagen parallel (n=7)	55
Abbildung 26	LD1-Wert für zwei verschiedene Möhrenproben (N-Düngungsversuch, Ernte 2003) an zwei verschiedenen Tagen in zwei Kammern parallel (n=6)	56
Abbildung 27	LD1 gegen LD2 für alle vier Möhrenproben aus dem Sortenversuch, Ernte 2002 (gelb Hybrid-, grün samenfeste Möhren)	57
Abbildung 28	LD1 gegen LD2 für alle drei Möhrenproben aus dem Sortenversuch, Ernte 2003 (gelb Hybrid-, grün samenfeste Möhren)	58
Abbildung 29	Schematische Darstellung der Messanlage.	64
Abbildung 30	Zeitschema des Meßablaufs.	65
Abbildung 31	Emission einer Möhre	66
Abbildung 32	Emission eines Prüfkörpers	66
Abbildung 33	Spektren von Möhren und Weizen im Vergleich.	68
Abbildung 34	Probe mit standardisierbarer Oberfläche (Eidotter) im Probenraum der geöffneten Messkammer des Messgerätes	69
Abbildung 35	Probe mit nicht standardisierbarer Oberfläche (Möhre)	69
Abbildung 36	Veränderung des Spektrums durch an das Probenmaterial angepaßte Intensität im anregenden Spektralabschnitt.	70
Abbildung 37	Abhängigkeit des Gelb/Blau Verhältnisses von der Probenart	74
Abbildung 38	Spektrum in Abhängigkeit von der Probenart	75
Abbildung 39	Samen (hier Weizen) zeigen bei geringerem Wassergehalt eine höhere kurzfristige Lumineszenz (Mw1) und eine schmalbandigere, blaubezontere Anregbarkeit bei der relativen mittelfristigen Lumineszenz (R40%w).	77

Abbildung 40	Samen (hier Weizen, Apfelkerne, Calendulasamen) emittieren stärker nach blauer Anregung, hingegen emittieren Früchte, Blätter und Keimlinge (Apfel, Brennesselblatt, Karotte, Weizenkeimling) stärker nach roter und gelber Anregung. Die jeweilige Emission ist bezogen auf die Emission nach weißer Anregung.	79
Abbildungen 41 bis 45	Wirkung der Trocknung von Weizen auf das Gewicht (Abb. 41) und die FAS-Meßparameter Mw1w, R40w, R40Gelb/Blau und ChiE/H50w (Abb. 42 bis 45).	85
Abbildungen 46 und 47	Möhrenabschnitte im Vergleich.	86
Abbildung 48	Häufigkeit der Emissions-Intensität einzelner Möhren aus zwei Möhrenproben.	87
Abbildung 49	Messungen bei Rundküvetten.	89
Abbildung 50	Schema der verwendeten Bezeichnungen bei der Äquilibration und Messung von Samen am Beispiel Weizen.	90
Abbildung 51	Abhängigkeit der Helligkeit von der Betriebszeit der Lampe ohne Regelung	100
Abbildung 52	Abhängigkeit der Helligkeit von der Betriebszeit der Lampe mit Regelung	100
Abbildung 53	Kontrollkarte zur Überwachung des Eigenrauschens eines Photovervielfachers	101
Abbildung 54	Zusammenhang zwischen Lampenhelligkeit (als Sensor-Ausgangssignal) und Lumineszenz (R40) eines Prüfkörpers aus Glas	103
Abbildung 55	Lumineszenz (Mw1) eines Prüfkörpers aus Glas und Temperatur in der Meßkammer. Die Werte sind negativ miteinander korreliert.	103
Abbildung 56	Messgröße Mw1, Integrationsparameter BelW=3	106
Abbildung 57	Messgröße Mw1, Integrationsparameter BelW=5	106
Abbildung 58	Messgröße R40, Integrationsparameter BelW=3	107
Abbildung 59	Messgröße R40, Integrationsparameter BelW=5	107
Abbildung 60	Messgröße R40relativ, Integrationsparameter BelW=5	108
Abbildung 61	Messgröße R40relativ, Integrationsparameter BelW=3	108
Abbildung 62	Messgröße Chi/H50, Integrationsparameter BelW=3	109
Abbildung 63	Messgröße Chi/H50, Integrationsparameter BelW=5	109

Abbildung 64	Messgröße Chi/H50, Integrationsparameter BelW=5	110
Abbildung 65	Messgröße Chi/H50, Integrationsparameter BelW=3	110
Abbildung 66	Drei 6-fach Bestimmungen des Meßwertes Mw1 bei Weizen, wobei der Integrationsparameter BelW variiert wurde (links: BelW=1, Mitte: BelW=3, rechts: BelW=5).	113
Abbildung 67	Drei 6-fach Bestimmungen des Meßwertes R40w bei Weizen, wobei der Integrationsparameter BelW variiert wurde (links: BelW=1, Mitte: BelW=3, rechts: BelW=5).	114
Abbildung 68	Drei 6-fach Bestimmungen des Meßwertes R40gelb/blau bei Weizen, wobei der Integrationsparameter BelW variiert wurde (links: BelW=1, Mitte: BelW=3, rechts: BelW=5).	115
Abbildung 69	Drei 6-fach Bestimmungen des Meßwertes ChiE/H50w bei Weizen, wobei der Integrationsparameter BelW variiert wurde (links: BelW=1, Mitte: BelW=3, rechts: BelW=5).	116
Abbildung 70	Aufeinanderfolgende Messungen von Weizen bei gleicher Teilprobe jedoch jeweils erneutem Einfüllen in die Meßküvette.	117
Abbildung 71	Mw1w-Ergebnisse von 7 Weizen-Meßreihen (n=6) der gleichen Teilproben an 5 Meßtagen (2 u. 3 gleicher Meßtag sowie 4 u. 5 gleicher Meßtag).	120
Abbildung 72	R40w-Ergebnisse von 7 Weizen-Meßreihen (n=6) der gleichen Teilproben an 5 Meßtagen (2 u. 3 gleicher Meßtag sowie 4 u. 5 gleicher Meßtag).	121
Abbildung 73.	R40gelb/blau-Ergebnisse von 7 Weizen-Meßreihen (n=6) der gleichen Teilproben an 5 Meßtagen (2 u. 3 gleicher Meßtag sowie 4 u. 5 gleicher Meßtag).	121
Abbildung 74	Vier Trocknungsverfahren im Vergleich an 10 Weizenproben bezogen auf den Meßparameters Mw1w. Die Lage der 10 Proben zueinander ist weitgehend unabhängig vom Trocknungsverfahren.	126
Abbildung 75	Vier Trocknungsverfahren im Vergleich an 10 Weizenproben bezogen auf den Meßparameters R40w. Die Lage der 10 Proben zueinander ist relativ ähnlich	127
Abbildung 76	Vier Trocknungsverfahren im Vergleich an 10 Weizenproben bezogen auf den Meßparameters R40g/b. Die Verfahren B und C mit der geringeren Zahl von Meßwiederholungen trennen hier weniger ausgeprägt.	128

Abbildung 77	Vier Trocknungsverfahren im Vergleich an 10 Weizenproben bezogen auf den Meßparameters ChiE/H50w. Hier trennt das Verfahren C am besten. . . .	129
Abbildung 78	Lumineszenz Mw1w einer Möhre in Abhängigkeit von gemessenen Oberflächenabschnitt (Sektor).	132
Abbildung 79	Ergebnis der Untersuchung zur Wiederholbarkeit bei Möhren für die Meßgrößen Mw1w, R40w, R40g/b u. ChiE/H50w. Eine Möhrenprobe war in 6 Teilproben zerlegt worden (4 x n=18, 1x n=19, 1 x n=20).	133
Abbildung 80	Die Weizenproben II u. V zeigen höhere Meßwerte bei Mw1w und niedrigere bei R40w, R40g/b u. ChiE/H50w.	139
Abbildung 81	Nach den Feldwiederholungen 1-4 aufgeschlüsselte Ergebnisse der Weizenproben I-V.	140
Abbildung 82	Versuchsweise gebildeter „Index der samentypischen Ausprägung“. . . .	142
Abbildung 83	„Index der samentypischen Ausprägung“ ohne die Ausreißer in der Nullvariante (I).	143
Abbildung 84	Ergebnisse von Weizen (DOK-FIBL, Februar 2003)	144
Abbildung 85	Versuchsweise gebildeter „Index der samentypischen Ausprägung“. . . .	146
Abbildung 86	„Index der samentypischen Ausprägung“ nach Entfernung der Ausreißer aus den Daten der ungedüngten Probe (A-Null).	147
Abbildung 87	Ergebnisse von Weizen (DOK-FIBL, September 2003).	148
Abbildung 88	Versuchsweise gebildeter „Index der samentypischen Ausprägung“. . . .	150
Abbildung 89	Ungedüngte und gedüngte Möhrenvarianten (Anbauversuch Uni Kassel) im Vergleich bezüglich Meßparameter R40w.	152
Abbildung 90	Hybride (F1) und samenfeste (OP) Möhrensornten (Anbauversuch FiBL Frick, Ch) im Vergleich bezüglich des Meßparameters R40w.	154
Abbildung 91	Hybride (F1) und samenfeste (OP) Möhrensornten (Anbauversuch FiBL Frick, Ch) im Vergleich bezüglich des Meßparameters Mw1bl/R40bl.	155
Abbildung 92	Präzision und Rückführbarkeit der Stickstoffbestimmung (Kjeldahl)	172
Abbildung 93	Wiederfindungsrate Rohproteinbestimmung nach Kjeldahl	173
Abbildung 94	Wiederfindung Standardadditionsversuch Nitrat in Möhren	174
Abbildung 95	Präzision bei der Bestimmung freier Aminosäuren in Möhren	176
Abbildung 96	Wiederfindung freier Aminosäuren in Möhren	178

Abbildung 97	Präzision bei der Bestimmung proteinogener Aminosäuren in Weizen nach Hydrolyse	180
Abbildung 98	Wiederfindungsrate bei der Bestimmung proteinogener Aminosäuren in Weizen nach Hydrolyse	180
Abbildung 99	Fließschema Validierung des Gesamtverfahrens am Beispiel Weizen	182
Abbildung 100	Protein-N-Gehalt in Weizen FIBL-DOK-Versuch 2002-2003	191
Abbildung 101	Glutaminsäuregehalt in Weizen nach Hydrolyse FIBL-DOK-Versuch 2002-2003	192
Abbildung 102	Prolingehalte in Weizen nach Hydrolyse FIBL-DOK-Versuch 2002-2003	192
Abbildung 103	Gesamtproteingehalt Möhren Uni Kassel 2002-2003	193
Abbildung 104	Nitratgehalte Möhren Uni Kassel 2002-2003	194
Abbildung 105	Summe freier Aminosäuren und Amidierungsgrad Möhren Uni Kassel 2002-2003	195
Abbildung 106	Summen und AS_Quotienten Möhren N-Düngungsversuch Uni Kassel 2002-2003	196
Abbildung 107	Geamtproteingehalt Möhren FIBL-Sortenversuch 2002-2003	198
Abbildung 108	Nitratgehalt Möhren FIBL-Sortenversuch 2002-2003	199
Abbildung 109	Summe freier Aminosäuren und Amidierungsgrad Asparaginsäure Möhren FIBL-Sortenversuch 2002-2003	199
Abbildung 110	Summen und AS-Quotienten Möhren FIBL-Sortenversuch 2002-2003 ...	200
Abbildung 111	Elektrochemische Parameter verschiedener Getreidegattungen	208
Abbildung 112	Elektrochemische Parameter in Korrelation zur Konzentration	209
Abbildung 113	Einfluss des Ausmahlgrades bei Weizenmehl	210
Abbildung 114	Alterungsverhalten von Karottenmischsaft, Messzeit 900 s	211
Abbildung 115	Alterungsverhalten Karottenmischsaft, Messzeit 1800 s	212
Abbildung 116	Einfluss des Entsafters auf die Messwerte von Karottenmischsäften	216
Abbildung 117	Alterungsverhalten von Wein (offene Flasche)	225
Abbildung 118	Langzeitmessung von Wein (gleiche Charge)	226
Abbildung 119	Elektrochemische Messungen der Weizenproben 1-5, DOK Versuch, Herbst 2002	228
Abbildung 120	Elektrochemische Messungen der Weizenproben A-E, DOK-Versuch, Frühjahr 2003	230

Abbildung 121	Elektrochemische Messungen Weizen DOK, Herbst 2003	231
Abbildung 122	Elektrochemische Messungen der Karotten M22 / M55	232
Abbildung 123	Elektrochemische Messungen Möhren Uni Kassel M11 / M44	233
Abbildung 124	Elektrochemische Messungen Möhren Uni Kassel M 77 / M 88	234
Abbildung 125	Elektrochemische Messungen Möhren FIBL E, F, G	235
Abbildung 126	Elektrochemische Messungen Möhren FIBL H, J, K, L	236
Abbildung 127	Elektrochemische Messungen Möhren FIBL A bis D	237
Abbildung 128	Elektrochemische Messungen an Kartoffeln	239
Abbildung 129	Gradientenbedingungen (Gradient 1) für die untersuchten Möhren- und Weizenproben	251
Abbildung 130	Veränderte Gradientenbedingungen (Gradient 2) für die Untersuchung der Möhren- und Weizenproben	252
Abbildung 131	Chromatogramm einer Mischung aus 7 verschiedenen methanolischen Standardlösungen (Chlorogensäure, Vanillinsäure, Kaffeesäure, p-Hydroxybenzoesäure, Syringasäure, Ferulasäure und 6-Methoxyflavon). .	253
Abbildung 132	Chromatogramm einer Mischung aus 7 verschiedenen Standardlösungen (siehe vorhergehende Abbildung) nach Extraktion mit saurer Hydrolyse. Die theoretische Konzentration der jeweiligen Substanzen im Extrakt wie in der rein methanolischen Probe	254
Abbildung 133	Methanolische Extraktion "Möhre 88". Messpräzision	257
Abbildung 134	Möhrenextrakt mit saurer Hydrolyse. Messpräzision	258
Abbildung 135	Saure Hydrolyse einer Weizenprobe. Messpräzision	259
Abbildung 136	Kalibriergerade für 6-Methoxyflavon (WZW)	260
Abbildung 137	Kalibriergerade von 6-Methoxyflavon (Universität Kassel)	261

Kurzzusammenfassung

In dem wachsenden Markt ökologischer Lebensmittel werden Methoden zur produktorientierten Qualitätserfassung gefordert. Dabei geht es u.a. um die Unterscheidung von Produkten aus unterschiedlichen Anbauverfahren.

Die Ziele des Projektes waren daher:

1. ausgewählte ganzheitliche Methoden gemäß ISO 17025 zu validieren, d.h. Laborprozesse festzulegen, sowie Einflussgrößen und Verfahrensmerkmale zu bestimmen,
2. zu testen, ob diese Verfahren eine Differenzierung von definierten Proben statistisch abgesichert zeigen können.

Diese Ziele konnten erreicht werden. Es wurde bestätigt, dass einige der Methoden auf Grundlage dokumentierter Prozeduren Lebensmittel aus definierten Anbauversuchen (u.a. aus dem DOK-Versuch am FIBL/CH) reproduzierbar unterscheiden können.

Die Koordination und die Validierung der Kupferchlorid-Kristallisation sowie die Messung der Polyphenole lag bei der Universität Kassel, FG Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur. Die KWALIS GmbH, Dipperz validierte die Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie und die Bestimmung des Physiologischen Aminosäurestatus, die EQC GmbH, Weidenbach die elektrochemischen Messungen. Dr. Kromidas, Saarbrücken übernahm die Beratung der Validierungsprozeduren.

An Blindproben wurde untersucht, ob die Verfahren für Weizen- und Möhrenproben aus definierten Anbau- und Sortenversuchen geeignet sind (Fragestellung der Validierung). Die Proben wurden von unabhängiger Stelle (OEL-FAL, Trenthorst) codiert. Die Proben wurden gleichzeitig an alle Partner versandt; dadurch konnten die Methoden auch untereinander verglichen werden.

Die Methoden Kupferchlorid-Kristallisation, Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie und Physiologischer Aminosäurestatus sind für die Fragestellung geeignet. Mit allen drei Methoden konnten die Proben differenziert und gruppiert werden. Darüber hinaus konnten mit der Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie und über den physiologischen Aminosäurestatus die Proben auch den Anbauweisen richtig zugeordnet werden. Allerdings ist damit noch keine Aussage über die Fähigkeit dieser Verfahren möglich, generell Proben aus ökologischer und konventioneller Herkunft zu unterscheiden. Dafür sind weitere Untersuchungen sowohl an Proben definierter Herkunft als auch an Marktproben notwendig.

Summary

The growing market of organic food products demands for product oriented quality control. One major concern is the differentiation of organically grown from conventionally grown food. Therefore the aims of the project were:

1. to validate certain holistic methods according to ISO 17025 (documentation and characterisation of each single method) and
2. to test which method can differentiate products from different farming systems statistically.

Both aims could be achieved. Based on documented and tested laboratory procedures samples from different farming systems (defined field trials, e.g. DOC-trial at FIBL/CH) could be successfully discriminated by several methods.

The project was coordinated by the Department of Organic Food Quality and Food Culture at the University of Kassel, whose assignment also was to validate the copperchloride-crystallisation technique and to measure phenolic compounds. The private research company KWALIS GmbH at Dipperz was responsible for the validation of the fluorescence excitation spectroscopy and the physiological aminoacid status, whereas the second private company EQC GmbH at Weidenbach validated the electrochemical measurements. The validation expert Dr. Kromidas, Saarbrücken, gave advice on the validation procedures.

All methods were tested with coded samples for their capability to whether they can differentiate food samples from different farming systems as well as food samples from variety trials. The samples have been coded and sent around at the same time from a third independent institution (OEL-FAL, Trenthorst). Therefore the results achieved from different methods could be compared.

The methods “copperchloride-crystallisation”, “fluorescence excitation spectroscopy” and “physiological aminoacid status” were able to discriminate and group all samples. In addition with the methods “fluorescence excitation spectroscopy” and “physiological aminoacid status” it was even possible to identify correctly which sample was from which agricultural system. Future projects will show, if these methods are also able to differentiate food products from organic versus conventional farming system when samples are collected from the market rather than being under controlled conditions.

1 Ziele und Aufgabenstellung

(Dr. J. Kahl, Dr. N. Busscher, Prof. Dr. A. Meier-Ploeger)

1.1 Ausgangslage

Gegenwärtig anerkannte und validierte chemisch-analytische Methoden können bisher Lebensmittel aus ökologischem und konventionellem Anbau nicht an Blindproben differenzieren oder sind für diese Fragestellung nicht eingesetzt worden. Verschiedene ganzheitliche und vor Projektbeginn noch nicht wissenschaftlich anerkannte -weil nicht validierte- Methoden bieten die Chance, Unterschiede zwischen Anbauweisen, Sorten, Verarbeitungsgraden etc. am Produkt zu belegen (MEIER-PLOEGER & VOGTMANN 1991; WEIBEL et al. 2001).

1.2 Zielsetzung

Diese Methoden sollen gemäß den Vorgaben aus der ISO-Norm 17025 validiert werden, um wissenschaftlich begründete Aussagen zur Differenzierung von Proben unterschiedlicher Anbauverfahren mit diesen Methoden treffen zu können. Damit kann eine allgemeine Anerkennung der Methoden und deren Ergebnisse hinsichtlich der Charakterisierung der ökologischen Lebensmittelqualität und einer Differenzierung von Lebensmitteln unterschiedlicher Produktionsverfahren erreicht werden (TAUSCHER et al. 2003). Dafür ist es das Ziel dieses Projektes, verschiedene Methoden an definierten Proben aus unterschiedlichen Anbauweisen zu validieren und zu zeigen, welche Methoden Lebensmittel nach Anbauverfahren differenzieren.

1.3 Validierungsfragen

Die Validierungsfragen sind:

1. Können Weizenproben aus einem wohl definierten 20jährigen Anbauversuch (DOK-Versuches mit fünf verschiedenen Anbauverfahren, FIBL/CH) mit Hilfe der ganzheitlichen Methoden unterschieden werden?
2. Können Möhrenproben aus zwei Stickstoff-Düngungsstufen (Universität Kassel, Frankenhausen) unterschieden werden?
3. Können Möhrenproben aus einem Sortenversuch (2x Hybridsorten/ 2x samenfeste Sorten; FIBL/CH) unterschieden werden?
4. Sind die Methoden dafür präzise genug?

Darüber hinaus wurde gefragt, ob für die Fragen unter 1. und 3. die Proben nach Anbauvariante bzw. Sorte gruppiert werden können.

1.4 Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung umfasst zunächst den Stand des Wissens zu dokumentieren und eine systematische Erfassung und Überprüfung der Einflussgrößen für folgende Methoden durchzuführen:

1. Kupferchlorid-Kristallisation
2. Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie
3. Physiologischer Aminosäurestatus
4. Elektrochemische Messungen

Um zu bestätigen, dass die Verfahren die Fragen beantworten können, sollten sie nach normativen Dokumenten validiert werden. Dafür musste jede Methode schriftlich fixiert werden und neben den Angaben wie Methoden- und Einstellungsparameter, auch Art und Güte der eingesetzten Materialien, sowie Angabe über Probennahme, Probenkonservierung, Probentransport, Probenumfang, Sequenzaufbau bei der eigentlichen Messung und den Arbeitsbereich enthalten.

Die Ergebnisse sollten anhand von zwei Vergleichsmessungen am selben Probenmaterial verglichen werden. Die Proben sollten zusätzlich mit einer HPLC-Methode auf eine Klasse von Polyphenolen (sekundäre Pflanzenstoffe) vermessen werden. Codierung und Versand der Proben sollten von neutraler Stelle erfolgen, ebenso die Bewertung der Validierungsprozesse für jede einzelne Methode.

1.5 Zielgruppen

Die Zielgruppen Handel und Hersteller ökologischer Erzeugnisse sollte auf einem innerhalb des Projektes organisierten Workshop angesprochen werden. Darüber hinaus sollten Wissenschaftler in Forschungsanstalten des Bundes und der Länder, die sich mit ökologischem Landbau und der Qualitätsbewertung ökologischer Erzeugnisse beschäftigen anlässlich einer unmittelbar zum Projektende durchgeführten wissenschaftlichen Tagung über die Ergebnisse informiert werden.

2 Planung

(Dr. J. Kahl, Dr. N. Busscher, Prof. Dr. A. Meier-Ploeger)

2.1 Ergebnis

Alle der im Projektantrag definierten Meilensteine wurden erreicht. Die verschiedenen Methoden konnten für die festgelegten Fragestellungen gemäß ISO-Norm 17025 validiert werden. Die Validierungsergebnisse wurden für jede einzelne Methode von dem Experten für die Validierung analytischer Labormethoden Dr. Kromidas hinsichtlich der Erfüllung der im Projektantrag definierten Vorgaben bewertet. Die (u.a. erntebedingte) Verschiebung von Meilensteinen um ca. 1,5 Monate hatte keinen Einfluss auf den erfolgreichen Abschluss des Projektes. Workshop und Tagung sind erfolgreich durchgeführt worden.

2.2 Validierung

Validierung als Eignungsnachweis für die Qualität der Analytik wird heute allgemein vorausgesetzt (KROMIDAS 2000). Validierung bedeutet im Rahmen dieses Projektes, die Frage zu beantworten, ob sich die Methoden für die Unterscheidung verschiedener Produktqualitäten im Sinne von Anbauverfahren und Sorten eignen.

Methoden, die als Standardmethoden bereits durch internationale oder nationale Normen oder anerkannte Spezifikationen ausreichend genaue Informationen enthalten brauchen nicht validiert zu werden, wenn diese normative und veröffentlichte Dokumente enthalten. Diese müssen so beschaffen sein, dass sie vom Personal für die Abläufe benutzt werden können (z.B. die Methodensammlung nach §35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes). Folgende Verfahren müssen darüber hinaus validiert werden, um zu bestätigen, dass diese für den beabsichtigten Gebrauch geeignet sind:

- Verfahren, die nicht in normativen Dokumenten festgelegt sind,
- selbstentwickelte Verfahren,
- Verfahren nach normativen Dokumenten, die außerhalb ihres vorgesehenen Anwendungsbereiches angewendet werden,
- Erweiterungen von Verfahren.

Dafür muss die Fragestellung so beschrieben werden, dass sich daraus die an die Methode zu stellenden Leistungsanforderungen klar und deutlich ableiten lassen. Weiterhin müssen sich die üblichen Leistungsmerkmale der Methode als benötigte charakteristische Kenngrößen ermitteln

lassen. Die Methode muss schriftlich fixiert vorliegen und sollte neben Angaben wie Methoden- und Einstellparameter auch Art und Güte der eingesetzten Materialien sowie Angabe über Probenahme, Probenkonservierung, Probentransport, Probenaufbereitung, Sequenzaufbau bei der eigentlichen Messung und den Arbeitsbereich enthalten.

Die EN ISO/IEC 17025:2000 hat den Status einer Deutschen Norm und ist seit Dezember 1999 in Kraft. In Abschnitt 5.4 "Prüf- und Kalibrierverfahren und deren Validierung" sind die Vorschriften für die Durchführung der Validierung eines Verfahrens beschrieben.

Die EN ISO/IEC 17025:2000 fordert im Abschnitt 5.4.5 "Validierung von Verfahren", dass die Validierung in dem Umfang durchgeführt werden muss, der zur Erfüllung der Erfordernisse der beabsichtigten Anwendung oder des betreffenden Anwendungsgebietes notwendig ist. Im Falle von diesem Projekt sollte die Validierung auch die Dokumentation der Verfahren für Probennahme, Handhabung und Transport umfassen.

Für die Validierung aller hier überprüften Methoden soll ein Validierungsplan entwickelt werden. Als Proben sollen u.a. Produkte aus dem über 20 jährigen DOK-Versuch des FIBL in der Schweiz verwendet werden, die als Blindproben vom Institut für ökologischen Landbau der FAL (Trenthorst) an die Projektpartner zur Bewertung vorbereitet werden (nähere Informationen zum DOK-Versuch unter <http://www.FIBL.ch>).

2.3 Projektkoordination

Die Projektkoordination wurde von der Universität Kassel, FG Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur, durchgeführt. Dazu gehörte die Erstellung eines Netzplanes, die Organisation und Protokollierung der Arbeitstreffen, die Vorbereitung des Workshops und der Konferenz sowie die regelmäßige Abstimmung der Projektpartner (und die Erteilung von Aufträgen incl. Termin- und Kostenkontrolle). Darüber hinaus wurde der Abschlussbericht koordiniert und angefertigt (Redaktion), wobei die Kapitel zu den einzelnen Methoden von den Projektpartnern verfasst wurden. Das Erreichen der jeweiligen Meilensteine wurde für jeden Projektpartner verfolgt, etwaige Verzögerungen rechtzeitig erkannt und lösungsorientiert mit den Beteiligten besprochen. Der Auftraggeber (BLE) wurde regelmäßig und zeitnah über den Projektverlauf informiert. Das Budget wurde eingehalten, aufgrund einer Verschiebung des Erntetermins der FIBL-Möhren wurde das Projekt kostenneutral um 1,5 Monate verlängert.

2.4 Projektablauf

Ein Netzplan ist im Anhang 8.1 abgedruckt.

Der Projektablauf wird durch folgende Meilensteine gegliedert:

Meilenstein 1

- ✓ Dokumentation Stand des Wissens und Verfahrensdokumentation als Rohfassung abgeschlossen
- ✓ Voruntersuchungen abgeschlossen und im Hinblick auf das Projektziel bewertet
- ✓ Validierungsplan überarbeitet

Meilenstein 2

- ✓ 1. Vergleichsversuch mit Auswertung abgeschlossen
- ✓ Workshop mit Projektpartnern abgeschlossen
- ✓ Beurteilung weiterer Projektperspektiven

Meilenstein 3

- ✓ Workshop mit Händlern, Erzeugern durchgeführt

Meilenstein 4

- ✓ 2. Vergleichsuntersuchung mit Auswertung abgeschlossen
- ✓ Kenngrößen der Methoden für verschiedene Produkte ermittelt
- ✓ Messunsicherheit der Methoden ermittelt
- ✓ Methodenvergleich
- ✓ Methoden sind für ausgewählte Produkte validiert
- ✓ vorläufiger Abschlussbericht erstellt

Meilenstein 5

- ✓ Tagung zur Vorstellung der Projektergebnisse an Zielgruppen außerhalb des BMVEL durchgeführt.

2.5 Arbeitstreffen

Es wurden insgesamt 8 Arbeitstreffen mit den Projektpartnern (Methoden) im Verlauf der 15 Monate durchgeführt. Neben der Absprache organisatorischer Handlungsstrategien zur Zeit- und Aufgabenplanung, wurden die inhaltlichen Fragen zu jeder Methode diskutiert. Dies konnte vor allem deshalb erfolgreich durchgeführt werden, weil die Projektpartner sich als Mitglieder eines Projektteams mit gleicher Zielsetzung verstanden und sich offen über Probleme und Ergebnisse

ihrer speziellen Methode austauschten. Alle Ergebnisse wurden mit Aufgabenplan und Entscheidungsliste protokolliert. Folgende Arbeitstreffen wurden durchgeführt:

Datum	Ort	Ergebnisse
04.07.2002	Universität Kassel	<ul style="list-style-type: none"> • Verabschiedung des Netzplanes • Festlegung der Arbeitspakete incl. Eingangs- und Ausgangsgrößen • Festlegung der Vergleichsproben (Umfang)
26.09.2003	KWALIS/Dipperz	<ul style="list-style-type: none"> • Festlegung der Vergleichsproben (Termine) • Festlegung der Dokumentationsstruktur • Festlegung Validierungsplan • Diskussion Methodenprobleme mit Lösungsvorschlägen
12.12.2002	EQC/Weidenbach	<ul style="list-style-type: none"> • Vorstellung der Ergebnisse • Diskussion Methodenprobleme mit Lösungsvorschlägen • Evaluierung Messung Vergleichsproben Festlegung der Vergleichsproben 2003 (Termine)
08.05.2003	Universität Kassel	<ul style="list-style-type: none"> • Vorstellung und Evaluierung der Ergebnisse • Decodierung der Vergleichsmessungen • Diskussion Methodenprobleme mit Lösungsvorschlägen
05.06.2003	KWALIS/Dipperz	<ul style="list-style-type: none"> • Planung Workshop
28.06.2003	Kassel und Dipperz	<ul style="list-style-type: none"> • Bewertung Validierung mit Dr. Kromidas
16.09.2003	KWALIS/Dipperz	<ul style="list-style-type: none"> • Planung Konferenz • Abstimmung Abschlußbericht

2.6 Workshop

Die Durchführung des Workshops fand am 27.06.2003 in Kassel zum Meilenstein 3 statt.

2.7 Abschlusskonferenz

Die Durchführung der Abschlussveranstaltung am 13./14.11.2003 in Berlin fand zum Meilenstein 5 statt. Die Abschlusstagung wurde als eine europäische Konferenz geplant. Die Proceedings der Konferenz werden im Jahr 2004 veröffentlicht.

2.8 Berichte

Folgende Berichte wurden verfasst und an den Auftraggeber verschickt:

- Sachstandbericht zum Meilenstein 1
- Zwischenbericht zum Meilenstein 2
- Decodierung Vergleichsproben
 - ▶ 08.05.2003 zum Meilenstein 2
 - ▶ 20.10.2003 zum Meilenstein 4

3 Probenmaterialien (Dir. und Prof. PD. Dr. habil. G. Rahmann, K. Weirauch)

3.1 Einleitung

Das Institut für ökologischen Landbau der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (OEL-FAL, www.oel.fal.de) hat für das Projekt BÖL 02OE170 „Ganzheitliche Untersuchungsmethoden zur Erfassung und Prüfung der Qualität ökologischer Lebensmittel: Stand der Entwicklung und Validierung“ die Probenbeschaffung, -codierung und -verteilung übernommen. Als neutraler Partner wurde besonders auf die wissenschaftlich sachgerechte und nachvollziehbare Bearbeitung von Blindproben (Codierung und Decodierung) durch die Forschungspartner geachtet.

Für die Validierung wurden Proben von Winterweizen und Möhren der Erntejahre 2002 und 2003 verwendet. Die codierten Proben wurden durch eigene Fahrzeuge und Fahrer direkt bei den Partnern abgeliefert.

Die Decodierung der Winterweizen- und Möhren-Proben aus der Ernte 2002 fand am 8. Mai 2003 in Witzenhausen auf einer Arbeitsgruppensitzung und für die Proben aus der Ernte 2003 per Fax am 22. Oktober 2003 statt. Vorher haben alle Projektpartner prädecodiert und ihre bisherigen Untersuchungsergebnisse belegbar per eMail oder Fax an das Institut für ökologischen Landbau geschickt. Dort werden sie mit den Rückstellproben archiviert. Die Berichte der einzelnen Partner mit den Analyseergebnissen wurden zusammen mit der Decodierung an alle geschickt.

3.2 Weizen

Die Proben des Winterweizens stammen aus dem seit 1977 laufenden DOK-Versuch in Therwil/Schweiz (<http://www.FIBL.ch/english/research/annual-crops/dok/index.php>). Dieser Langzeit-Versuchsanbau wurde 1977 vom Forschungsinstitut für Biologischen Landbau in der Schweiz (FIBL Schweiz) begonnen und wird heute zusammen mit der Eidgenössischen Forschungsanstalt für Agrarökologie und Landbau (FAL) betreut (MÄDER et al. 1993, MÄDER et al. 2002). Proben aus diesem wohl weltweit am besten geführten und dokumentierten DOK-Versuch sind für eine analytische Differenzierung verschiedener Anbausysteme hervorragend geeignet. Der DOK-Versuch umfasst insgesamt fünf verschiedene Anbauvarianten, die in vierfacher Wiederholung vorliegen:

- Konventionell (Integrierte Produktion: mit 1,0 und 0,5 x organischer Mistdüngung)
- Organisch-biologisch (1,4 und 0,7 DGVE pro ha Mistdüngung)
- Biologisch-dynamisch (1,4 und 0,7 DGVE pro ha Mistdüngung)

- Mineralisch gedüngt (NPK in Menge der 1,0 x Mistdüngung konventionell)
- ungedüngt

Die Verfahrensunterschiede liegen in der Düngung und im Pflanzenschutz, nicht in der Fruchtfolge und der Bodenbearbeitung. Insgesamt gibt es 96 Parzellen mit einer Größe von jeweils 100 m² (Foto 1 und 2). Die Anbauvarianten konventionell (IP), organisch-biologisch und biologisch-dynamisch werden im DOK-Versuch noch einmal in zwei Intensitätsstufen der Düngung unterschieden (praxisüblich und reduziert mit halber Aufwandmenge an Mist). Für das Projekt wurden nur die praxisüblichen Düngungsvarianten mit 1,4 DGVE / ha: biologisch-dynamisch mit 1,4 DGVE (D2) und organisch-biologisch (O2) bzw. 1,0 Norm-Mistdüngung der konventionellen (Integrierte Produktion: K2) sowie die Variante der Mineraldüngung (M) und der ungedüngten Variante (N) verwendet.

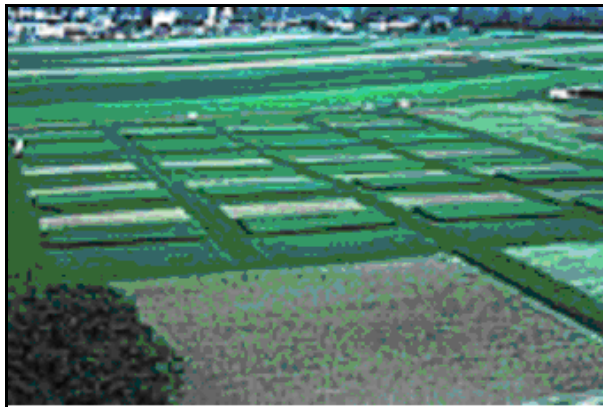


Foto 1: Der DOK-Langzeitversuch verschiedener Anbauverfahren in Therwil, Schweiz (Foto: FIBL, Schweiz)



Foto 2: Andere Ansicht des DOK-Versuches (Foto: FIBL, Schweiz)

In der seit 1976 nun bereits vierten Folge der siebenjährigen Fruchtfolge wurden für die Periode 1999 bis 2005 die Kulturarten Kartoffeln (Sorte Desiree), Winterweizen (2002: Sorte Tamara; 2003: Sorte Titlis) mit Untersaat, Sojabohnen (Sorte Maple Arrow), Mais (Sorte Magister), Winterweizen (2002: Sorte Tamara; 2003: Sorte Titlis) ohne Untersaat und zweimal Klee gras (Standardmischung 330) verwendet. Im Wirtschaftsjahr 2001/02 wurden Silomais, Kartoffeln und Weizen 1 und 2002/03 Weizen 1, Weizen 2 und Soja angebaut. Die Proben für die Untersuchungen stammen aus den Weizen-1-Anbaufeldern, welche im Jahr 2002 am 24. Juli und im Jahr 2003 am 15./16. Juli geerntet wurden. Die Weizenproben (Korn und Stroh) wurden am 9. August 2002 bzw. 25. Juli 2002 sowie Weizen 2 (Sorte Titlis ohne Untersaat, nur Korn) am 19. August 2003 vom

Institut für ökologischen Landbau vom Versuchsbetrieb in der Schweiz abgeholt und nach Trenthorst gefahren (Tab. 1). Die Liefermenge orientierte sich an der Verfügbarkeit aus dem DOK-Versuch.

Wiederholungen	1		2		3		4	
Erntejahr	2002	2003	2002	2003	2002	2003	2002	2003
Ungedüngt (N)	12,00	5,00	11,45	5,00	6,14	5,00	11,60	5,00
Mineralisch gedüngt 1,0 Norm (M)	15,58	5	17,15	5	16,75	5,00	16,00	5,00
Biologisch-dynamisch mit 1,4 DGVE /ha (D2)	13,72	5,00	16,35	5,00	11,43	5	15,82	5,00
Organisch-biologisch mit 1,4 DGVE /ha (O2)	14,10	5,00	16,45	5,00	16,12	5	16,22	5,00
Konventionell IP (K2) 1,0 Norm Mistdüngung	16,50	5,00	16,12	5,00	15,33	5	17,32	5

Tabelle 1: Probenmaterial für Winterweizen aus dem DOK-Versuch für das Erntejahr 2002 und 2003 (kg)

Nach der Ernte wurde der Weizen in der Schweiz von der FAL (Schweiz) aufbereitet und in Jutesäcken in einer großen Halle gelagert. Diese Jutesäcke wurden von Mitarbeitern des Instituts für ökologischen Landbau der FAL (Deutschland) mit einem PKW nach Trenthorst, Schleswig-Holstein, transportiert. Diese Weizenproben wurden dort in den Jutesäcken in einem trockenen Raum bei normaler Raumtemperatur gelagert. Die Raumtemperatur wurde nicht kontinuierlich gemessen.

Im Institut für ökologischen Landbau der FAL in Trenthorst wurden die Proben in kleine Partien für die Partner und für die Rückstellproben abgepackt. Es wurden keine handlungsgenauen Protokolle für die Teilung und Verpackung der Proben geführt. Zur Kontrolle waren immer zwei Mitarbeiter des Instituts an der Verpackung und Codierung beteiligt. Die Weizenkornproben der 2002-Ernte wurden am 21. Oktober 2002 (2/3 der Probenmenge) und am 24. Februar 2003 (1/3 der Probenmenge) (Tab. 2) innerhalb von 24 Stunden an alle Forschungspartner codiert abgeliefert. Die korrekte Lieferung wurde per Unterschrift dokumentiert. Die Menge und der Termin wurde im Vorfeld abgestimmt. Die Strohproben wurden nicht verwendet.

Kürzel	Feld- Nummer ¹	KWALIS PA	KWALIS FAS	EQC 1	EQC 2	Kassel
Liefertermin		10-02, 02-03	10-02, 02-03	10-02, 02-03	10-02, 02-03	10-02, 02-03
Ungedüngt (N)	1	A010, A018	A011, A019	A012, A020	A013, A021	A014, A022
	41	A028, A036	A029, A037	A030, A038	A031, A039	A032, A040
	57	B118, A054	B083, A055	D228, A056	E301, A057	D248, A058
	91	B136, A072	D281, A073	E353, A074	A067, A075	E355, A076
Mineralisch gedüngt 1,0 Norm (M)	2	B082, B090	A047, B091	B084, B092	B085, B093	E302, B094
	42	B100, B108	B101, B109	C210, B110	C157, B111	B104, B112
	58	A046, B126	C155, B127	B120, B128	B121, B129	C176, B130
	92	A028, B144	B137, B145	C156, B146	B139, B147	B140, B147
Biologisch-dynamisch mit 1,4 DGVE /ha (D2)	8	C154, C162	B119, C163	B138, C164	B103, C165	C158, C166
	48	C172, C180	C173, C181	C174, C182	C175, C183	B122, C184
	52	D226, C198	E335, C199	C192, C200	C193, C201	C194, C202
	86	D280, C216	C209, C217	B102, C218	D283, C219	C212, C220
Organisch-biologisch mit 1,4 DGVE /ha (O2)	14	C190, D234	D227, D235	A048, D236	D229, D237	D230, D238
	30	E298, D252	D245, D253	D246, D254	D247, D255	A050, D256
	70	D262, D270	D263, D271	E300, D272	D265, D273	D266, D274
	80	C262, D288	A065, D289	D282, D290	C211, D291	D284, D292
Konventionell Integrierte Produktion (K2) 1,0 Norm Mistdüngung	20	D244, E206	E299, E207	D264, E308	A049, E309	B086, E310
	36	E316, E324	E317, E325	E318, E326	E319, E327	E320, E328
	64	E334, E342	C191, E343	E336, E344	E337, E345	E338, E346
	74	E351, E259	E352, E360	A066, E361	E354, E362	A068, E363

¹ Feldnummer der Wiederholung des DOK-Versuchsanbaus in Therwil

DGVE = Düngergroßvieheinheiten

Tabelle 2: Probencodierung für die Weizenproben der Ernte 2002 und Lieferung an die Forschungspartner im Oktober 2002 und Februar 2003

Die Proben der Ernte 2003 wurden am 15. September an die Partner codiert verteilt (Tab. 3). Die Codierung war einfacher gehalten als bei den Proben der Ernte 2002. Auch wurden auf Wunsch an den Partner Kassel bulk-Proben für die Kupferchloridmethoden und Einzelproben für die Polyphenolanalysen der Feldwiederholungen geliefert. Die anderen Partner erhielten wieder Einzelproben. Alle Partner erhielten die gleiche Codierung. Die Codierung erfolgte für alle Analyseverfahren gleich. Die bulk-Proben wurden erstellt, indem das Gesamtgewicht der Einzelproben durch die Anzahl der Bestimmungsparameter plus eine für die Rückstellprobe geteilt wurde. Die Einzelproben der Anbauwiederholungen wurden dann für die bulk-Proben zusammengeführt.

Kürzel	Feld- Nummer ¹	KWALIS PA	KWALIS FAS	EQC	Polyphenole Kassel	CuCl ₂ Kassel
Ungedüngt (N)	5	E4	E4	E4	E4	E (bulk)
	39	E3	E3	E3	E3	
	55	E2	E2	E2	E2	
	95	E1	E1	E1	E1	
Mineralisch gedüngt 1,0 Norm (M)	6	D4	D4	D4	D4	D (bulk)
	40	D3	D3	D3	D3	
	56	D2	D2	D2	D2	
	96	D1	D1	D1	D1	
Biologisch-dynamisch mit 1,4 DGVE /ha (D2)	12	C4	C4	C4	C4	C (bulk)
	46	C3	C3	C3	C3	
	50	C2	C2	C2	C2	
	90	C1	C1	C1	C1	
Organisch-biologisch mit 1,4 DGVE /ha (O2)	18	B4	B4	B4	B4	B (bulk)
	28	B3	B3	B3	B3	
	68	B2	B2	B2	B2	
	84	B1	B1	B1	B1	
Konventionell Integrierte Produktion (K2) 1,0 Norm Mistdüngung	24	A4	A4	A4	A4	A (bulk)
	34	A3	A3	A3	A3	
	62	A2	A2	A2	A2	
	78	A1	A1	A1	A1	

¹ Feldnummer der Wiederholung des DOK-Versuchsanbaus in Therwil
 DGVE = Düngergroßvieheinheiten (eine DGVE entspricht ungefähr der Mistanfall von einem Rind mit 500 kg Lebendgewicht)

Tabelle 3: Probencodierung für die Weizenproben der Ernte 2003 und Lieferung an die Forschungspartner im September 2003

3.3 Möhren

Es gab zwei unterschiedliche Versuche für Möhren. Einerseits sollten, wie beim Winterweizen, unterschiedliche Anbauverfahren und andererseits durch die verwendeten ganzheitlichen Analyseverfahren unterschiedliche Züchtungsstufen identifiziert werden. Da keine Möhren aus dem DOK-Versuch zur Verfügung standen, mussten andere Quellen verwendet werden. So stammten die Proben für die Züchtungsstufen ebenfalls vom Forschungsinstitut für Biologischen Landbau vom Institutsstandort in Frick, Schweiz (www.FIBL.org). Für den Analyse zur Identifikation der Anbauverfahren wurden Möhren aus einem Anbauprojekt auf dem seit 1999 ökologisch bewirtschafteten Versuchsbetrieb der Universität Kassel, Frankenhausen verwendet (www.wiz.uni-kassel.de/dfh.htm).

3.3.1 Möhren für die Untersuchung über die Sorten (FIBL-Möhren)

Die verschiedenen Möhrensorten für die Zuchtstufen stammen aus dem Anbauversuch des FIBL, wo alte und neue Sorten miteinander verglichen werden. Es wurden die Zuchtsorten Samson (OP),

Nipomo (F1), Bolero (F1), Tiptop (OP) und Nipomo-C (C-Linie der Nipomo-F1) für das Projekt zur Verfügung gestellt (Tab. 4).

Sorte	Typ	Anzahl Wiederholungen	Gewicht / Probe	Code: 11.11.02 Lieferung	Code 17.03.03 Lieferung
Samson	OP	4	3 kg	G	H
Nipomo	F1	4	3 kg	F	I
Nipomo	Wiederholung von Nipomo F1		2,6 kg		P
Boléro	F1	4	2,4 kg	E	K
Tiptop	OP	2	3 kg		L
Nipomo C	C-Linie der F+ Sorte	2	3,1 kg		O

Tabelle 4: Möhren für Untersuchungen zum Zuchtstatus vom FIBL 2002 und ihre Codierung

Nach der Ernte wurden die Möhren in der Schweiz in einem Kühlraum (ungefähr 4°C) gelagert. Die erste Möhrenlieferung für das Projekt wurden am 27. September 2002 aus Frick abgeholt und in einer Gefriertruhe bei 4°C direkt nach Trenthorst gefahren (12 Stunden Fahrzeit). Hier wurden sie zunächst 5 Tage gelagert und dann auf Probenmengen abgepackt. Diese wurden bis zur Verteilung am 11. November 2002 in einer Kühltruhe (rund 4°C) zwischengelagert, bis sie an die Partner verteilt wurden. Diese erste Lieferung umfasst die drei Qualitäten á 16 Möhren der Sorten Samson, Nipomo und Bolero. Sie wurden als bulk-Probe an die Projektpartner codiert verteilt. Bulk-Proben wurden erstellt, indem das Gesamtgewicht der Einzelproben durch die Anzahl der Bestimmungsparameter plus eine für die Rückstellprobe geteilt wurde. Die Einzelproben der einzelnen Wiederholungen wurden zusammengeführt. Es wurde auf vergleichbare Größe und Anzahl der Möhren pro Probe geachtet. Die zweite Möhrenlieferung aus der Schweiz wurde am 17. März 2003 direkt aus dem dortigen Kühlhaus entnommen, abgepackt und – transportiert in Kühlbehältnissen - direkt an die Partner verteilt (Tab. 4). Das gleiche ist auch bei der letzten Lieferung im Oktober 2003 (Ernte 2003) geschehen (Tab. 5).

Möhrensorte (jeweils 4 Wiederholungen)	kg/Probe	Codierung
Tiptop	7,2	A
Bolero	7,2	B
Nipomo F1	7,2	C
Samson	7,2	D

Tabelle 5: Codierung der Möhren aus dem FIBL-Anbau des Anbaujahres 2003

3.3.2 Möhren für die Untersuchung über die Anbauverfahren (Uni-Kassel)

Die Möhren für die Untersuchungen über die Anbauverfahren stammen aus einem Versuch über die Reaktionen von Möhren auf den Anbau auf Dämmen (vs. Flachbeete), und N-Versorgung. Die Versuchspartellen sind in Streifenanlage auf 18 m² / Parzelle in vierfacher Wiederholung angelegt. Es wurden die Möhren der Sorte Rodelika verwendet, die Vorfrucht war Winterroggen mit der Zwischenfrucht Phacelia, die Vorvorfrucht war Winterweizen. Die Düngungsvariante wurde mit 150 kg N in Form von Hornspänen gedüngt. Der Dammanstand war 75 cm mit jeweils 3 Reihen Möhren auf einem Damm. Die Pflegeverfahren sind dem Versuchsprogramm zu entnehmen (Fragstein 2003). Für die Proben wurden die Möhren der Anbauvarianten „ohne biologisch-dynamische Spritzpräparate + 150 kg N“ sowie „ohne biologisch-dynamische Spritzpräparate ohne N“ verwendet. Es konnten Möhren aus diesen Anbauvarianten in vierfacher Wiederholung verfügbar gemacht werden. Die Möhren des Anbaujahres 2002 wurden am 16. August geerntet. Die Proben für die Untersuchungen wurden direkt nach der Ernte ohne Zwischenlagerung abgeholt, in den typischen Jutesäcken nach Trenthorst gefahren. Dort wurden sie bis zum Auslieferungstermin wie die Möhren aus der Schweiz gelagert. Am 28. Oktober 2002, 2. Dezember 2002 und am 24. Februar 2003 wurden jeweils 20 Möhren dieses Versuchs in vergleichbarer Qualität an die Projektpartner innerhalb von 24 Stunden verteilt (Tab. 6). und 2003 am 17. September 2003 geerntet, am 27. September 2003 abgeholt und am 29. September 2003 codiert an die Partner verteilt (Tab. 7).

Liefertermin	Anbauvariante „Ohne biologisch-dynamische Spritzpräparate ...					
	... plus 150 kg N (Hornmehl)			... ohne Stickstoff-Düngung		
	28.10.02	02.12.02	24.02.03	28.10.02	02.12.02	24.02.03
EQC	M66	M55	M44	M33	M22	M11
KWALIS PA	M66	M55	M44	M33	M22	M11
KWALIS FAS	M66	M55	M44	M33	M22	M11
Kassel	M66	M55	M44	M33	M22	M11

Tabelle 6: Codierung der Möhren für Untersuchungen über die Anbauverfahren aus dem Versuch Uni Kassel 2002, Frankenhausen

	Anbauvariante „Ohne biologisch-dynamische Spritzpräparate...			
	... plus 150 kg N (Hornmehl)		... ohne Stickstoff-Düngung	
	Code	kg	Code	kg
EQC	M77	6,8	M88	7,5
KWALIS PA	M77	6,4	M88	7,0
KWALIS FAS	M77	7,4	M88	7,5
Kassel CuCl ₂	M77	7,1	M88	7,5
Kassel Polyphenole	M77	7,1	M88	7,5

Tabelle 7: Codierung der Möhren für Untersuchungen über die Anbauverfahren aus dem Versuch Uni Kassel 2003, Frankenhausen (Verteilt am 29.09.03)

4 Validierung der Methoden und Ergebnisse der Vergleichsmessungen

4.1 Kupferchlorid-Kristallisation (Dr. N. Busscher, Dr. J. Kahl)

4.1.1 Beschreibung des Verfahrens

4.1.1.1 Darstellung des Gesamtprozesses

Eine wässrige Kupferchloridlösung ohne Zusätze kristallisiert auf einer preconditionierten Glasplatte in einer ungeordneten Aggregation von CuCl_2 -typischen Nadeln. Zusätze von Pflanzensäften oder -extrakten zeigen eine mehr oder weniger koordinierte Form von dendritisch angeordneten Nadelzügen. Dabei hängt das Muster von dem Mischungsverhältnis des Zusatzes und der Kupferchloridlösung und dem verwendeten Pflanzensaft oder -extrakt (z.B. Möhre, Weizen) ab. Für jeden Zusatz lassen sich die experimentellen Randbedingungen ermitteln, bei der sich das Muster zweier Proben am deutlichsten unterscheidet.

Das in einer kontrollierten Kristallisationskammer auf einer runden Glasplatte erzeugte Muster wird nicht – wie bislang üblich – nur visuell bewertet, sondern computerunterstützt ausgewertet, indem jede Platte eingescannt und anschließend in eine Graustufen-Häufigkeitsverteilung benachbarter Bildpunkte transformiert wird. Die Verteilung wird mittels statistischer Verfahren erster und zweiter Ordnung ausgewertet und liefert pro Bild 23 Werte. Diese werden in einer Linearen Diskriminanzanalyse weiter bearbeitet.

Das Verfahren der Kupferchlorid-Kristallisation kann damit als „Pattern recognition“ von Kristallisationsmustern unterschiedlicher Proben bezeichnet werden. Es erweitert das bisher als sog. „Bildschaffende Methode“ bekannte Verfahren durch die Überwachung und Kontrolle der Laborbedingungen (hier insbesondere der Kristallisation) und durch den Einsatz einer computergestützten Texturanalyse anstelle der individuellen visuellen Bildbetrachtung.

4.1.1.2 Definitionen

Folgende Definitionen liegen den Termini in diesem Bericht zu Grunde:

A. Probenahme

Probe: angeliefertes Probenmaterial

Teilprobe: zur Prüfung verwendete repräsentative Teilmenge einer Probe

B. Probenvorbereitung

Saft/Extrakt: Presssaft oder wässriger Extrakt einer (gemahlenden) Teilprobe

Kammerlösung: Mischung aus gefiltertem Saft/Extrakt und wässriger

Kupferchloridlösung in einem definierten
Mischungsverhältnis

C. Kristallisation

- Platte: Prekonditionierte Glasplatte mit befestigtem Plexiglasring (während der Verdampfung und Kristallisation), auf der in einer überwachten Kammer 6mL Kammerlösung auskristallisieren
- Muster: Rückstand nach Verdampfung und Trocknung auf der Platte
- gescannte Muster: Datenfile der gescannten Platte mit Kristallisationsmuster (Rohdaten)

D. Auswertung

- Mustererkennung: Texturanalyse (Graustufen-Häufigkeitsverteilung benachbarter Bildpunkte. Die Verteilung wird mittels verschiedener Algorithmen ausgewertet und liefert pro Bild mehrere Werte)
- Klassifizierung: Lineare Diskriminanzanalyse (LDA, die Werte der Diskriminanzfunktionen werden aus den Variablen der Texturanalyse berechnet), Missklassifizierung (%)
- Unterscheidung: Analysis Of Variance (ANOVA) ausgewählter Variablen der Texturanalyse

4.1.1.3 Probenvorbereitung

Die Proben werden - wie für analytische Methoden auch - entsprechend für die Kristallisation vorbereitet. Dabei müssen sie in Säften oder wässrige Extrakte überführt werden, die mit einer wässrigen Kupferchloridlösung vermischt und auf eine konditionierte Glasplatte (9 cm Durchmesser) pipettiert werden. Für Weizenproben wird ein wässriger Extrakt aus Weizenschrot angesetzt, für Möhrenproben wird frisch gepresster Saft verwendet. Jeder Arbeitsschritt ist als Standardarbeitsanweisung dokumentiert und die Grenzen der wichtigsten Einflussgrößen wurden innerhalb dieses Projektes festgelegt. Die Glasplatten werden definiert gereinigt. Zur Fixierung der Lösung während der Verdampfung wird ein 3,5cm hoher Plexiglasring auf dem Rand der Glasplatte aufgesetzt.

4.1.1.4 Kristallisation und Scannen

Die Kristallisation geschieht in eigens dafür konstruierten Klimakammern, deren Verdampfungseinheit erschütterungsfrei aufgebaut wird (nähere Beschreibung der Kammern bei ANDERSEN 2001). Es können 43 Platten pro Durchgang und Kammer untersucht werden. Die Klimakammer befindet sich in einem Raum (Außenkammer), dessen Klimaparameter Temperatur und Feuchte ebenfalls konstant gehalten werden. Die Klimakonditionen der Kristallisation- und der Außenkammer werden an verschiedenen Stellen kontinuierlich gemessen und online überwacht. Zwei Sensoren befinden sich über den eigentlichen Kristallisationsringen und je ein Sensor an der Innen- und Außenwand der Kristallisationskammer (siehe **Abbildungen 1 und 2**).

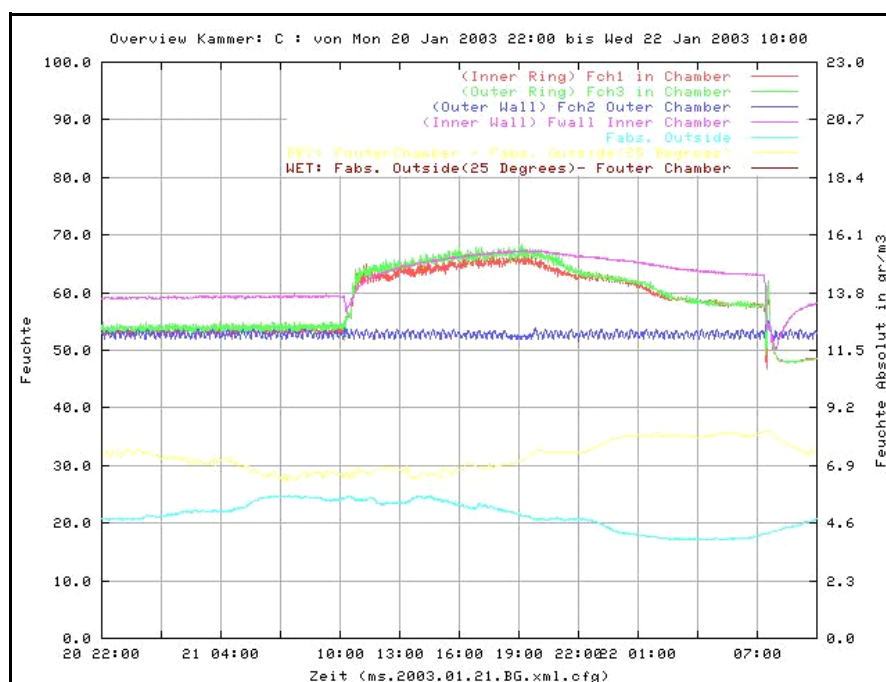


Abbildung 1: Verlauf der relativen Feuchte (%) gegen die Tageszeit in einer Kammer

Zusätzlich werden mit Hilfe einer Wetterstation die zum Zeitpunkt der Untersuchung herrschenden Wetterdaten kontinuierlich aufgezeichnet. Die Dokumentation der jeweiligen Prozessschritte und die Erfassung der Bedingungen während der Probensequenz werden computerunterstützt erfasst und erlauben eine kontinuierliche Rückverfolgbarkeit.

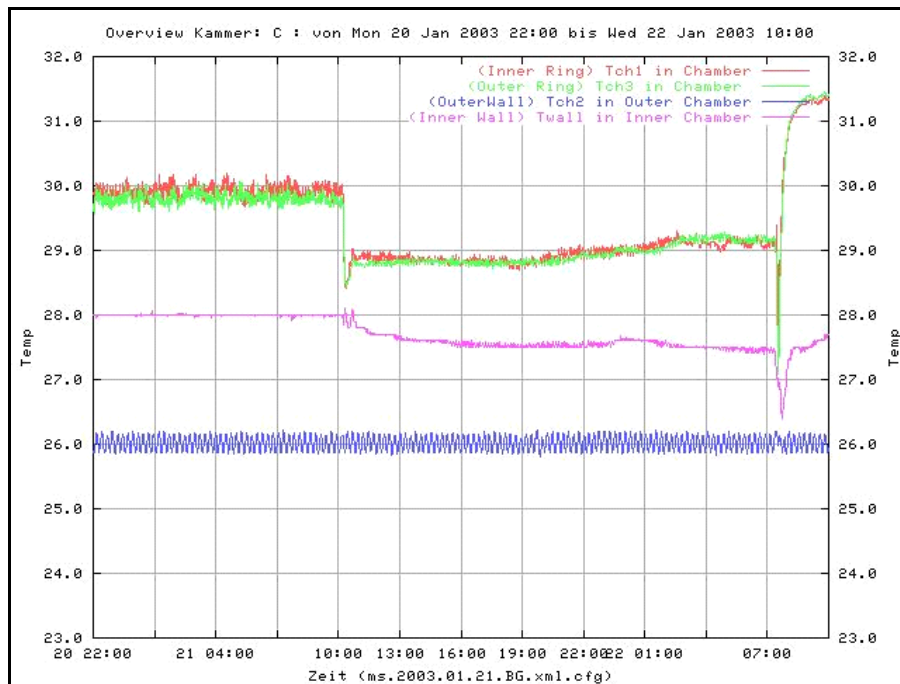


Abbildung 2: Verlauf der Temperatur (°C) gegen die Tageszeit in einer Kammer

In Abbildung 1 ist der Verlauf der relativen Feuchte auf dem Ring und an der Innenseite und Außenseite der Kammerwand dargestellt. Die relative Feuchte auf dem Ring steigt an, wenn die Platten unter dem Sensor platziert sind und die Verdampfung beginnt, während der Feuchte in der Aussenkammer konstant gehalten wird. Entsprechend sinkt die Temperatur auf dem Ring, da sich zwischen Wärmequelle und Sensor die Platte befindet (Abbildung 2).

4.1.1.5 Texturanalyse

Das in einer kontrollierten Kristallisationskammer auf einer runden Glasplatte erzeugte Muster einer Platte wird eingescannt und anschließend in eine Graustufen-Häufigkeitsverteilung benachbarter Bildpunkte (Greylevel Coocurrence Matrix, GLCM) transformiert. Das Ergebnis hat als Schwerpunkt eine Diagonale (s. Abbildung 4), da helle Punkte meistens helle Nachbarn und dunkle Punkte dunkle Nachbarn haben. Die GLCM wird mittels verschiedener Algorithmen ausgewertet und liefert pro Bild 23 Werte.

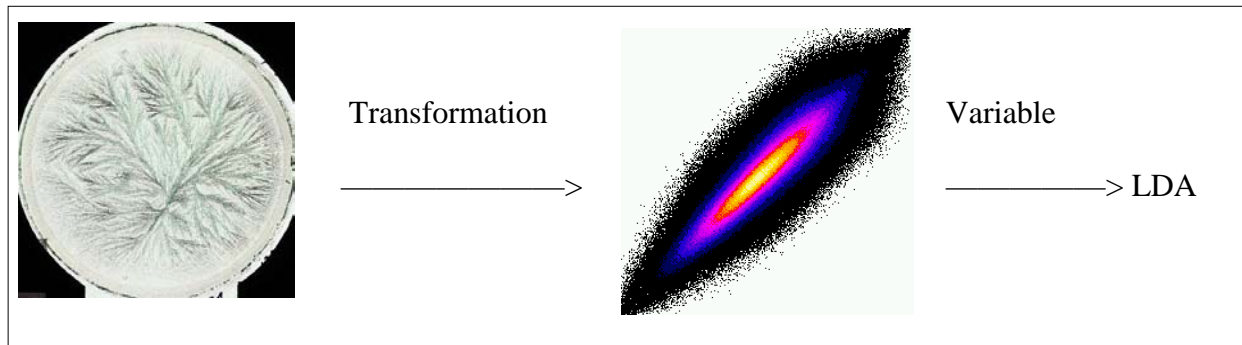


Abbildung 3: Von der Platte zur Variable der Texturanalyse

Mit diesen Variablen können Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet werden. Dabei werden nur die Variablen weiter behandelt,

- die normalverteilt sind,
- deren Varianzen homogen sind.

Für eine Variable, die mit der schrittweisen Linearen Diskriminanzanalyse für die Proben ermittelt wurde, wurde die Methode untersucht, d.h. die systematische Untersuchung der Einflussgrößen durchgeführt und ausgewählte Verfahrenskenngrößen ermittelt. Die Weizenproben wurden mit der Variable „inverse different moment“ bei einem Bilddurchmesser von 100% (ROI), Möhrenproben mit der Variable „inertia“ bei einem Bilddurchmesser von 70% (ROI) ausgewertet. Die Ermittlung des Trennungsvermögens der codierten Proben wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit diesen ausgewählten Variablen aus einer mehrfachen Wiederholung der Probenvorbereitung und Kristallisation ($n > 4$) in zwei baugleichen Kammern an der Universität Kassel parallel und über mehrere Tage durchgeführt.

4.1.1.6 Lineare Diskriminanzanalyse

Die Lineare Diskriminanzanalyse ist ein Klassifizierungsverfahren mit bekannten Gruppen. Sie ist als besonders robustes und schnelles Verfahren bekannt. Sie wird in diesem Projekt für die Gruppierung als deskriptive Diskriminanzanalyse benutzt. Unter der Voraussetzung der Normalverteilung, der Homogenität der Varianzen und der Kovarianzen (box-M-Test). Für die Klassifizierung der Vergleichsproben wurde für jedes Jahr und jeden Standort ein Modell mit der bestmöglichen Trennung der Proben ermittelt. Das Ergebnis ist die optimale Trennung der Probenklassen bei Verringerung der Streuung innerhalb einer Klasse. Die Methode der Kupferchlorid-Kristallisation ist ein mehrdimensionales Verfahren insofern, als sich verschiedene Einflüsse auf die Probe in Veränderung der Kristallmustern äußern. Daher wird erwartet, dass sich auch der Response der verschiedenen Variablen unterschiedlich zeigt, d.h. Variablen die z.B.

Anbauverfahren unterscheiden, müssen nicht gleichzeitig auch Verarbeitungsprozesse unterscheiden können. Da bisher definiertes Probenmaterial zu dieser Fragestellung noch nicht in ausreichender Menge vorliegt, wird eine spezifische Zuordnung der einzelnen Variablen zu bestimmten Einflüssen (Anbau, Sorte etc.) noch nicht abschließend diskutiert. Das Ergebnis der LDA ist die prozentuale Missklassifikation einzelner Datenpunkte zu der vorgebenen Klasse. Missklassifikationsraten von Daten, die bei herkömmlichen Tests (z.B. Wilcoxon oder t-Test) signifikante Unterschiede zeigen, können sehr groß werden und an die 50 % heranreichen.

4.1.2 Stand der Methoden zu Projektbeginn

Die Aufgabe des vorliegenden Projektes ist es, zu zeigen, ob es möglich ist, Weizen- bzw. Möhrenproben aus unterschiedlichen Anbauverfahren mit der Methode der Kupferchlorid-Kristallisation zu differenzieren. Seit Mitte der achtziger Jahre wächst das Interesse an dieser komplementären Methode für die Bewertung von Lebensmittelqualität. Zu ihnen gehören die Kupferchloridkristallisation, die Steigbildmethode und die Rundfilter-Chromatographie (MEIER-PLOEGER und VOGTMANN (Hg) 1991; SOIL ASSOC. (Hg) 2001; WEIBEL et al. 2001).

Die Methode der Kupferchlorid-Kristallisation wurde bislang in einer Reihe von Vergleichstudien unterschiedlicher Anbaumethoden eingesetzt. Trotz der bisher ausschließlich visuellen Auswertung, konnte die Methode durch geschulte Personen Produkte aus ökologischem und konventionellem Anbau differenzieren (PETTERSON 1970, SCHUDEL et.al. 1980, MÄDER et al. 1993, WOESE et al. 1995, BALZER-GRAF 1996, RAUPP 1996, ALFÖLDI et al. 2001). Auch für Untersuchungen des Einflusses von Lichtintensität auf das Pflanzenwachstum bei unterschiedlichem Anbau (ENGQUIST 1963) sowie zur Überprüfung des Lagerverhaltens (ENGQUIST 1961, SELWARY 1975) und der thermischen Behandlung bei Milch (MERTEN et al. 1959, BALZER-GRAF und BALZER 1991b) konnten mit der Methode Proben charakterisiert werden (s. auch BALZER-GRAF 2001b).

Obwohl die Bedeutung der Methoden bei der Bewertung ökologischer Lebensmittel stark zugenommen hat, gibt es nur wenige rein methodische Arbeiten (ALFÖLDI et.al. 2001). Grundlagenarbeiten über die Selektivität, Reproduzierbarkeit oder Präzision der Methoden fehlen. Mit den Arbeiten von ANDERSEN (ANDERSEN et al. 1998, ANDERSEN et al. 2001) sind erste Schritte in die Richtung einer statistischen Auswertung der Muster auf Grundlage einer computergestützten Bildauswertung unternommen worden und die Randbedingungen der Kristallisation in Klimakammern wurden untersucht (ANDERSEN 2001).

4.1.3 Vorbereitung

4.1.3.1 Anpassung der computergestützten Auswertungsmethode an die Fragestellung

4.1.3.1.1 Anpassung der vorhandenen Software *LabDoc* und *acia*

Die bereits zu Projektbeginn vorhandene Software für die Labordokumentation und die Auswertung der Texturanalyse wurden für die Validierung entsprechend der Fragestellung angepasst, optimiert und im Fachgebiet des Antragstellers an der Universität implementiert.

4.1.3.1.2 Varianzanalyse

Jeder Datensatz für die Varianzanalyse wird auf folgende Voraussetzungen geprüft:

- Normalverteilung mit Shapiro-Wilk-Test,
- Homogenität der Varianzen mit Bartlett-Test.

Die Variananalyse wird mit dem Programmpaket „R“ durchgeführt.

4.1.3.1.3 Diskriminanzanalyse

Mittels einer schrittweisen Diskriminanzanalyse (Programm JMP, SAS) wurden zunächst die Variablen der Texturanalyse mit der höchsten Ladung in den Diskriminanzfunktionen ermittelt (Modellbildung). Anschließend wurde das Modell auf unterschiedliche Datensätze getestet. Ein Datensatz wurde sowohl mit dem Programmpaket „R“ als auch mit JMP, SAS mit der LDA berechnet. Die Ergebnisse, die durch zwei unterschiedliche Programme gerechnet wurden, waren gleich.

4.1.3.2 Vorversuche: Mischungsverhältnisse

Als wichtige Kenngröße wurde das optimale Mischungsverhältnis von Kupferchloridlösung und Probenlösung überprüft und in Abhängigkeit des Probenmaterials festgelegt. Dieser Prozess kann wie folgt beschrieben werden: Es wurden zunächst verschiedene Matrices (Ausschnitt s. Abbildung 4) mit der Variation der Mischungsverhältnisse angefertigt, um die Veränderung der Bildstruktur visuell zu verfolgen. Das Ziel war es, für Weizen- und Möhrenproben die aus der Literatur bekannten und für die Methode der visuellen Auswertung verwendeten Mischungsverhältnisse zu reproduzieren und sie als Ausgang für die in diesem Projekt eingesetzte computergestützte Bildauswertung zu nehmen. Es wurden sowohl "Vektoren" bei gleicher Probenmenge und variiertes Kupferchloridmenge (y-Achse) pro Platte angefertigt als auch "Diagonalvektoren" (x,y) und "Vektoren" bei konstanter Kupferchloridmenge und steigender Probenmenge (x-Achse). Im nächsten Schritt wurden daher ausgewählte Vektoren der Matrix für Weizen- und Möhrenproben mit der Texturanalyse untersucht und die Ergebnisse gegen die Probenmenge aufgetragen. Dies wurde für Proben verschiedener Kulturverfahren wiederholt, um das Mischungsverhältnis zu ermitteln, bei der das Trennungsvermögen am größten ist. Die Mengenangaben beziehen sich auf die pro Platte kalkulierte Einwaage an Kupferchloridsalz. Für Weizenproben wird die in die Extraktion eingehende Menge an Weizenschrot bestimmt und der Anteil filtrierter Extraktlösung am Gesamtvolumen auf der Platte kalkuliert. Für Möhrenproben ist es der Volumenanteil Presssaft.

4.1.3.2.1 Mischungsverhältnis Weizen

Für die Ermittlung des Mischungsverhältnis von Weizenproben wurde mit den Proben vom DOK-Versuch gearbeitet, da die Fragestellung zur Validierung die Unterscheidung der unterschiedlichen Kulturverfahren beinhaltet.

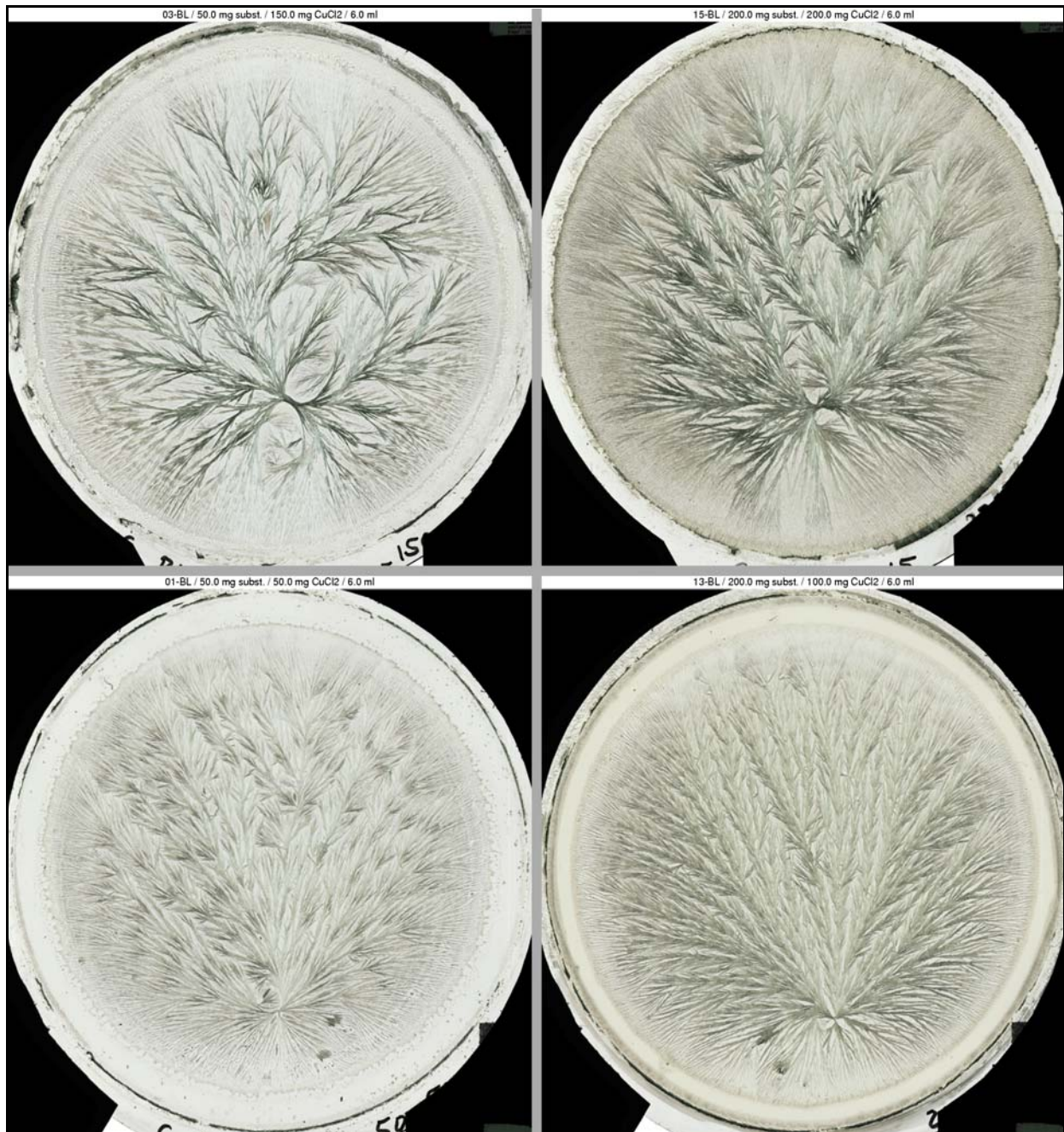


Abbildung 4: Muster einer Weizenprobe mit gleicher Probenmenge und unterschiedlichen Mengen an Kupferchlorid pro Platte

Abbildung 4 zeigt links oben das Muster einer Platte mit geringer Probenmenge und hoher Menge an Kupferchlorid; links unten mit geringer Menge an Probe und Kupferchlorid. Rechts oben sind hohe Mengen an Probe und Kupferchlorid und rechts unten hohe Mengen an Probe und geringe Mengen an Kupferchlorid zu sehen. Die Veränderung der Muster bei Variierung der Menge an Probe und Kupferchlorid ist deutlich. Bei weiterer Erhöhung der Probenmenge verschwinden die differenzierten Strukturen zu einfachen Mustern, wenn die Kupferchloridmenge gleich bleibt; es entstehen stark von einander getrennte Zonen, wenn die Menge an Kupferchlorid weiter steigt. In beiden Fällen ist eine Differenzierung von verschiedenen Proben nach visuellen Kriterien nicht

mehr möglich.

Bei Voruntersuchungen für die Weizenproben aus der Ernte 2003 (und andere Sorte als 2002) zeigte sich, dass bereits bei geringeren (ca. 30%) Probenmengen das für die visuelle Auswertung optimale Bild innerhalb der Matrix erreicht werden konnte. Für die visuelle Bildauswertung wurde die Trennung mittels dieses neuen Mischungsverhältnisses vorgenommen. Hier wurde untersucht, ob die Veränderung der Probenmenge bei gleicher Menge an Kupferchlorid pro Platte auch eine Verbesserung der Trennung in der computergestützte Bildauswertung bedeutet. Bei verminderter Probenmenge kann die Lineare Diskriminanzanalyse nicht mehr alle fünf Qualitäten trennen, die Nullvariante und die Probe aus integriertem Anbau fallen zusammen. In der Abbildung 5 sind für alle fünf Varianten des DOK-Versuches, Ernte 2003 die LD2 gegen LD1 für ein Mischungsverhältnis von 70 zu 90 und 90 zu 90 aufgetragen.

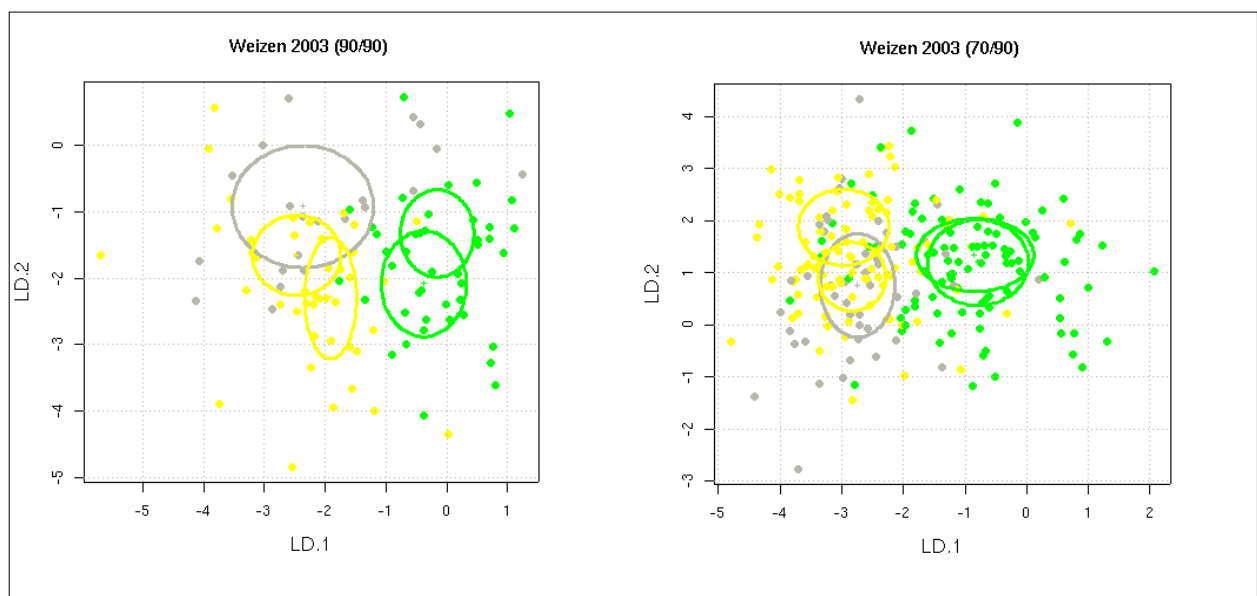


Abbildung 5: Ergebnis der Linearen Diskriminanzanalyse für die Vergleichsmessung Ernte 2003 mit zwei verschiedenen Mischungsverhältnissen (Kontrolle: grau, öko: grün, konv. gelb)

4.1.3.2.2 Mischungsverhältnis Möhren

Die Matrices für Möhrenproben zeigen ein ähnliches Verhalten wie die der Weizenproben und werden daher nicht gesondert behandelt. In Abbildung 6 ist die Variable interia für zwei verschiedene FIBL-Möhrenproben (rot und blau) aus 2002 gegen die steigende Menge an Kupferchlorid (45-90-135-180) bei gleicher Probenmenge (115) aufgetragen.

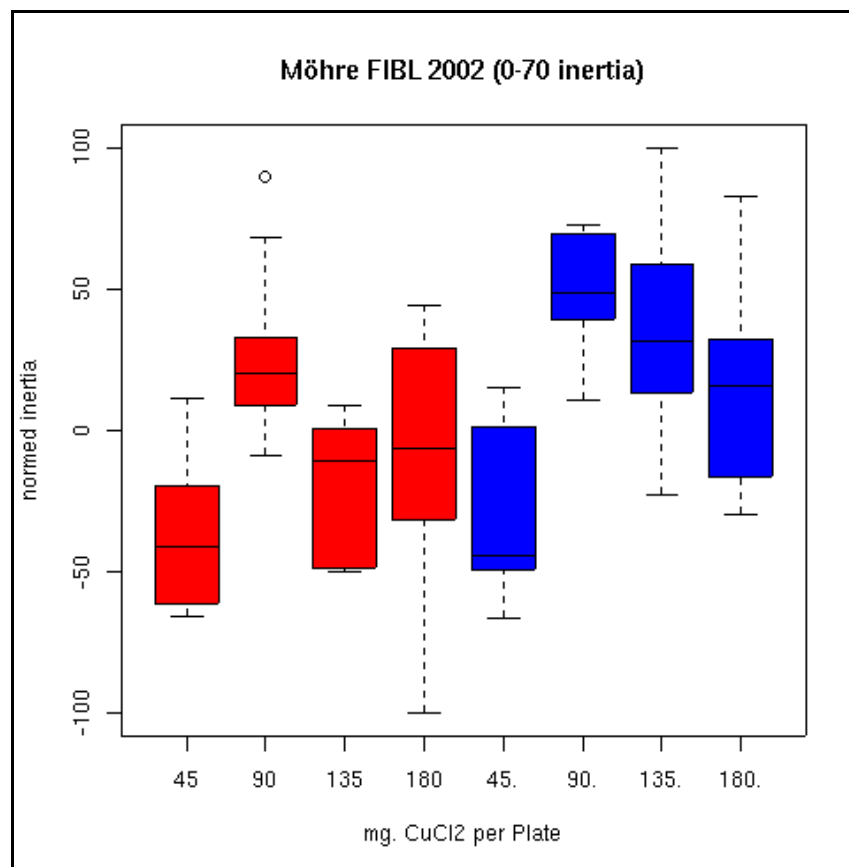


Abbildung 6: Variable *inertia* für zwei verschiedene Möhrenproben

Der in Abbildung 6 gezeigte Verlauf ist für beide Proben insofern vergleichbar, als der Unterschied zwischen 45mg Kupferchlorid pro Platte und 90mg wesentlich größer ist als zwischen 90, 135 und 180mg pro Platte. Das für die Bestimmungen in diesem Projekt gewählte Mischungsverhältnis liegt offenbar in einer stabilen Lage, wohingegen eine Verringerung der Kupferchloridmenge erheblich mehr das Ergebnis beeinflusst als eine Erhöhung.

Auch für Möhrenproben konnte mit den ersten Vergleichsproben das optimale Mischungsverhältnis ermittelt werden, allerdings ist der Unterschied der Matrices der Proben Universität Kassel, Domäne Frankenhausen aus den beiden Vergleichsmessungen erheblich größer als für die Weizenproben. Während für alle anderen Möhrenproben (Sortenversuch FIBL, Handel) der Ernte 2002 und 2003 mit einem Mischungsverhältnis vom 115 zu 90 gearbeitet werden konnte, zeigte sich, daß das bei diesem Verhältnis auftretende Strukturmuster für die Möhren Universität Kassel aus 2003 bereits bei einer um das 2,5fach verringerte Probenmenge auftrat. Daher wurde für die Differenzierung der Proben aus der Ernte 2003 mit einem Mischungsverhältnis 45 zu 90 gearbeitet.

4.1.3.2.3 Kammerstandard

4.1.3.2.3.1 Tests zur Eignung verschiedener Materialien als Kammerstandard

Da in der Kristallisationskammer 43 Platten gleichzeitig kristallisieren können, kann eine Standardlösung für die Messung der Bedingungen eingesetzt werden. Damit soll auch die Einführung einer Regelkarte möglich werden. In Vorversuchen wurden verschiedene chemische Substanzen (Glycogen, Polyvinylpyrrolidon/PVP) und gefriergetrocknete Möhren- und Weizenproben auf ihre Eignung als Standard getestet (Matrix, Verdampfungs- und Kristallisationszeiten). Dabei wurden folgende Anforderungen an den Standard gestellt:

1. Stabilität über einen längeren Zeitraum (Monate) oder gleichmäßige Verfügbarkeit,
2. ein mit Weizen- und Möhrenproben vergleichbares Kristallisationsverhalten,
3. ein mit Weizen- und Möhrenproben vergleichbares Muster.

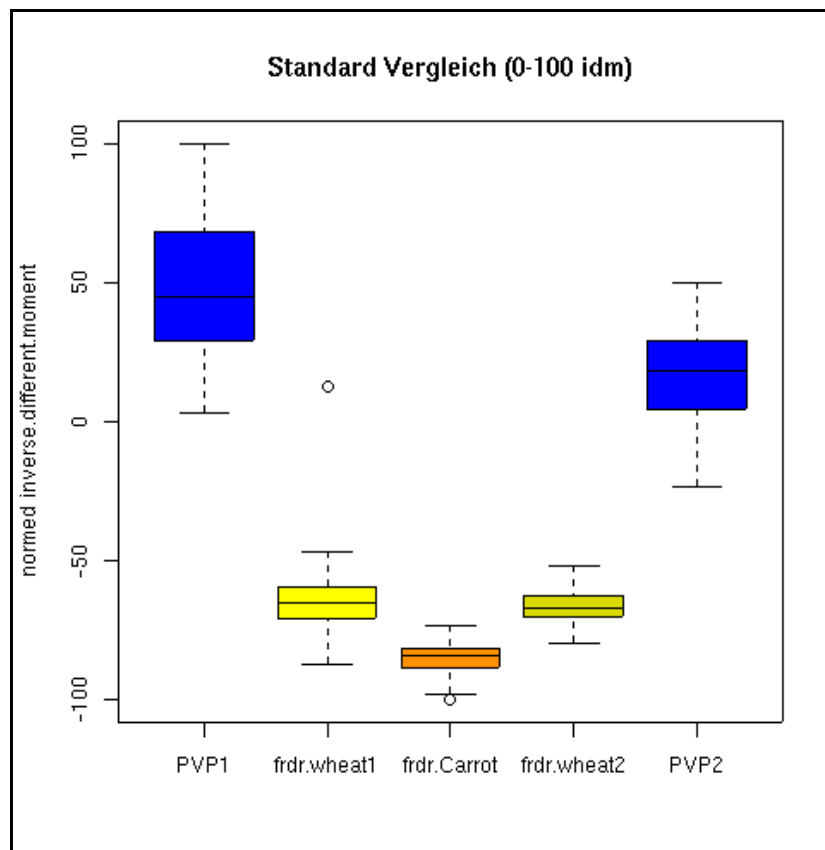


Abbildung 7 Variable *inverse different moment* (ROI 100%) verschiedener Substanzen (2 PVP, verschiedene Lieferungen; 2 verschiedene gefriergetrocknete Weizenproben, eine gefriergetrocknete Möhrenprobe)

Als bester Standard erwies sich eine gefriergetrocknete Weizenschrotprobe, die in definierten Portionen bei minus 18°C gelagert werden kann, die geringste Streuung zeigte und ein vergleichbares Weizenmuster lieferte. Für jeden Kammerdurchgang werden 6 Platten mit der

Standardlösung kristallisiert. Damit ist es möglich, eine Regelkarte für die Methode einzuführen. Abbildung 7 zeigt das Ergebnis der Texturanalyse für die verschiedenen Substanzen PVP, eine gefriergetrocknete Möhre und zwei gefriergetrocknete Weizenproben.

4.1.3.2.4 Probenvorbereitung

Für die Probenvorbereitung wurde mit Methoden, die in Laboratorien am Louis Bolk Instituut, Holland und in der Biodynamic Research Association, Dänemark bereits angewendet werden, begonnen. Diese Methoden wurden für die vorliegende Fragestellung angepasst und die wichtigsten Einflussgrößen untersucht. Für Möhre ist dies die Entsaftung, für Weizen die Vermahlung. Nach Durchführung der Vorversuche wurde die Methode festgelegt und dokumentiert und einzelne Schritte auf ihren Einfluss auf das Gesamtverfahren weiter getestet.

4.1.3.2.4.1 Probenvorbereitung Möhre Entsafter

Zur Bestimmung des Einflusses unterschiedlicher Entsafter wurden folgende Verfahren an einer Möhrenprobe getestet, um zu sehen, welche Methode überhaupt für Möhrenproben charakteristische Muster liefert:

1. Entsaften mit einer Handpresse (bisheriges Verfahren),
2. Entsafter Champion, Fa. Keimling, 1.400 U/min,
3. Entsafter Green star™ 3000, Fa. Keimling, 110 U/min.

Es zeigte sich, dass alle drei Entsaftungsmethoden visuell vergleichbare Ergebnisse lieferten. Es wurde daher die Methode GreenStar™ 3000 ausgewählt, da hier die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Personen als kongruenter gegenüber der Handpresse eingeschätzt wurde. Um die Probe möglichst schonend zu verarbeiten, wurde die Methode GreenStar™ 3000 der Methode Champion vorgezogen, da bei Champion im Vergleich zum GreenStar die sehr hohe Umdrehungen sowohl die Temperatur des Probengutes als auch den Sauerstoffeintrag erhöhen.

4.1.3.2.4.2 Probenvorbereitung Weizen Vermahlung (Mühle und Mahlgut)

Im Vergleich verschiedener handelsüblicher Mühlen, wie sie bisher für die Methode verwendet wurden, zeigte sich eine große Streuung des Vermahlungsgrades in Abhängigkeit von dem Mühlentyp, der nicht reproduzierbar eingestellt werden konnte. Vorversuche ergaben eine erhebliche Abhängigkeit des Ergebnisses der Kupferchlorid-Kristallisation vom Vermahlungsgrad. Damit auch Vergleiche zwischen verschiedenen Laboratorien möglich sind, wurde für die Fragestellung des Projektes die Haushaltsmühle durch eine standardisierte Labormühle (Retsch

ZMP 100) ersetzt und die Prozedur des Mahlvorgangs detailliert beschrieben und festgelegt.

Als nächster Schritt wurde der Einfluss der Siebgröße beim Vermahlungsvorgang auf das Ergebnis getestet. Da sich bei der Verwendung des 0,5 mm Siebes das Mahlgut deutlich mehr erwärmte als bei dem 1,0 mm Sieb, wurde letzteres für die Methode der hier zu behandelnden Fragestellung eingesetzt.

4.1.4 Validierung

In diesem Projekt soll geprüft werden, ob das Verfahren der Kupferchlorid-Kristallisation für die Trennung und Gruppierung von Weizen- und Möhrenproben aus unterschiedlichen Anbaubedingungen geeignet ist. Das Projekt dient der Validierung des Gesamtverfahrens, d.h. sowohl der messtechnischen Seite (Kristallisation, Scannen, Datenverarbeitung) als auch der Probenvorbereitung der vorliegenden Lebensmittel. Damit lässt sich die folgende Validierungsfrage definieren:

Ist das Verfahren der Kupferchlorid-Kristallisation zum Nachweis der Differenzierung von Proben aus unterschiedlichen Kulturbedingungen (Anbau, Sorte) geeignet?

Dabei soll das Verfahren für die Beantwortung der Frage ausreichend präzise arbeiten.

Die Validierung wurde sowohl für Weizen- als auch für Möhrenproben durchgeführt. Alle Versuche wurden mit je einer Variablen der Texturanalyse ausgewertet, die

- durch die schrittweise Lineare Diskriminanzanalyse ermittelt wurde,
- die in 4.2.1.1.3 genannten Voraussetzungen erfüllt,
- Proben unterschiedlicher Kulturbedingungen signifikant bei größtmöglichen Streubedingungen trennt.

Für Weizen ist dies *inverse different moment* für Möhrenproben *inertia*. Die Versuche wurden bis auf wenige, im Text genannten, Ausnahmen mit den codierten Proben der Vergleichsmessungen durchgeführt.

Bei der Methode kann die Richtigkeit nicht überprüft werden, da keine Referenzmaterialien zur Methode vorliegen. Da außerdem nicht mit einer metrischen Skalierung gearbeitet wird, ist es nicht sinnvoll den Variationskoeffizient (V_k) zu berechnen.

4.1.4.1 Systematische Beurteilung der Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen können

Es wird im Validierungsverfahren der Kupferchlorid-Kristallisation unterschieden in Einflüsse die durch Probenvorbereitung, die Kristallisationskammer und das Scannen der Platten verursacht werden.

4.1.4.1.1 Eigenschaften der Kristallisationskammer und des Scanners

Das Laboratorium verfügt über zwei baugleiche Kristallisationskammern (s. Abbildung 8) in zwei unabhängigen Räumen mit gleicher Klimaregelung, die für jeden Versuch parallel mit den gleichen

Lösungen aus der Probenvorbereitung bestückt werden können. Es wurde für die in diesem Projekt durchgeführten Versuche mit beiden Kammern gleichzeitig gearbeitet. Unter der Voraussetzung, dass die Unterschiede zwischen den Kammern innerhalb der Präzision einer Kammer liegen, können die Platten aus beiden Kammern als Kammerwiederholung zusammengefasst werden. Für die gesamte Projektlaufzeit wurde mit demselben Scanner (PowerLook III, UMAX) im Durchlichtverfahren gearbeitet.

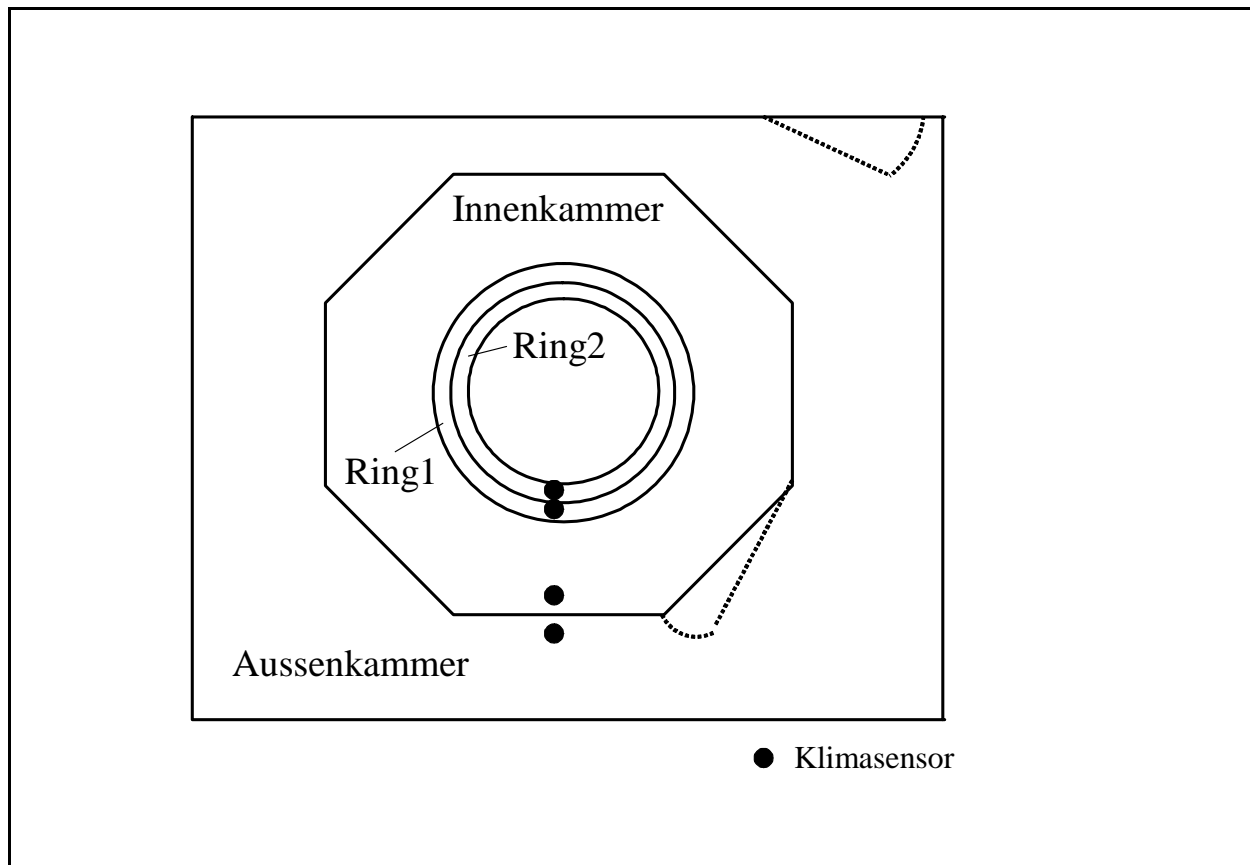


Abbildung 8: Schematischer Aufbau der Klimakammern

4.1.4.1.1.1 Zu erwartende Einflussgrößen auf die Messpräzision

1. Schwankungen der Außenkammerfeuchte, die zu Schwankungen der Startfeuchte auf dem Innenring der Kammer und damit zu Schwankungen der Verdampfungsdauer der Platten führen kann. Dementsprechend wird die Außenkammerfeuchte auf 0,5% rF und die Außenkammertemperatur auf 0,1 °C kontrolliert. Selbst bei extremen klimatischen Bedingungen, wie sie im Sommer 2003 vorkamen, kann das Klima der Außenkammer konstant gehalten werden.

2. Schwankungen der Temperatur auf dem Innenring, der Kammer, die zu Schwankungen der Verdampfungsdauer der Platten führen kann. Dementsprechend wird die Temperatur auf dem Innenring ebenfalls kontrolliert und kontinuierlich gemessen. Daher sind diese Schwankungen zu vernachlässigen.
3. Temperaturdifferenzen zwischen innerem und äußeren Ring in der Kammer. Dies kann zu systematischen Fehlern führen. Beide Ringe werden kontinuierlich kontrolliert und abgeglichen. Die Verdampfungszeiten werden für jeden Platz der Platten auf jedem der Ringe kontinuierlich ermittelt. Diese Schwankungen können daher vernachlässigt werden.
4. Die Platten mit Lösungen kristallisieren nicht gleichzeitig. Die Kristallisation beginnt ca. 12 h nach dem Pipettieren der Lösungen, wobei der Kristallisationsbeginn zwischen der ersten und der letzten Platte zwischen 2-6 h variiert. Die mittlere Verdampfungszeit kann durch Einstellung der Außenkammerfeuchte und damit Veränderung der Feuchte auf dem Ring mit den Platten eingestellt werden. Die statistisch zufälligen Schwankungen sind nicht zu kontrollieren. Daher muss für jede Platte die Verdampfungszeit und die Kristallisationszeit bestimmt werden.
5. Die Platten werden zwischen Kristallisation und dem Scannen in der Außenkammer und damit bei gleichen und kontrollierten Bedingungen gelagert. Dabei darf die relative Feuchte 60 % nicht übersteigen, da ansonsten das Muster verändert wird.
6. Die Platten werden beim Scannen nach dem Kristallisationszentrum ausgerichtet. Dabei kann es zu gerätebedingten Schwankungen der Farbsättigung kommen, die mit einem bei jedem Mal mitlaufenden Referenzdia erfasst werden können. Die leichte Verschiebung des Kristallisationszentrums von der Mittelachse beim Auflegen auf den Scanner kann ebenfalls zu Schwankungen führen. Daher werden alle Platten gespeichert und mögliche Abweichungen können damit zugeordnet werden.

4.1.4.1.1.2 Untersuchungen der Einflussgrößen

4.1.4.1.1.2.1 Außenfeuchte Kammer und Verdampfungszeiten

Bis vor einigen Jahren wurden für die Methode Kammern ohne kontinuierliche Überwachung der klimatischen Bedingungen eingesetzt. In eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Startfeuchte auf dem Ring in der Kammer auf denen die Probenlösungen liegen, in direkter Verbindung mit der Außenfeuchte steht. Die mittlere Verdampfungsdauer wird direkt von der Startfeuchte auf dem Ring beeinflusst. Mit Startfeuchte ist die bei Verdampfungsbeginn herrschende Feuchte auf dem Ring definiert. Die mittlere Verdampfungszeit ist die Zeit, bei der 50 % der Bilder beider Ringe einer Kammer mit der Kristallisation begonnen haben.

Bereits mit der visuellen Auswertung können Platten verschiedener Verdampfungszeit bei verschiedenen Startfeuchten anhand des unterschiedlichen Strukturdurchmessers unterschieden werden. Geringere Startfeuchte verringert den Durchmesser, höhere vergrößern ihn. Die Startfeuchte beeinflusst nicht nur den Beginn der Kristallisation der ersten Platte, sondern auch die Zeit zwischen dem Kristallisationsbeginn der ersten und der letzten Platte (Steigung der Kurve). Im Regelfall kann die relative Feuchte in der Aussenkammer und damit die Startfeuchte innerhalb der zufälligen statistischen Schwankungen der Verdampfungszeiten gehalten werden. Bei einem Ausfall der Klimaregelung kann ein Ergebnis nicht mehr akzeptiert werden.

Der Beginn der Kristallisation der 43 Platten einer Kammer zeigt eine statistische Verteilung. Keine Platte innerhalb der beiden Ringe wird dabei bevorzugt. Dieses Phänomen wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben, ebenso wie eine Dokumentation der Kristallisationszeiten einzelner Platten und deren Berücksichtigung bei der Beurteilung der Kristallisationsbilder. Nachdem zunächst eine Person die Verdampfungszeiten für jede Platte während des Prozesses manuell dokumentierte, wurden zur kontinuierlichen Bestimmung der Zeiten Digitalkameras eingesetzt, die alle 10min ein Bild der Platten auf dem Ring aufnehmen. So kann für jeden Platz die Verdampfungszeit bestimmt und mit der Prozessdokumentation verbunden werden. Abbildung 9 zeigt beispielhaft die statistische Verteilung der Verdampfungszeiten für gleiche Proben bei 49 % (oben) und 54 % rF (unten) auf dem Ring. Auf der y2-Achse ist die kumulative Anzahl der bereits mit der Kristallisation begonnen Platten aufgetragen, auf der x-Achse die Zeit nach dem Pipettieren der Lösung. In wieweit die Verdampfungszeit Einfluss auf das Ergebnis der Texturanalyse hat soll in einem weiteren Projekt untersucht werden.

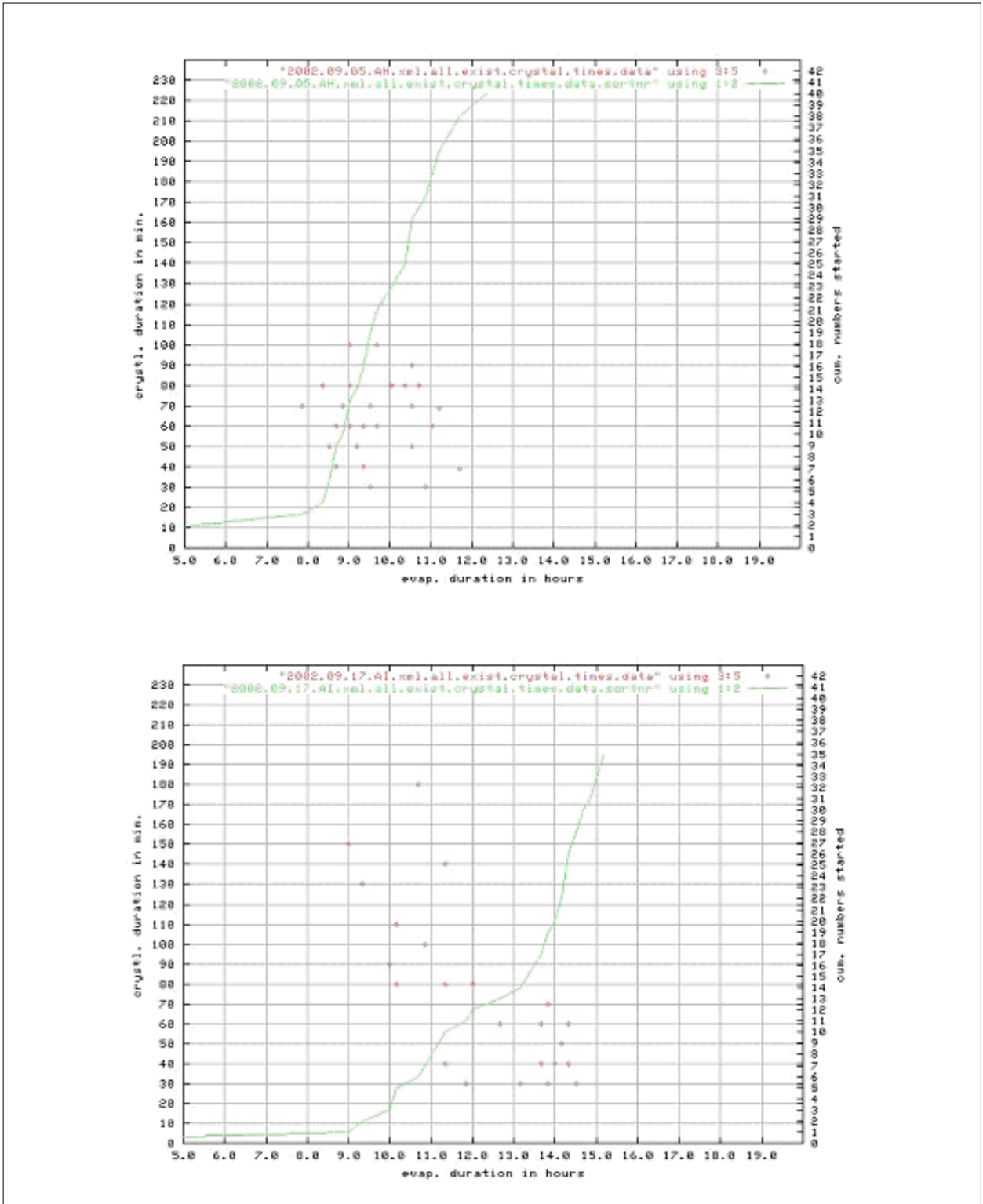


Abbildung 9: Einfluss der Kammerfeuchte auf den Kristallisationsvorgang (y1: Kristallisationsdauer in min, y2: Anzahl der mit der Kristallisation begonnenen Plätze, x: Zeit nach Pipettieren in h)

In Abbildung 9 ist neben der Verteilung der Verdampfungszeiten die Abhängigkeit der Kristallisationsdauer (d.h. vom Beginn der Kristallisation bis mehr als 90 % der Platte kristallisiert ist), gegen die Zeit nach dem Pipettieren der Lösungen für eine Kammer aufgetragen (y1-Achse).

Hier zeigt sich, dass je später eine Platte mit der Kristallisation beginnt, desto kürzer ist die Kristallisationsdauer. Die Kristallisationszeiten werden ebenfalls kontinuierlich für jeden Platz auf dem Ring bestimmt.

4.1.4.1.1.2.2 Scannen

Es wurde untersucht, welchen Einfluss die gerätebedingten Schwankungen auf die Präzision der Ergebnisse hat, indem Platten von Weizen- und Möhrenproben in vierfacher Wiederholung eingescannt wurden. Darüber hinaus wurde geprüft, welche Schwankungen sich durch Verschieben der Bildachse um mehr als 90° ergeben. Es wurden jeweils Platten von Weizen- und Möhrenproben bei verschiedenen Winkeln der Musterachse (0, 90, 180 und 270°) in vierfacher Wiederholung eingescannt. In Abbildung 10 ist der Wert für die Variable *inverse different moment* (ROI 100 %) eines Weizenmusters einer Platte gegen den Winkel relativ zur Symmetrieachse des Musters 0, 90, 180 und 270° der Kristallisation aufgetragen (n>4).

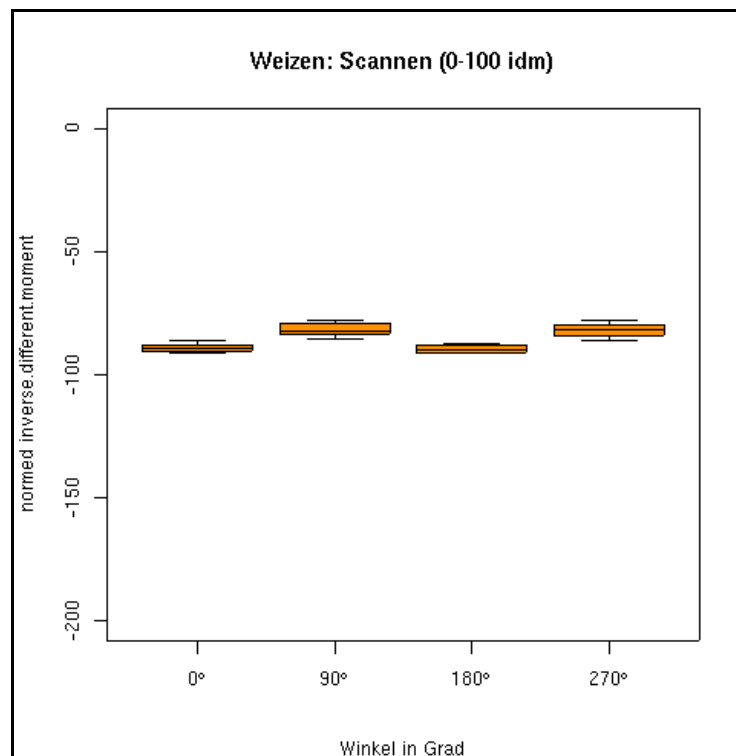


Abbildung 10 Einfluss des Scanvorgangs auf ein Weizenmuster, ROI=100%

In Abbildung 11 ist der Wert für die Variable *interia* (ROI 70 %) eines Möhrenmusters einer Platte gegen den Winkel relativ zur Symmetrieachse des Musters 0, 90, 180 und 270° der Kristallisation aufgetragen (n>4).

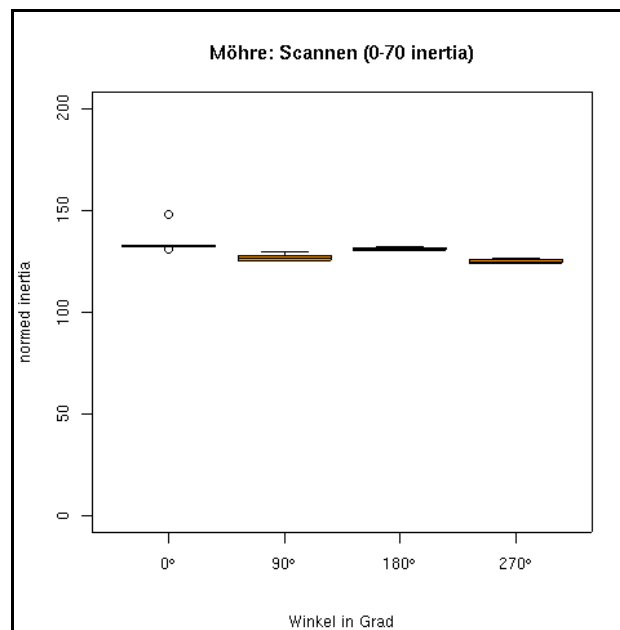


Abbildung 11 Einfluss des Scanvorgangs auf ein Möhrenmuster, ROI=70%

Die Schwankungen durch die Wiederholungen des Scannvorgangs liegen unterhalb der Schwankungen, die durch die Kammer hervorgerufen werden. Dies gilt nicht für die Drehung des Winkels der Musterachse eines Bildes. Bei geschultem Personal zum Einscannen der Bilder konnte eine solche Verschiebung aber bisher als unwahrscheinlich angenommen werden, da die Beschriftung der Platten achsenorientiert vorgenommen wird. Darüber hinaus wurde während der Untersuchung die Texturanalyse dahingehend optimiert, dass sie unempfindlicher gegen die Position der Platte auf dem Scanner ist.

4.1.4.1.1.2.3 Acia-Parameter

Bei der Auswertung der eingescannten Platten mittels computergestützter Texturanalyse (s.o.) lassen sich folgende Parameter für die Bildverarbeitung verändern:

1. Auswahl des Bildanteils, der mit der Texturanalyse untersucht werden kann: ROI (region of interest),
2. Normierung der Daten,
3. Farbe.

Für ausgewählte Serien wurden die Parameter variiert und der Einfluss auf das Ergebnis bestimmt. Dabei ließen sich die hinsichtlich der Validierungsfrage optimalen Parameter ermitteln.

ROI : Für die ökologische (bio-dyn.) und konventionelle (IP) Weizenproben des DOK-Versuches (Ernte 2002) wurden für die ausgewählten Variablen verschiedene ROIs getestet. Die beste konsistente Trennung wurde mit einem ROI von 100% der Platte erreicht. Für Möhrenproben (Universität Kassel 2002) wurde der beste ROI bei 70% gefunden.

Normierung: Die beste konsistente Trennung wurde für Weizenproben mit einer Gauß-Normierung der Daten bei festgelegtem ROI erreicht, für Möhren mit einer parabolischen Normierung.

Farbe: Die Untersuchungen bei verschiedenen Farbmischungen ergaben die beste Trennung bei der Mischung gleicher Rot-Gelb-Blau-Anteile.

4.1.4.1.1.3 Messpräzision

4.1.4.1.1.3.1 Wiederholpräzision Kammer

Die Wiederholpräzision der Kristallisationskammer wurde in zwei Kammern parallel mit dem als Standard verwendeten gefriergetrockneten Weizenschrot ermittelt (Probenvorbereitung wie eine Weizenprobe, s. u.). Es wurden jeweils eine Lösung aus einer Teilprobe auf die Platten beider Ringe pipettiert; der Versuch wurde einmal wiederholt. Dies zeigt den Einfluss der verschiedenen Kammern auf die Präzision und ist gleichzeitig eine Voraussetzung dafür, dass die Muster als Kammerwiederholung genommen werden können. Abbildung 12 zeigt das Ergebnis für den Standard in Abhängigkeit von der Kammer (Kammer B und C mit jeweils 43 Platten). Der Versuch wurde mehrfach wiederholt. Der Unterschied zwischen den Kammern ist nicht signifikant.

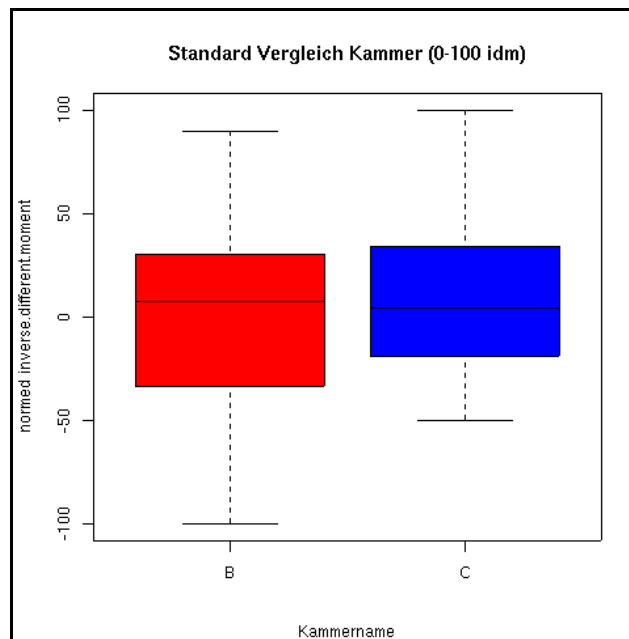


Abbildung 12 Einfluss der Kammern auf den Weizenstandard

4.1.4.1.1.3.2 Standard über Tage

Um zu prüfen, wie groß der Einfluss der Schwankungen durch die Kristallisationskammern selbst über verschiedene Tage auf den Standard ist, wurde der Standard bei jedem Kammerdurchgang vermessen. Es wurden jeweils 6 Bilder des Standards pro Kammer kristallisiert. In Abbildung 13 ist das Ergebnis gegen die Versuchstage für beide Kammern zusammen aufgetragen. Dies ist die Voraussetzung für den Einsatz einer Regelkarte. Die Regelgrenzen konnten bisher noch nicht festgelegt werden, dafür reicht das vorliegende Datenmaterial noch nicht aus. Deshalb kann auch noch keine abschließende Begründung geliefert werden, ob und warum zwei Versuchstage (Nr. 5 und 7) herausfallen.

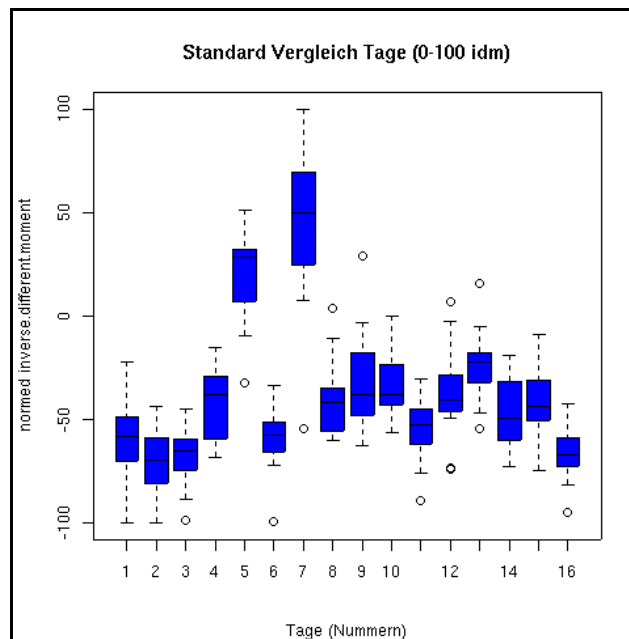


Abbildung 13 Einfluss der Zeit (Tage) auf Weizenstandard

4.1.4.1.1.3.3 Validierung der LDA-Modelle

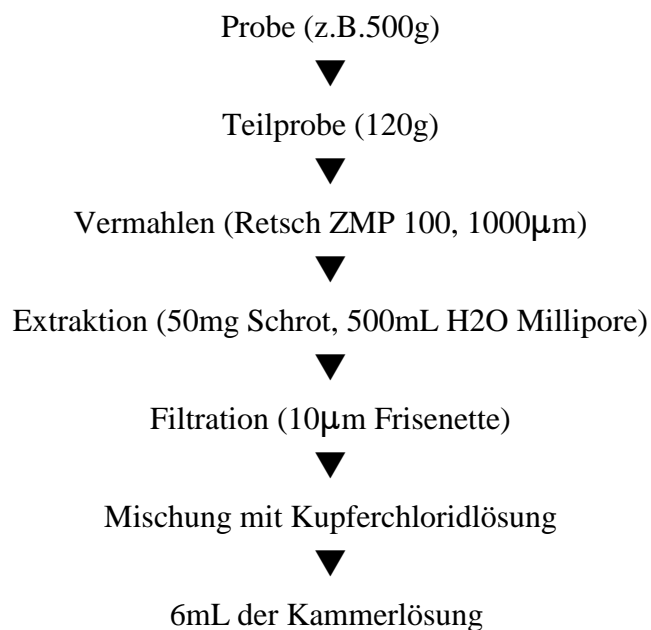
In diesem Teil des Projekts wurde geprüft, ob eine Gruppierung der Proben nach Kulturvariante (Anbau, Sorte) für definierte Weizen- und Möhrenproben möglich ist (deskriptive Diskriminanzanalyse). Dies wurde an zwei aufeinander folgenden Ernten (2002 und 2003) untersucht. Die beiden Voraussetzungen für die Lineare Diskriminanzanalyse sind Normalverteilung der Daten und Homogenität der Kovarianzmatrices. Beides wurde für die zu berechnenden Daten geprüft. Die lineare Diskriminanzanalyse ist in ihrem Ergebnis von den verwendeten Variablen abhängig. Es wurde getestet welche Variablenzahl die geringste Missklassifikation erbrachte. Eine weitere Möglichkeit die Güte eines Modells abzuschätzen, ohne eine weitere repräsentative Stichprobe zu benötigen, ist die Kreuz-Validierung, bei der die Datensätze zufällig in Gruppen aufgeteilt und der Reihe nach die Daten einer Gruppe aus der Modellbildung ausgeschlossen werden. Es wird angenommen, dass sich die Parameter des Modells nur wenig ändern, wenn einzelne Daten aus der Modellbildung ausgeschlossen werden und wenn keine Daten das Modell extrem bestimmen. Durch eine schrittweise LDA wurden die Variablen für die Trennung der Proben ermittelt. Nicht alle Voraussetzungen der LDA waren für die so ermittelten 12 Variablen erfüllt. Da die LDA ein gegenüber solchen Ergebnissen robustes Verfahren ist, wurde es dennoch zur Gruppierung der Proben eingesetzt. Die Aussage zur Signifikanz der

Trennung von je zwei Proben je Fragestellung wurde mit der Varianzanalyse einer Einzelvariable der Texturanalyse, die für die Validierung ausgewählt wurde, durchgeführt.

4.1.4.1.2 Methodenpräzision und Robustheit für Weizen

4.1.4.1.2.1 Grundsätzliches zur Methode für Weizen

Ziel der Untersuchung ist es, zwei oder mehr Weizenproben aufgrund ihrer verschiedenen Herkunft (Anbauverfahren) möglichst sicher zu unterscheiden. Zur Bestimmung wird eine Weizenprobe standardisiert vermahlen, das Schrot extrahiert, der Extrakt filtriert, das Filtrat mit einer wässrigen Kupferchloridlösung gemischt und auf einer Glasplatte unter kontrollierten Bedingungen durch Verdampfen des Lösungsmittels zur Auskristallisation gebracht. Die so entstandenen Muster werden gescannt und die Daten mit einer Texturanalyse berechnet. Die Unterschiede werden mittels Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Folgende Schritte werden in der Probenvorbereitung durchlaufen:



4.1.4.1.2.2 Probenvorbehandlung und -menge

Um Probeninhomogenitäten zu vermeiden, wird mit einer Teilprobenmenge von 120g gearbeitet, die das mehr als 1,5fache des 1000Korngewichtes beträgt. Die Proben werden bis zur Prüfung im Dunklen bei ca. 4°C gelagert und ca. 12h vor jeder Messung im Labor auf Raumtemperatur gebracht. Es werden immer gleiche Teilprobenmengen verwendet und nur Ergebnisse gleicher Mischungsverhältnisse verglichen.

4.1.4.1.2.3 Bezeichnungen

Es werden folgende Bezeichnungen verwendet:

Probe:	Probenmaterial (bulk-Probe von >1kg bei den DOK-Proben)
Teilprobe:	zur Prüfung verwendete Teilmenge einer Probe (120g)
Einwaage:	50g der vermahlenden Teilprobe werden zur Extraktion eingewogen
Kammerlösung:	Definierte Mischung in einem bestimmten Volumenverhältnis von gefiltertem Extrakt einer Teilprobe und Kupferchloridlösung mit definierter Kupferchloridmenge

4.1.4.1.2.4 Variation der Extraktionszeit

Um die durch die Variation der Extraktionszeit verursachten Streuungen der Ergebnisse zu untersuchen, wurde zunächst eine Weizenprobe (Herkunft: ökologischer Handel) einmal vermahlen und in vierfacher Wiederholung unter gleichen Bedingungen mit drei verschiedenen Zeiten (20, 40 und 80 Minuten) extrahiert. Jeder Extrakt wurde gefiltert, mit Kupferchloridlösung vermischt und in beiden Kammern mit je 6 Platten pro Extrakt parallel pipettiert und kristallisiert.

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse für eine Weizenprobe aus dem ökologischen Handel gegen drei verschiedene Extraktionszeiten aufgetragen.

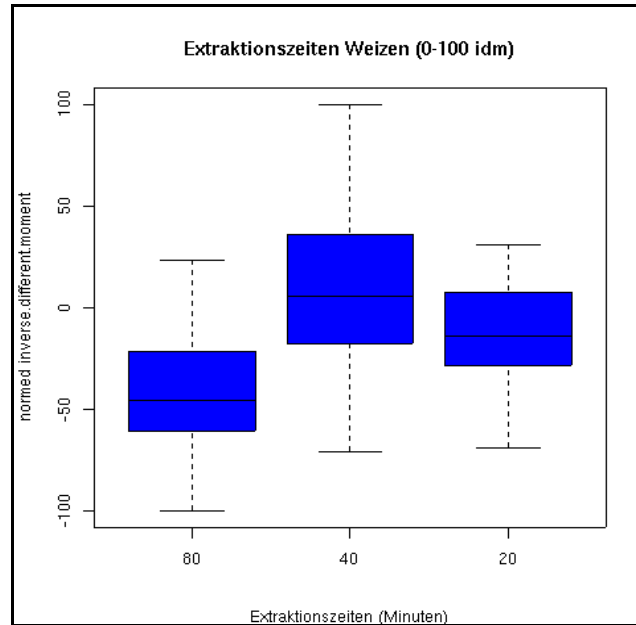


Abbildung 14 Einfluss der Extraktionszeit auf eine Weizenprobe

Es zeigt sich ein signifikanter Einfluss der Extraktionszeit bei Weizen, wobei der Unterschied zwischen 20 und 40 Minuten nicht signifikant ist. Eine Erhöhung der Extraktionszeit auf 80 Minuten verändert das Ergebnis.

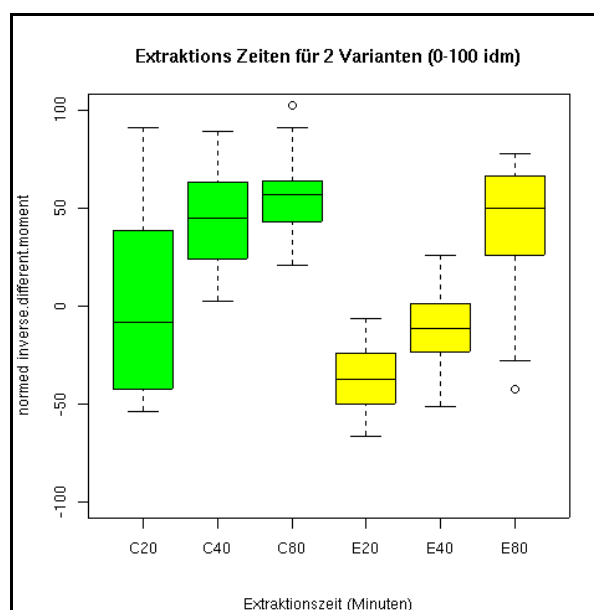


Abbildung 15 Einfluss der Extraktionszeit auf zwei verschiedene Weizenproben, (öko: grün, konv.: gelb)

In einem zweiten Versuch wurden zwei Proben aus dem DOK-Versuch (ökologische (bio-dyn., grün) und konventionelle (IP, gelb), Ernte 2002) in zweifacher Wiederholung mit drei verschiedenen Zeiten extrahiert. Der Versuch wurde einmal wiederholt. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse für alle Wiederholungen zusammen gegen die Extraktionszeit für beide Proben aufgetragen.

Für die ökologische Variante ist der Einfluss der Extraktionszeit wieder nur zwischen 20 und 80 Minuten signifikant. Die konventionelle Variante zeigt dagegen einen signifikanten Einfluß der Extraktionsdauer über alle Zeiten. Dieses Verhalten konnte in einer Versuchswiederholung reproduziert werden. Bei 20 und 80 Minuten Extraktionszeit nimmt das Trennungvermögen zwischen den beiden Anbauvarianten ab (20 Minuten, $p=0,12$, 80 Minuten, $p=1$), wobei die beste Trennung für 40 Minuten erreicht wurde ($p<0,001$). Dieses Verhalten der Proben muss in weiteren Versuchen mit definierten Anbauproben wiederholt werden. Sollte sich herausstellen, dass das Ergebnis auch mit anderen Probenpaaren reproduziert werden kann, so ist der Extraktionsschritt der bestimmende Schritt in der Probenvorbereitung.

4.1.4.1.2.5 Stabilität der Lösung

Da die Vermahlung nicht für alle Teilproben parallel, sondern nacheinander durchgeführt werden kann, die Kammerlösungen aber zur gleichen Zeit pipettiert werden, hat jede Teilprobe eine unterschiedlich lange Dauer in der Probenvorbereitung. Daher wird für jede Prüfung verschiedener Proben mit einer Wiederholung der Teilproben in umgekehrter Reihenfolge gearbeitet (A1B1B2A2). Es können maximal 6 Teilproben gleichzeitig pro Kammer kristallisiert werden. Um festzustellen, ob in diesem Zeitraum die Kammerlösung altert, wurde eine Weizenprobe mit 6facher Probenvorbereitung hergestellt und kristallisiert. Der Versuch wurde einmal wiederholt. Zwischen der ersten und letzten Wiederholung der Probenvorbereitung gibt es keinen signifikanten Trend.

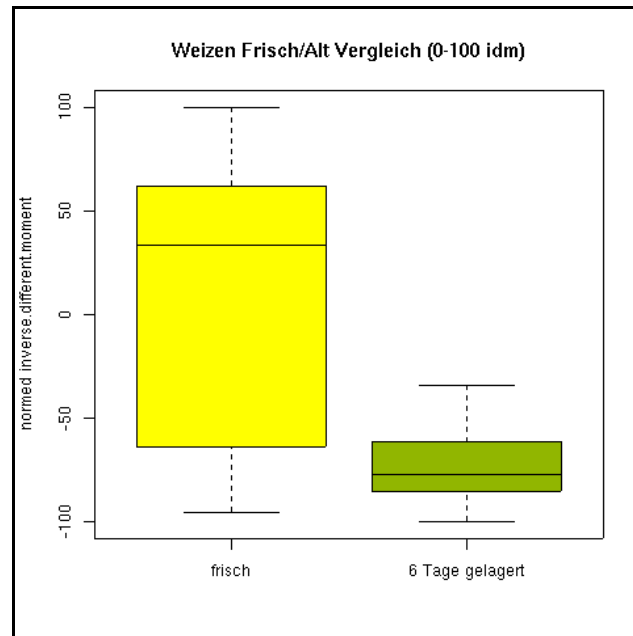


Abbildung 16 Einfluss der Alterung des Extraktes auf das Ergebnis einer Weizenprobe

Um zu zeigen, dass eine Alterung der gefilterten Extrakte über den Zeitraum der Probenvorbereitung hinaus von der Methode erfasst werden kann, wurde der gefilterte Extrakt einer Teilprobe (Herkunft: ökologischer Handel) nach 6 Tagen nochmals kristallisiert. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse einer Weizenteilprobe frisch und nach 6 Tagen (Lagerung steril, dunkel, bei ca. 6°C) kristallisiert dargestellt ($p < 0,001$).

4.1.4.1.2.6 Variation der Kammern

Pro Durchgang können bei 43 Platten maximal 6 Teilproben gleichzeitig kristallisieren. Da für jede Probe mit mindestens zwei Teilproben gearbeitet wird, muss bei mehr als 3 Proben gleichzeitig mit zwei Kammern parallel gearbeitet werden. Um zu testen ob die Kammerunterschiede größer sind als die Streuung der Werte innerhalb einer Kammer wurde eine Weizenprobe in 6facher Wiederholung vorbereitet und dann mit je 6 Platten pro Vorbereitung in beiden Kammern parallel kristallisiert. Der Versuch wurde mehrfach, auch mit anderen Weizenproben, wiederholt. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse für zwei verschiedene Weizenproben in Abhängigkeit von den Kammern dargestellt, die sechs Probenwiederholungen wurden pro Kammer zusammengefasst (ökologische (bio-dyn., grün) und konventionelle (IP, gelb) Weizenproben des DOK-Versuches (Ernte 2002)). Die Unterschiede zwischen den Proben sind signifikant ($p < 0,001$), zwischen den Kammern für beide Proben jedoch nicht ($p > 0,1$).

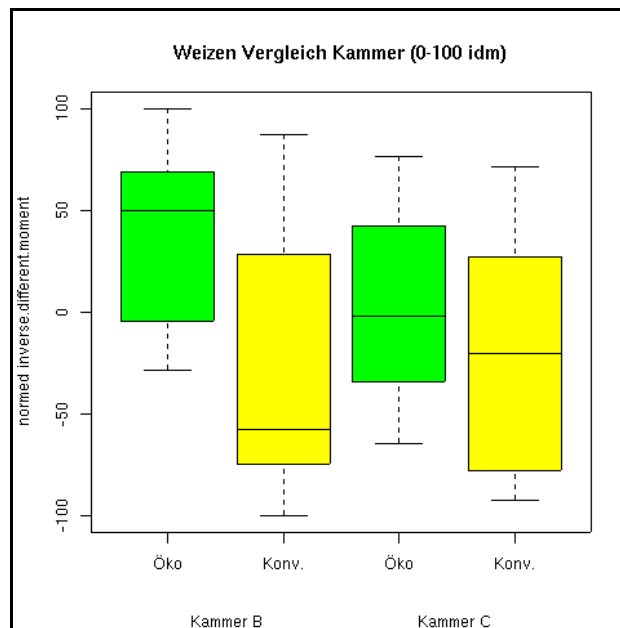


Abbildung 17 Einfluss der Kammer auf das Ergebnis von zwei Weizenproben (öko: grün, konv.: gelb)

4.1.4.1.2.7 Variation über Tage (Probenvorbereitungen)

Für die Bestimmung der Tagesschwankungen wurden zwei Weizenproben an 7 verschiedenen Tagen unter jeweils gleichen Bedingungen kristallisiert. Es handelt sich hierbei um die Probe bio-dyn. (grün) und konventionell IP (gelb) der DOK-Proben der Ernte 2002. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 dargestellt.

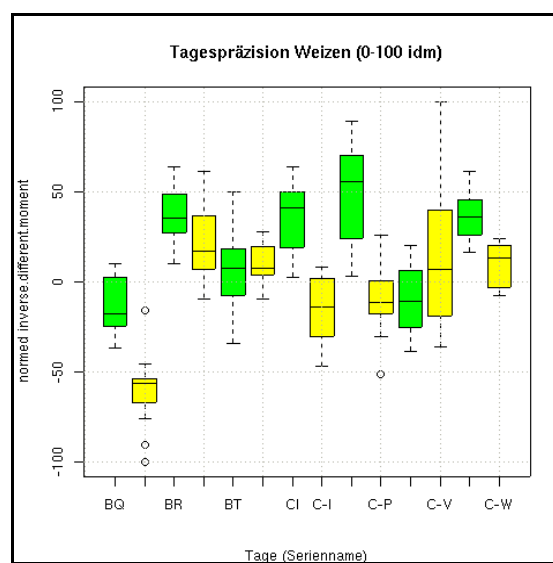


Abbildung 18 Einfluss der Tage (Probenvorbereitungen) auf das Ergebnis von zwei verschiedenen Weizenproben

Der Unterschied zwischen den beiden Proben ist auch über 7 Tage signifikant ($p < 0,001$), wobei die Tage das Ergebnis beeinflussen. Die Schwankungen über verschiedene Tage liegen im Bereich der Streuung der Werte durch eine Kammer und Probenvorbereitung. Warum Teilproben zwischen verschiedenen Kammern unterschiedlich stark streuen, konnte bisher nicht beantwortet werden. Es wird ein Zusammenhang zwischen statistischer Streuung der Verdampfungszeit gesehen. Dies kann aber erst bei Vorlage einer ausreichenden Datenmenge untersucht werden und ist daher in einem weiteren Projekt zu untersuchen. Das besondere Verhalten der Ergebnisse der Serie C-V kann mit Hilfe der Regelkarte (s. Abb.13, Tag 7) erklärt werden. Unter Anwendung noch festzulegender Grenzen könnte diese Serie ggf. entfernt werden.

4.1.4.1.2.8 Wiederholpräzision Probenvorbereitung und Kristallisation bei Weizen

Für die Bestimmung der Methodenpräzision wurden jeweils eine ökologische (bio-dyn., grün) und konventionelle (IP, gelb) Weizenproben des DOK-Versuches (Ernte 2002) in 6facher Wiederholung unter gleichen Bedingungen vorbereitet und in zwei Kammern parallel kristallisiert. Dieser Versuch wurde mehrfach und mit verschiedenen Proben wiederholt. Die Ergebnisse sind für eine Bestimmung in Abbildung 19 aufgezeigt.

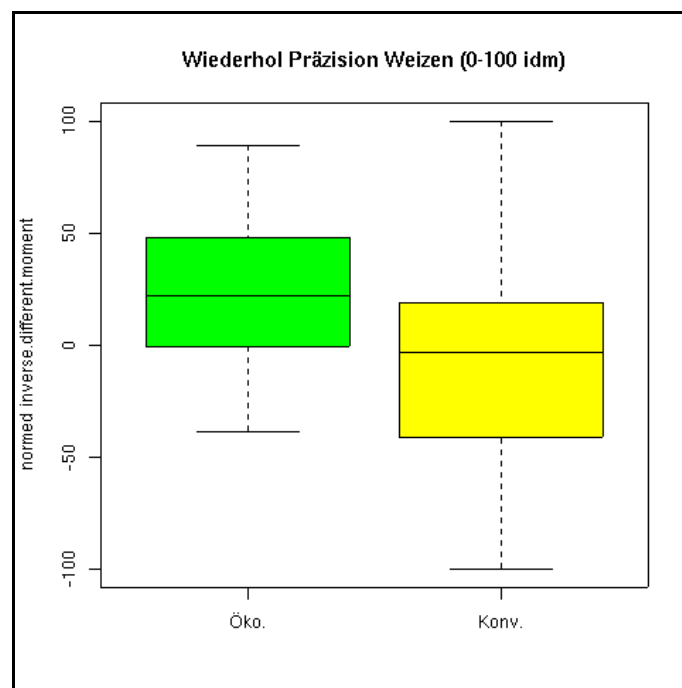


Abbildung 19 Wiederholpräzision von zwei verschiedenen Weizenproben (öko: grün, konv.: gelb)

Der Unterschied zwischen den beiden Proben ist auch bei einer 6fachen Wiederholung signifikant ($p < 0,001$).

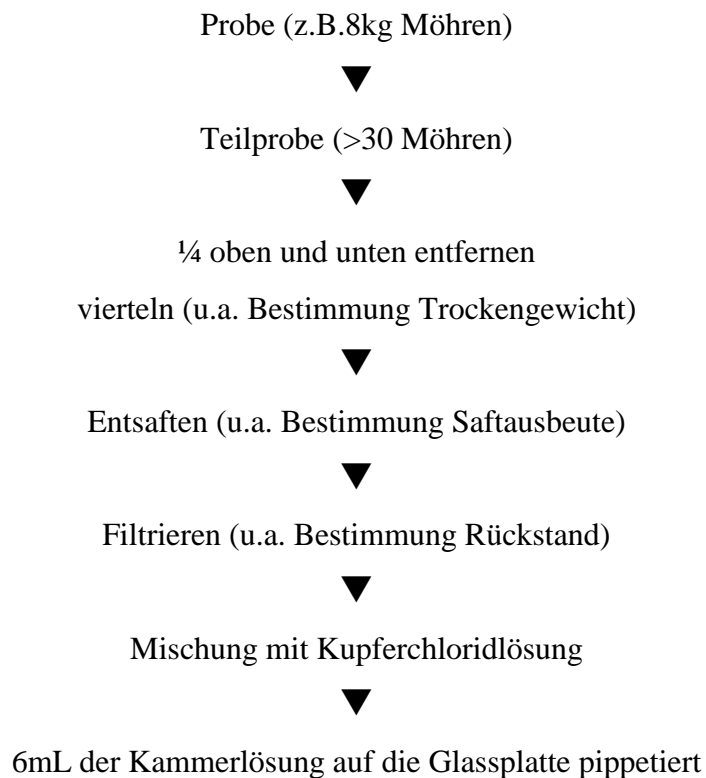
4.1.4.1.3 Methodenpräzision und Robustheit für Möhre

4.1.4.1.3.1 Grundsätzliches zur Methode für Möhre

Ziel der Untersuchung ist es, zwei oder mehrere Möhrenproben aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft (Düngung, Sorte) möglichst sicher zu unterscheiden.

Zu Bestimmung wird eine Möhrenprobe standardisiert entsaftet, der Saft filtriert, das Filtrat mit einer wässrigen Kupferchloridlösung versetzt und auf einer Glasplatte unter kontrollierten Bedingungen durch Verdampfen des Lösungsmittels kristallisiert. Die so entstandenen Muster werden gescannt und die Daten mit einer Texturanalyse berechnet. Die Unterschiede werden mit einer Varianzanalyse (ANOVA) bestimmt.

Folgende Schritte werden in der Probenvorbereitung durchlaufen:



4.1.4.1.3.2 Probenvorbehandlung und -menge

Um Probeninhomogenitäten zu vermeiden, wird mit einer Teilprobenmenge von > 30 Einzelmöhren gearbeitet (Erfahrungswert). Die Proben werden im Dunklen bei ca. 4 °C gelagert und ca. 3 h vor jeder Bestimmung im Labor auf Raumtemperatur gebracht. Es werden immer gleiche Teilprobenmengen verwendet und nur Ergebnisse gleicher Mischungsverhältnisse verglichen.

Die Möhrenproben werden bonitiert, wobei die Kriterien der EU-Handelklassennorm für Möhren zugrunde gelegt werden. Anschließend werden die Möhren in vergleichbare Teilproben geteilt, gewaschen und $\frac{1}{4}$ oben und unten entfernt, nur das Mittelstück wird für die Bestimmung verwendet und geviertelt. Neben dem Trockengewicht der Probe und des Rückstandes im Filter, wird für jede Teilprobe auch die Saftausbeute bestimmt.

4.1.4.1.3.3 Bezeichnungen

Es werden folgende Bezeichnungen verwendet:

Probe:	Probenmaterial
Teilprobe:	Zur Prüfung verwendete Teilmenge einer Probe (> 30 Möhren, nur Mittelstück, geviertelt)
Saftmenge:	mL frischer filtrierter Saft einer Teilprobe
Kammerlösung:	definierte Mischung in einem bestimmten Volumenverhältnis aus gefiltertem Saft einer Teilprobe und Kupferchloridlösung mit definierter Kupferchloridmenge.

4.1.4.1.3.4 Stabilität der Lösung

Da die Entsaftung mehrere Teilproben nicht parallel durchgeführt werden kann, die Lösungen in der Kammer aber zur gleichen Zeit pipettiert werden, hat jede Teilprobe eine unterschiedlich lange Dauer in der Probenvorbereitung. Daher wird jede Prüfung verschiedener Proben mit einer Wiederholung der Teilproben in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt (A1B1B2A2).

Es können maximal 6 Teilproben gleichzeitig pro Kammer kristallisiert werden. Um festzustellen, ob in diesem Zeitraum die Kammerlösung altert, wurde eine Möhrenprobe mit 6facher Probenvorbereitung behandelt und kristallisiert. Der Versuch wurde einmal wiederholt. Zwischen der ersten und letzten Wiederholung der Probenvorbereitung gibt es keinen signifikanten Trend.

Um zu zeigen, dass eine Alterung der gefilterten Säfte über den Zeitraum der Probenvorbereitung hinaus von der Methode erfasst werden kann, wurde der gefilterte Saft einer Teilprobe nach 6

Tagen nochmals kristallisiert. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse einer Möhreteilprobe frisch und nach 6 Tagen (Lagerung steril, dunkel, bei ca. 6°C) kristallisiert dargestellt ($p < 0,05$).

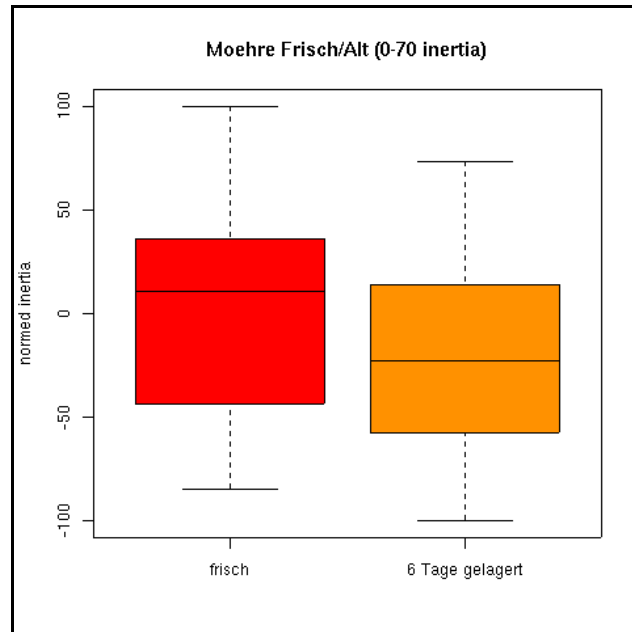


Abbildung 20 Einfluss der Alterung des Möhrensaftes auf das Ergebnis einer Möhrenprobe

4.1.4.1.3.5 Variation der Kammern

Pro Durchgang können bei 43 Platten maximal 6 Teilproben gleichzeitig kristallisieren. Da für jede Probe mit mindestens zwei Teilproben gearbeitet wird, muss bei mehr als 3 Proben gleichzeitig mit zwei Kammern parallel gearbeitet werden. Um zu testen ob die Kammerunterschiede größer sind als die Streuung der Werte innerhalb einer Kammer wurden eine Möhrenprobe in 6facher Wiederholung vorbereitet und dann mit je 6 Platten pro Vorbereitung in beiden Kammern parallel kristallisiert. Der Versuch wurde mehrfach auch mit anderen Möhrenproben (hier 3fache Wiederholung) durchgeführt.

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse für zwei Möhrenprobe (M11, M44 Universität Kassel Ernte 2002) in Abhängigkeit von den Kammern dargestellt, die sechs Probenwiederholungen wurden pro Kammer zusammengefasst. Beide Proben lassen sich signifikant unterscheiden ($p=0,0019$), die Unterschiede zwischen den Kammern sind für beide Proben nicht signifikant ($p > 0,05$).

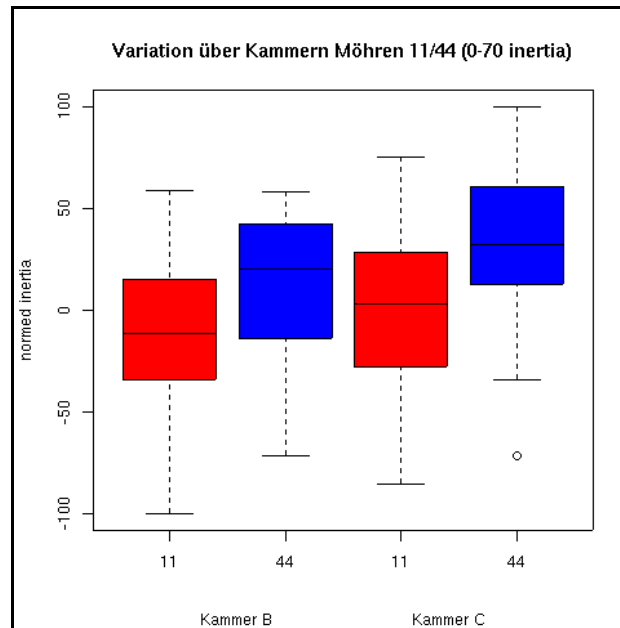


Abbildung 21 Einfluss der Kammern auf das Ergebnis zweier unterschiedlicher Möhrenproben

4.1.4.1.3.6 Variation über Tage

Eine Bestimmung der Tagesschwankungen ist für Möhrenproben nur eingeschränkt möglich, da die Proben nicht stabil sind, sondern altern. Es wurde trotzdem versucht, die Schwankungen über 2 Tage für jeweils 3 Teilproben von 2 unterschiedlichen Möhrenproben zu ermitteln. Die Proben 11 und 44 aus der Ernte 2002 der Möhren, Universität Kassel konnten auch über 2 Tage signifikant getrennt werden ($p < 0,005$), die Tage selbst hatten keinen signifikanten Einfluss ($p > 0,1$).

Probenwiederholungen an unterschiedlichen Tagen sind möglich, auch wenn die Teilproben nicht exakt derselben Grundgesamtheit entsprechen.

Die Schwankungen über Tage liegen im Bereich der Streuung der Werte durch Kammer und Probenvorbereitung. Ein Vergleich über mehr als 2 Tage ist aufgrund der Alterung der Proben nicht zulässig.

4.1.4.1.3.7 Wiederholpräzision Probenvorbereitung und Kristallisation bei Möhre

Für die Bestimmung der Methodenpräzision wurden die Proben M11 und M44 (Universität Kassel, Ernte 2002) durch längseitiges Schneiden der Mittelstücke in 1/8 Stücke geteilt. Jede Teilprobe enthielt damit 30x1/8 jeder Einzelmöhre. Es wurden insgesamt 6 Wiederholungen der Teilprobe unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Für jede Probenvorbereitung wurden 6 Platten kristallisiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 aufgezeigt.

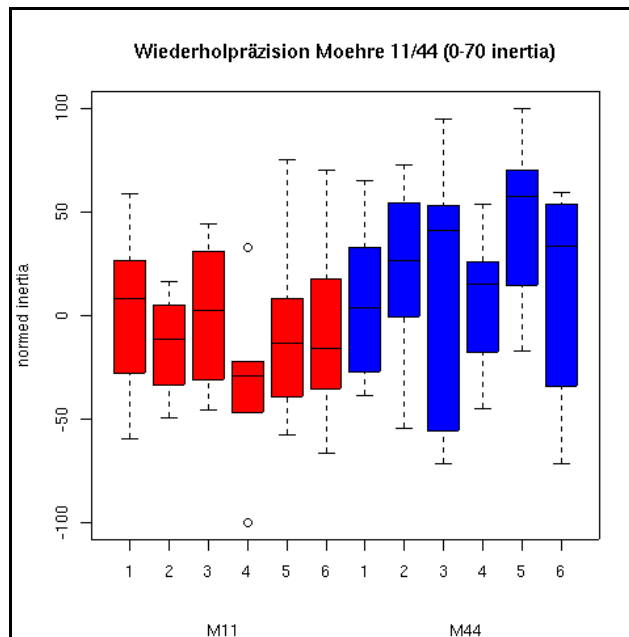


Abbildung 22 Wiederholpräzision für zwei Möhrenproben

Auch für eine 6fache Wiederholung ist die Trennung der beiden Proben aus der Ernte 2002 signifikant. Die Proben aus dem N- Düngungsversuch aus der Ernte 2003 können hingegen mittels einer einzigen Variable nicht signifikant getrennt werden.

4.1.4.1.4 Dokumentation

Eine Voraussetzung für die Validierung von Labormethoden ist die Dokumentation aller Prozesse, die die Probe vom Eingang ins Labor bis zur Übermittlung der Methodenergebnisse einer Prüfung durchläuft. Dabei sollte sich die Struktur der Dokumentation an dem Aufbau bereits existierender Normen orientieren, so dass Standardarbeitsanweisungen und Standardprüfanweisungen abgeleitet werden können. Eine weitere Voraussetzung ist ein dem Problem entsprechendes Qualitätsmanagement des Laboratoriums, indem die Methode eingesetzt wird. Dazu gehört die Dokumentation einer Prüfung mittels Laborbuch und die ausreichende Dokumentation der Daten und Ergebnisse sowie deren Aufbewahrung für einen zu bestimmenden Zeitraum.

Beide Voraussetzungen wurden für die Methode der Kupferchlorid-Kristallisation von der Arbeitsgruppe erstmalig geschaffen. Jeder Prozessschritt für das Verfahren ist für die Prüfung von Weizen- und Möhrenproben dokumentiert worden. Diese Dokumente orientieren sich in ihrem Aufbau an bereits existierenden DIN-Normen bzw. Standardarbeitsanweisungen. Die Labordaten werden für jede Prüfung computergestützt erfasst. Damit kann jede Platte (Ergebnis) zurückverfolgt werden.

4.1.5 Ergebnisse der Vergleichsversuche

4.1.5.1 Weizen DOK-Versuche FIBL

Es wurde eine Probenserie der Ernte 2002 im Frühjahr 2003, sowie eine Probenserie der Ernte 2003 im Herbst 2003 untersucht.

4.1.5.1.1 Probenmaterial

Für die im Berichtszeitraum durchgeführte erste Hauptuntersuchungsserie standen folgende codierte Proben zur Verfügung:

Probenserie A-E (5 Varianten als bulk-Proben):

2 biologische Varianten (biologisch-dynamisch und biologisch-organisch)

2 konventionelle Varianten (reiner Mineraldünger und Stallmist+Mineraldünger)

1 Kontrolle (ungedüngt)

4.1.5.1.2 Ergebnisse Probenserie A-E (Feb. 2003)

Die Proben wurden an 5 verschiedenen Tagen (d.h. 5x Probenvorbereitung) in zwei verschiedenen Kammern gemessen und die Ergebnisse über alle Tage und Kammern zusammengefasst. In der Abbildung ist die zweite Funktion der Linearen Diskriminanzanalyse (LD2) gegen die erste Funktion (LD1) der Linearen Diskriminanzanalyse für alle fünf Weizenproben aufgetragen. Die beiden biologischen (grün) und konventionellen (gelb) werden gruppiert und deutlich von der

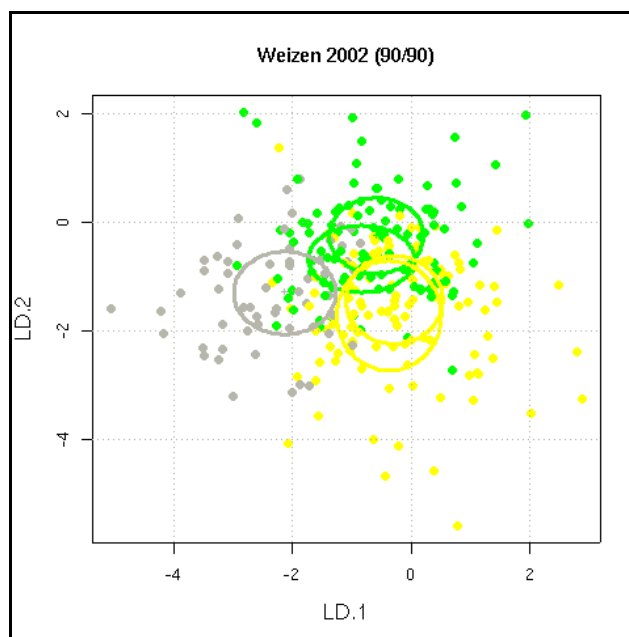


Abbildung 23 LD2 gegen LD1 für alle fünf Weizenproben DOK-Versuch, Ernte 2002 (Kontrolle: grau, öko: grün, konv.: gelb)

Kontrolle (grau) getrennt.

Werden die beiden Varianten für den ökologischen und konventionellen Anbau zusammengefasst, so ist die Missklassifikation bei 29 %, obgleich alle Platten (auch solche mit technischen Fehlern) zur Auswertung genommen wurden und die Verdampfungs- und Kristallisationszeiten nicht berücksichtigt wurden (vgl. 4.1.6.).

4.1.5.1.3 Ergebnisse Probenserie A-E (Sept. 2003)

Die Proben wurden an 4 verschiedenen Tagen (d.h. 4x Probenvorbereitung) in zwei verschiedenen Kammern gemessen und die Ergebnisse über alle Tage und Kammern zusammengefasst. In der Abbildung ist die LD 2 gegen die LD 1 der Linearen Diskriminanzanalyse für alle fünf Weizenproben aufgetragen. Die beiden biologischen (grün) und konventionellen (gelb) werden gruppiert und deutlich von der Kontrolle (grau) getrennt.

Werden die beiden Varianten für den ökologischen und konventionellen Anbau zusammengefasst, so ist die Missklassifikation bei nur 21 %, obgleich alle Platten (auch solche mit technischen Fehlern) zur Auswertung genommen wurden und die Verdampfungs- und Kristallisationszeiten nicht berücksichtigt wurden (vgl. 4.1.6.).

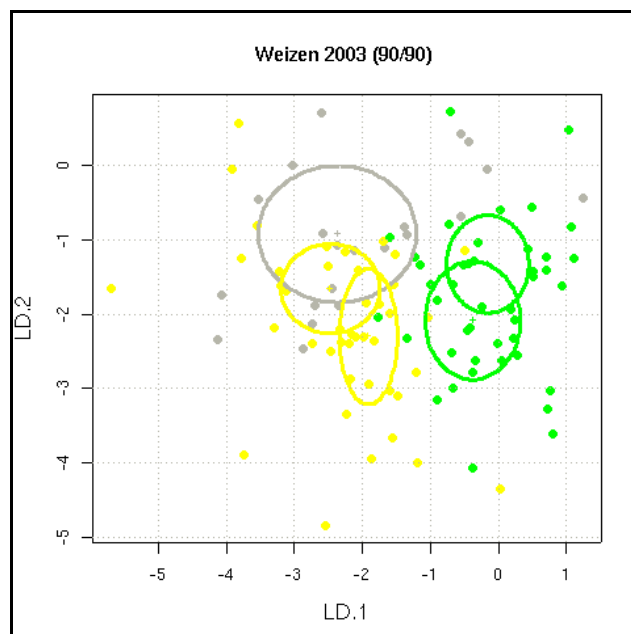


Abbildung 24 LD2 gegen LD1 für alle fünf Weizenproben DOK-Versuch, Ernte 2003 (Kontrolle: grau, öko: grün, konv.: gelb)

4.1.5.2.3 Ergebnisse Probenserie M77/M88 (Sept. 2003)

Die Möhrenproben der Universität Kassel, Domäne Frankenhausen wurden an 2 verschiedenen Tagen mit insgesamt 6maliger Probenvorbereitung in zwei verschiedenen Kammern gemessen und die Ergebnisse über alle Tage und Kammern zusammengefasst. In der Abbildung ist das Ergebnis der LD1 für beide Varianten gezeigt (box-plot), die Missklassifikation beträgt 34 %. Die Anordnung der Proben im Diagramm ist relativ, daher nicht mit den Ergebnissen aus 2002 absolut

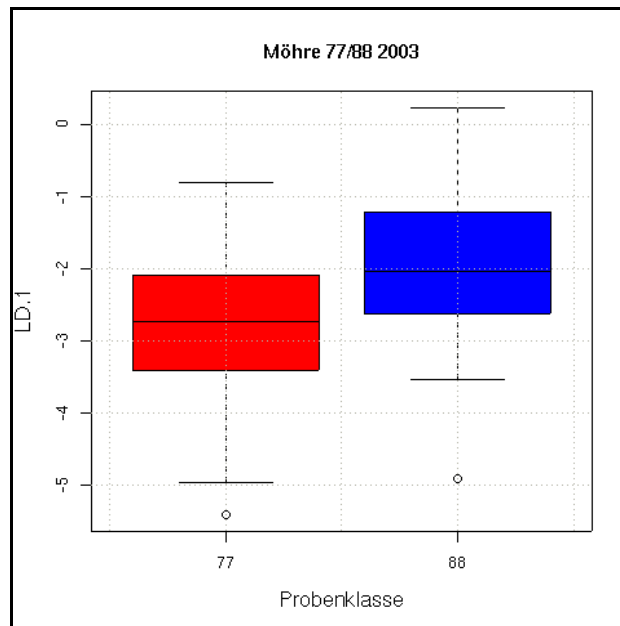


Abbildung 26 LD1-Wert für zwei verschiedene Möhrenproben (N-Düngungsversuch, Ernte 2003) an zwei verschiedenen Tagen in zwei Kammern parallel (n=6)

vergleichbar.

4.1.5.3 Möhren vom FIBL

Es wurden eine Probenserie der Ernte 2002 im Frühjahr 2003 nach einer Lagerung, sowie eine Probenserie der Ernte 2003 im Oktober 2003 untersucht.

4.1.5.3.1 Probenmaterial

Für die im Berichtszeitraum durchgeführte erste Hauptuntersuchungsserie standen folgende codierte Proben zur Verfügung:

- Probenserien HIKL (Frühjahr 2003) und ABCD (Herbst 2003): 4 Varianten als bulk-Proben
- 2 samenfeste Varianten (Bolero F1, Nipomo F1)
- 2 Hybride (Samson OP, Tiptop OP)

4.1.5.3.2 Ergebnisse Probenserie HIKL Möhrensorten (Feb. 2003)

Die Möhrenproben wurden an einem Tag mit 2maliger Probenvorbereitung in zwei verschiedenen Kammern gemessen und die Ergebnisse über Kammern zusammengefasst. In der Abbildung 27 ist die LD 1 gegen die LD 2 der Linearen Diskriminanzanalyse für alle vier Möhrenproben aufgetragen. Die beiden samenfesten (grün) und Hybriden (gelb) lassen sich nicht gruppieren. Eine samenfeste und eine Hybride bilden Extreme, je eine samenfeste und Hybride fallen als Gruppe zusammen. Werden die beiden zusammenliegenden Proben als Gruppe zusammengefasst, so ist die Missklassifikation bei 31%, obgleich alle Platten (auch solche mit technischen Fehlern) zur Auswertung genommen wurden und die Verdampfungs- und Kristallisationszeiten nicht berücksichtigt wurden (vgl. 4.1.6.).

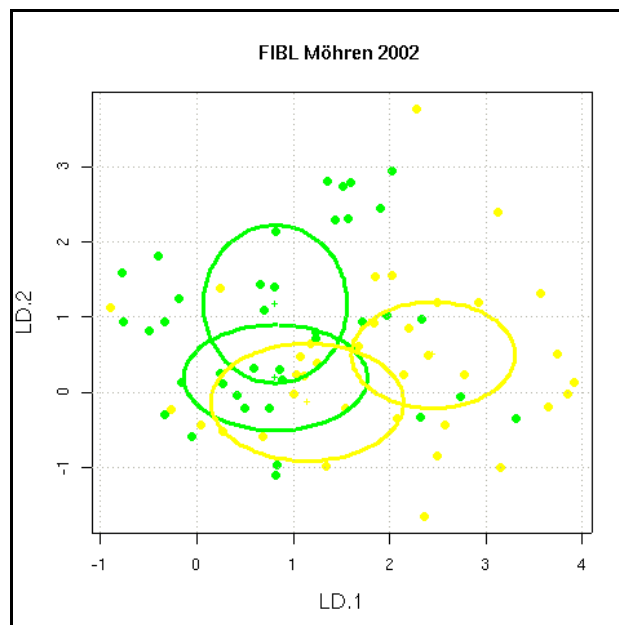


Abbildung 27 LD1 gegen LD2 für alle vier Möhrenproben aus dem Sortenversuch, Ernte 2002 (gelb Hybrid-, grün samenfeste Möhren)

4.1.5.3.3 Ergebnisse Probenserie Möhrensorten (Okt. 2003)

Die Möhrenproben wurden an 2 verschiedenen Tagen mit insgesamt 6maliger Probenvorbereitung in zwei verschiedenen Kammern gemessen und die Ergebnisse über alle Tage und Kammern zusammengefasst. In Abbildung 28 ist die LD1 gegen die LD2 der Linearen Diskriminanzanalyse für alle vier Möhrenproben aufgetragen. Die beiden samenfesten Varianten (grün) fallen als Gruppe zusammen und sind von den Hybriden (gelb) abgetrennt. Die beiden Hybriden sind eine eigene Gruppe und lassen sich ebenfalls voneinander trennen. Werden die beiden Varianten für zusammengefasst, so ist die Missklassifikation bei 29%, obgleich alle Platten (auch solche mit

technischen Fehlern) zur Auswertung genommen wurden und die Verdampfungs- und Kristallisationszeiten nicht berücksichtigt wurden (vgl. 4.1.6.).

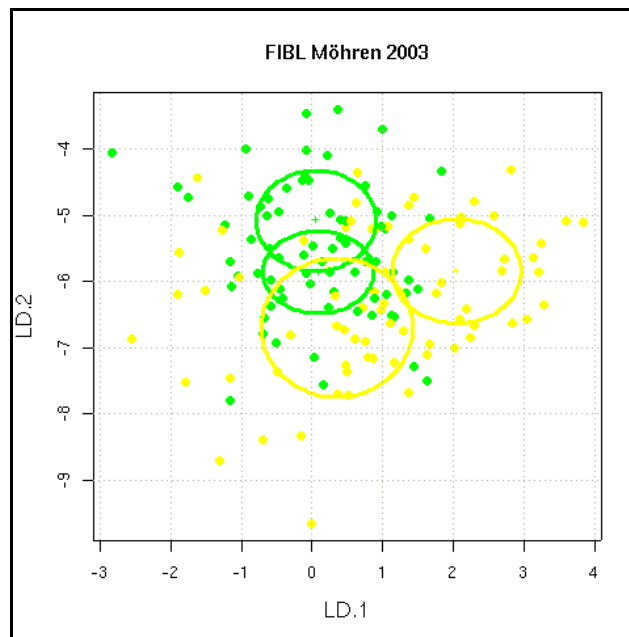


Abbildung 28 LD1 gegen LD2 für alle drei Möhrenproben aus dem Sortenversuch, Ernte 2003 (gelb Hybrid-, grün samenefeste Möhren)

4.1.6 Zusammenfassende Abschätzung der Eignung der Methode für die Fragestellung

Die Methode ist für die Beantwortung der drei Validierungsfragen geeignet, da die verschiedenen Proben teilweise sogar mit einer Erntewiederholung korrekt differenziert und gruppiert werden konnten. Eine Trennung und Gruppierung ist allerdings nicht immer mit einer einzigen Variablen der Texturanalyse möglich. Dafür muss mit einer Kombination verschiedener Variablen gearbeitet werden, wie sie durch eine schrittweise Lineare Diskriminanzanalyse (LDA) ermittelt wurden. Für jede Fragestellung wurde mit einem eigenen Modell gearbeitet. Es müssen im weiteren entsprechende statistische Verfahren für die Prüfung der Stabilität der LDA-Modelle eingesetzt, sowie weitere Einzelvariable der Texturanalyse auf ihre Eignung zur Trennung der Proben geprüft werden. Dies soll in einem nächsten Projekt erfolgen. Da für diese Projekt für alle Messungen sämtliche Platten ohne Vorsortierung ausgewertet wurden (auch diejenigen, die eindeutig technische Mängel aufwiesen) und darüber hinaus die Verdampfungs- und Kristallisationszeiten in der Auswertung für die Differenzierung noch nicht berücksichtigt wurden, kann die Methode noch weiter optimiert werden (Reduzierung der Streuung, Erhöhung der Signifikanz bzw. Erniedrigung der Missklassifikation). Ziel des Projektes war die Validierung einer bereits vorliegenden Methode, nicht deren Entwicklung. Da bislang jedoch keine Labordokumentation für die

Kupferchlorid-Kristallisation publiziert und somit allgemein zugänglich ist, musste der gesamte Prozess der Probenvorbereitung, der Kristallisation, der Dokumentation und der Auswertung erarbeitet werden. Dabei wurden moderne Techniken eingesetzt, wie ein computergestütztes Laborbuch und die Texturanalyse. Die Validierung konnte entsprechend den Vorgaben aus der ISO 17025 für je eine Variable der Texturanalyse und die Trennung von zwei Weizenproben aus ökologischem und konventionellem Anbau, sowie von Möhrenproben unterschiedlicher Stickstoffdüngung einer Ernte erfolgreich durchgeführt werden. Hierfür wurden im Rahmen des Forschungsprojektes ca. 6000 Platten angefertigt und die Muster ausgewertet.

Die Validierung bezieht sich ausschließlich auf das an der Universität Kassel eingesetzte und dokumentierte Verfahren (Probenvorbereitung, Kammern, Auswertung). Eine Übertragbarkeit auf andere Laboratorien ist nur über den Vergleich der Labor- und Vergleichspräzision (Durchführung von Ringversuchen) am gleichen Probenmaterial möglich. Solche ersten Versuche wurden parallel zu diesem BLE-Projekt mit Partnern aus den Niederlanden und Dänemark durchgeführt. Beide Kooperationspartner verfügen dabei über je eine baugleiche Kristallisationskammer und verwenden jetzt die gleichen Laborprozeduren und entwickelten Auswertungsmethoden.

Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Unterscheidung von Weizenproben aus anderen Anbauversuchen, oder Möhrenproben (andere Sorten oder Düngungsversuchen) ist daher nicht ohne weiteres zulässig. Für jede neue Fragestellung muss ggf. ein eigenes Modell entwickelt und dann auch validiert werden (Grundlagenforschung). Der Aufwand für diese Re-Validierung kann aber im Vergleich zu der in diesem Projekt durchgeführten Verfahrensvalidierung deutlich verringert werden, da die kritischen Einflussgrößen bei der Probenvorbereitung und auf den Kristallisationsprozess jetzt bekannt sind.

Die Lineare Diskriminanzanalyse erlaubt eine Klassifizierung von Proben bekannter Probenklassen (deskriptiver Ansatz). Die Stabilität der LDA-Modelle muss weiterhin über die Vermessung der in diesem Projekt eingesetzten Proben zu weiteren Ernteterminen (2-3 Jahre) geprüft werden. Erst dann kann festgestellt werden, ob sich das Verfahren der Kupferchlorid-Kristallisation auch für die Zuordnung unbekannter Lebensmittelproben eignet (prädikativer Ansatz).

4.1.7 Aussage über den möglichen Einsatz der Methode für andere Fragestellungen

Ob sich die Methode der Kupferchlorid-Kristallisation für andere Fragestellungen (z.B. Beurteilung von Verarbeitungsverfahren) einsetzen lässt wurde nicht in diesem Projekt geprüft. Die Ergebnisse der Voruntersuchungen und der Bestimmung der Einflussgrößen zeigen aber, dass die Methode

auch auf verschiedene chemische Substanzen unterschiedlich reagiert. Vermahlungsgrad von Weizenschrot, sowie Alterungsversuche der Teilproben zeigten hierbei eine hohe Empfindlichkeit der Methode. Aus der Literatur ist bekannt, dass mehrere landwirtschaftlicher Produkte bereits mit der Methode der Kupferchlorid-Kristallisation untersucht wurden (Balzer-Graf 1994, Engquist 1961, Pettersson 1982). Darüber hinaus wurde die Methode auch für Fragestellungen aus der Verarbeitung (Prozesse) erfolgreich eingesetzt (alles mit visueller Bildauswertung durch eine erfahrene Person mit begrenzter Probenzahl). Daher wird angenommen, dass die Methode für eine Vielzahl von Produkten und Fragestellungen aus Anbau und Verarbeitung auch mit der Texturanalyse und LDA unter Ausnutzung der „mehrdimensionalen“ Antwort eingesetzt werden kann. Ein Ziel der weiteren Messungen sollte der Aufbau einer Referenzbibliothek der Methodenergebnisse von Messungen an definiertem Probenmaterial sein. Für eine Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich ihrer Aussage zur Lebensmittelqualität (Prozessqualität, Gesundheitswert) sollte die Methode bei der Charakterisierung definierter Anbauversuche und verschiedener Verarbeitungsschritten sowie begleitend zu Fütterungsversuchen und Ernährungsstudien eingesetzt werden.

4.2 Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie (Dr. J. Strube)

4.2.1 Beschreibung des Verfahrens

4.2.1.1 Übersicht

Der Grundgedanke des Verfahrens besteht darin, das Kulturverfahren einer Pflanze mit dem optischen Spektrum in Beziehung zu setzen, das an der unzerkleinerten Pflanze gemessen werden kann.

Die Kulturverfahren der konventionellen bzw. ökologischen Landwirtschaft lenken die pflanzliche Entwicklung, d.h. die Wachstums- und Differenzierungsprozesse, in unterschiedlicher Weise. Eine unterschiedliche Entwicklung kommt im Spektrum zum Ausdruck.

Dem Verfahren liegt die Tatsache zugrunde, daß pflanzliche Proben nach Anregung durch Licht langfristig fluoreszieren, d.h. Licht niedrigerer Energie (größerer Wellenlänge) als die Anregung emittieren. Diese Emission nimmt mit der Zeit stark ab, kann jedoch mit entsprechend empfindlichen Geräten während Sekunden, Minuten, Stunden und Tagen gemessen werden (RUTH et al. 1976; POPP 1984).

Durch Variation der Anregungswellenlänge und breitbandige Messung der Emission werden Anregungs-Spektren erhalten, die die Emission einer Probe nach Anregung mit einem Spektralabschnitt zeigen (STRUBE et al. 1999a).

Das Spektrum hängt von der Probenart ab. Bei jeder Probenart treten zusätzliche feinere Veränderungen des Spektrums auf. Diese feineren Veränderungen des Spektrums wurden mit den Kulturbedingungen der Proben verglichen. Sie ließen sich den Kulturbedingungen systematisch zuordnen (STRUBE et al. 2000).

Die Messung der Proben-Emission erfolgt zeitaufgelöst. Aus den gemessenen Daten der jeweiligen zeitlichen Abschnitte des Spektrums lassen sich Einzelwerte oder Größen extrahieren bzw. errechnen, die sich für den Vergleich von Proben erfahrungsgemäß besonders eignen.

Ursprünglich entstanden ist das Verfahren aus der Messung der sogenannten Biophotonen-Emission, die zunächst von Popp und Ruth untersucht (RUTH et al. 1976; POPP 1986), sowie von Popp und anderen auf die Untersuchung von Lebensmitteln angewandt wurde (TEUBNER et al. 1981; MEHLHARDT et al. 1982; TEUBNER 1983; VESELOVA et al. 1985; POPP 1987; POPP 1988; KOPP et al. 1989; KÖHLER et al. 1991; LAMBING 1992; FUCHSHOFEN 1994; HUTTER et al. 1994; MEIERHANS 1994; SCHULZE BÖCKENHOFF

1994; AMENDA et al. 1997; STRUBE et al. 1999a; STRUBE et al. 1999b; KÖHLER 2000; STRUBE et al. 2000; STRUBE et al. 2001b; STRUBE et al. 2001a; STRUBE et al. 2001c; STRUBE et al. 2002).

Das Wort ‚Fluoreszenz‘ in der Verfahrensbezeichnung wurde verwendet, um auf die größere Wellenlänge des emittierten Lichts im Verhältnis zum anregenden Licht hinzuweisen. Es ist jedoch auch üblich, die Bezeichnung Fluoreszenz ausschließlich für Emissionen im Zeitbereich bis 10^{-4} Sekunden nach der Anregung zu verwenden. Möchte man diese Konvention beibehalten, könnte das hier beschriebene Verfahren als Lumineszenz-Anregungs-Spektroskopie bezeichnet werden, da der untersuchte Zeitbereich der Emission Sekunden oder Minuten betragen kann. Im Englischen wird auch die Bezeichnung ‚delayed luminescence‘ verwendet. Im nachfolgenden Text wird deshalb auch die Bezeichnung Lumineszenz für die Lichtemission der Probe verwendet. Allerdings sollte man sich bewußt sein, daß trotz der Wortverwandschaft mit der Bio-Lumineszenz, einer aktiven Lichtemission mancher Organismen auf Basis einer Luziferin-Luziferase-Reaktion, das hier beschriebene und ausgenutzte Phänomen keine Gemeinsamkeiten mit der Bio-Lumineszenz aufweist.

4.2.1.2 Ursachen der Lumineszenz

Die Einstrahlung von Energie in Form von Licht wird Moleküle mit passenden Energieniveaus in einen angeregten Zustand bringen. Nach kurzer Zeit wird die Energie wieder abgegeben. Durch den Übergang aus dem angeregten Zustand in Zwischenniveaus ist bei der Emission eine andere Energieverteilung als bei der Anregung möglich, d.h. die Emission kann langwelliger sein als die Anregung. Während ein angeregtes Energieniveau seine Energie relativ rasch abgibt ($t \sim 10^{-9}$ s) ist die Energieverteilung auf Zwischenniveaus von Verzögerungen begleitet. Stehen für die Energie der Zwischenniveaus wiederum Moleküle zur Absorption zur Verfügung, so kann ein interner Austausch auftreten, ohne daß nach außen hin ein Photon austritt. Pflanzliche Moleküle sind oft Makromoleküle mit einer Vielzahl von Zwischenniveaus. Wird pflanzliches Material als ein riesiger Komplex von Biopolymeren und anderen Stoffen angesehen, so sind neben kurzfristigen viele mittel und langfristige interne Energieaustauschprozesse zu erwarten, die den Zeitbereich von Sekunden und Minuten für die verzögerte Lumineszenz plausibel erscheinen lassen.

Welche Energieniveaus in welchem Zeitbereich beteiligt sind, kann man sich als durch die am Stoffkomplex beteiligten Substanzen und durch das Gefüge ihres Zusammenhangs bestimmt vorstellen. Unterschiede im Spektrum können so als Verschiedenheiten im inneren Gefüge der

Probe gedeutet werden.

Die Lumineszenz pflanzlicher Proben war zunächst als Eigenlumineszenz beobachtet worden (COLLI et al. 1954; COLLI et al. 1955; AGAVERDIYEV et al. 1965; KONEV et al. 1965; MAMEDOV et al. 1969; RUTH et al. 1976; POPP et al. 1979). Popp verband Eigenlumineszenz und verzögerte Lumineszenz in einem theoretischen Konzept (POPP 1980; POPP 1984; POPP 1985; POPP 1986). Popp's Arbeiten waren ursprünglicher Anlaß für die hier beschriebenen Untersuchungen. Die in diesem Bericht vorgestellte Methode konzentriert sich jedoch auf das Anregungsspektrum von Proben und seine Veränderungen durch die Kulturbedingungen.

4.2.1.3 Aspekte der Ganzheitlichkeit

Die hier behandelte Untersuchungsmethode arbeitet völlig (bei Weizen) oder weitgehend (bei Möhren) zerstörungsfrei. Insofern ist es gerechtfertigt, von der Untersuchung ganzer oder intakter Proben zu sprechen und damit die Bezeichnung „ganzheitlich“ in Anspruch zu nehmen.

Ein weiterer Aspekt von Ganzheitlichkeit kann in der Komposition von Stoffen und ihrer Struktur zum Gesamtgefüge einer einzelnen Pflanze gesehen werden. Das mit der hier beschriebenen Methode gemessene Spektrum kann als summarische Reaktion des Gefüges der Pflanzenmatrix verstanden werden. Einige Korrelationen zwischen Spektraldaten und aus der Matrix extrahierbaren Stoffen weisen darauf hin, daß die stoffliche Zusammensetzung in das Ergebnis eingeht. Ob die stoffliche Zusammensetzung allein das Ergebnis bestimmt, läßt sich gegenwärtig nicht beantworten. Es könnte sein, daß die Lichtemission zusätzlich von der zellulären oder molekularen Struktur bestimmt wird. Die Frage wird vorläufig offen gelassen und unterstellt, daß beides, Stoff und Struktur, als Gefüge einer Pflanze auf die Kulturbedingungen reagieren und im Spektrum einen Abdruck ergeben können.

Ein weiterer Aspekt von Ganzheitlichkeit kommt in solchen Meßgrößen zum Ausdruck, die nur an der unzerstörten Probe meßbar sind, wie z.B. Keimfähigkeit oder Keimkraft. Beim vorliegenden Untersuchungsverfahren handelt es sich um eine solche ganzheitliche Meßgröße beim Grad der "Samenartigkeit" oder Samenruhe, die im Gelb/Blau-Verhältnis des Meßparameters R40 und einigen anderen Meßgrößen zum Ausdruck kommt (Einzelheiten siehe weiter unten).

Man könnte die Ganzheitlichkeit der Untersuchung unter dem Aspekt in Zweifel ziehen, daß sie nur die Oberfläche der Probe erfasse und nicht das gesamte Volumen. Insofern könne eine chemische Analyse einer gemahlten Probe umfassender sein. Zu der Frage, inwieweit sich Anregung und

Emission auf die Oberfläche der Probe beziehen oder auch tiefere Schichten der Probe erreichen, wurden erst wenige Untersuchungen durchgeführt. Ein erster Hinweis auf eine Antwort kann sein, daß sich die Ergebnisse nicht wesentlich unterscheiden, wenn Möhren in ganzer oder in aufgeschnittener Form gemessen werden. Wie tief Licht in die Probe eindringt, wird grundsätzlich auch von der Probenart abhängen. Die Untersuchungen zum Einfluß des Wassergehalts von Weizen auf einzelne Meßparameter legen nahe, daß die kurzfristige Lumineszenz (Mw1w) stärker von der Kornoberfläche, die mittelfristige Lumineszenz eher mit den tieferen Kornschichten in Beziehung steht. Hier ließen sich interessante Untersuchungen anschließen.

4.2.2 Messmethoden

4.2.2.1 Messanordnung

4.2.2.1.1 Meßprinzip

Die zu prüfende Probe wird durch definierte Beleuchtung optisch angeregt. Das nach Anregungsende von der Probe emittierte Licht (induzierte verzögerte Fluoreszenz) wird gemessen. Zur Messung befindet sich die Probe in einer lichtdichten Meßkammer. Das Licht einer externen Quelle gelangt durch einen Verschuß zur Probe. Mittels Photovervielfacher wird die verzögerte Lumineszenz der Probe gemessen.

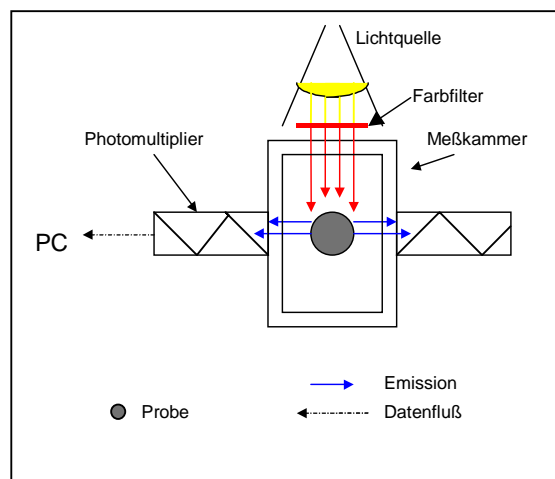


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Messanlage. Die Probe im Inneren der Meßkammer wird für definierte Zeit optisch angeregt und ihre verzögerte Lumineszenz mittels Photovervielfacher gemessen.

Die optische Anregung erfolgt mit konstanter Helligkeit für eine definierte Zeit (Anregungsphase). Eine Meßphase umfaßt 100 einzelne Meßwerte. Bei 10 Sekunden Meßdauer wird ein Meßwert je

0,1 Sekunde erfaßt (bei 50 Sekunden entsprechend alle 0,5 Sekunden).

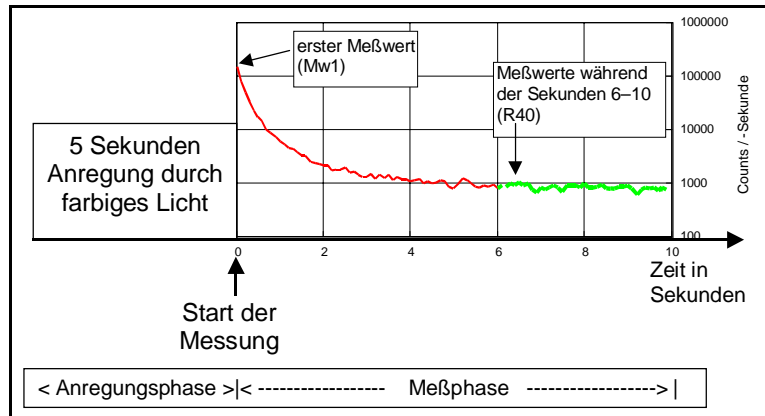


Abbildung 30: Zeitschema des Meßablaufs.

Nach der Anregungsphase ergibt sich ein abklingender Intensitätsverlauf der Emission. Die Zuordnung der im Text verwendeten Kurzbezeichnungen Mw1 und R40 ist angegeben.

Die Emission der Probe ist nach der Anregung am höchsten und klingt allmählich ab, wobei nach einigen Sekunden, je nach Probenart, eine relativ konstante Emission auftritt.

4.2.2.1.2 Meß-Zyklus

Zur Messung von Spektren erfolgt die optische Anregung (engl. excitation) sequentiell in 7 verschiedenen spektralen Abschnitten des sichtbaren Bereichs und im nahen UV (d.h. insgesamt von 780 nm bis 360 nm). Die Messung der verzögerte Emission (engl. emission) erfolgt breitbandig, wobei die Meßbandbreite (260 nm – 850 nm) durch die Photokathode und das Fenstermaterial bestimmt ist.

Die sequentielle Anregung der Probe erfolgt in spektralen Abschnitten mit den Lichtfarben Dunkelrot (RG715), Rot (RG630), Hellrot (OG590), Gelb (OG530), Grün (VG6), Blau (BG12), UV (UG11) sowie breitbandig durch weißes Licht (farblos = ohne Filter). Nach jeder einzelnen Anregung erfolgt eine Messung der verzögerten Fluoreszenz der Probe.

Die folgende Abbildung zeigt die Emission einer Probe während eines Meßzyklus, d.h. in 8 aufeinander folgenden Meßphasen nach jeweils 5 Sekunden Anregung. Nach jeder Anregungs-Farbart ergibt sich eine unterschiedliche Emission. Die letzte Anregung innerhalb des Meßzyklus erfolgt durch weißes Licht.

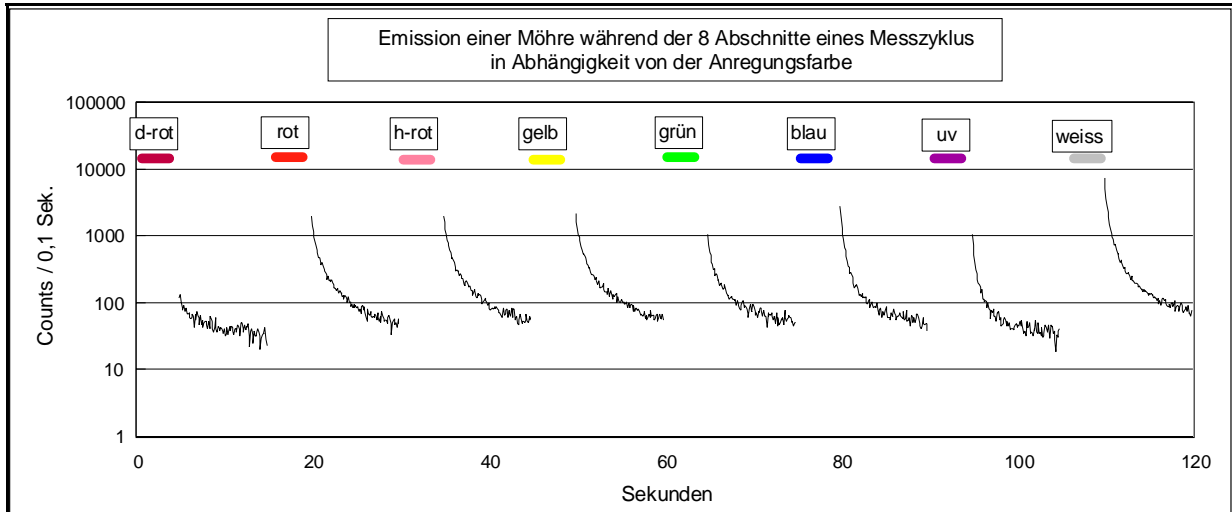


Abbildung 31: Emission einer Möhre, Erklärung siehe Abbildung 32

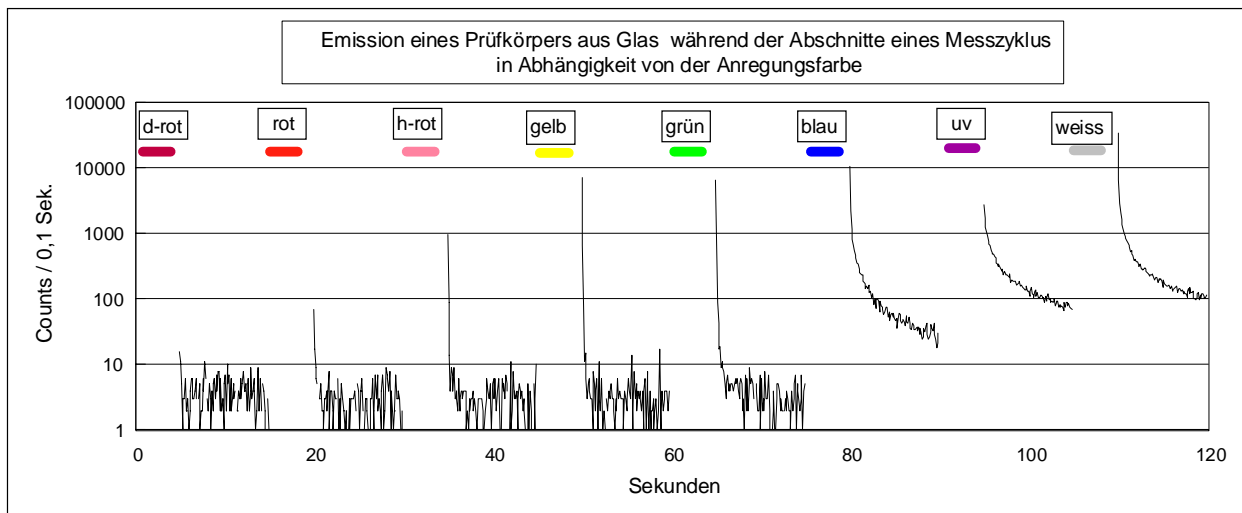


Abbildung 32 Emission eines Prüfkörpers

Meßzyklus aus 8 Anregungsphasen und 8 Meßphasen. Den 7 Anregungsphasen mit Licht aus Teilbereichen des sichtbaren Spektrums folgt die 8. Anregungsphase mit weißem Licht. Die induzierte Fluoreszenz der Probe ist jeweils unmittelbar nach der Anregung am intensivsten und klingt dann ab. Je nach Probenart ergeben sich unterschiedliche Emissionsverläufe. In der oberen Grafik sind die Anregungsphasen farblich angedeutet.

Die optische Anregung der Probe findet jeweils unmittelbar vor den Meßphasen statt. Nach der ersten Anregung (im dunkelroten Abschnitt des sichtbaren Spektrums) ist die verzögerte Emission der Probenarten Weizen und Möhren am geringsten (niedriger Mw1-Wert). Nach der Anregung mit rotem Licht (2. Anregungsphase) ist die Emission bereits deutlich höher. Je nach Probenart treten verschiedene Emissionsprofile auf. Die Emission wird durch Bewertungsgrößen erfaßt, so daß sich die Emissionsprofile quantitativ unterscheiden lassen.

Die Folge der Anregungsfarben ist so gewählt, daß die jeweils spätere Anregung eine stärkere Emission hervorruft als die vorhergehende. Überlagerungseffekte durch nicht ausreichend abgeklungene Emission nach der vorangegangenen Anregung werden damit weitgehend vermieden. Je nach Probenart kann es erforderlich sein, einen definierten Zeitraum für das weitere Abklingen

der Emission vorzusehen.

4.2.2.1.3 Bewertungsgrößen der Emission

Für die Bewertung von Proben wird eine Auswahl von Daten verwandt. Diese Auswahl hängt von der Probenart ab und wird in Voruntersuchungen bestimmt.

Die spektralen Meßdaten jeder Probe werden vollständig erfaßt und archiviert. Für die Auswertung erfolgt eine Datenreduktion durch 3 Verfahren: (i) Extraktion einzelner markanter Daten, (ii) Mittelwertbildung über bestimmte Datenbereiche und (iii) durch Bildung von Maßgrößen für den Kurvenverlauf oder das Emissionsverhältnis. Es handelt sich um folgende Größenarten:

$Mw1_{d-r}$ bis $Mw1_{weiss}$: Meßwert im 1. Meßintervall nach dunkel-roter bis weißer Anregung. Der Zeitbereich des 1. Meßintervalls (von 0,2 bis 0,3 Sekunden nach Anregung) wird hier als kurzfristige Emission bezeichnet.

$R40_{d-r}$ bis $R40_{weiss}$: Mittelwert der Meßwerte in den Intervallen 61 – 100 nach dunkel-roter bis weißer Anregung. Dieser Zeitbereich von 6 bis 10 Sekunden nach Anregung wird hier als mittelfristige Emission bezeichnet.

$R40_{rel}/R40_{gelb/blau}$: Verhältniss der R40-Werte nach Anregungen in zwei unterschiedlichen Spektralabschnitten; ein häufig verwendeter Spezialfall ist der Quotient $R40_{gelb}/R40_{blau}$

$ChiE/H50_{d-r}$ bis $ChiE/H50_{weiss}$: Maß für den Kurvenverlauf nach dunkelroter bis weißer Anregung.

Durch die ersten 50 Datenpunkte ($Mw1$ bis $Mw50$) wird nach einer Skalierung eine exponentielle und eine hyperbolische Kurve so berechnet, daß jeweils die quadratische Abweichung (Chi-Quadrat) zu den Datenpunkten möglichst gering wird. Der Quotient der Chi-Quadrat-Werte wird hier als Chi Exp/Hyp 50 (kurz $ChiE/H50$) bezeichnet.

Das Spektrum wird praktisch unabhängig von der Probengröße (Oberfläche), wenn die Fluoreszenz (Emission) nach Anregung in 7 Spektralabschnitten auf die Emission im 8. Spektralabschnitt bezogen wird. Welcher Spektralabschnitt als Referenz dient ist grundsätzlich frei wählbar. Für die Auswertung werden als Referenzen die Emission nach weißem und blauem Licht gewählt. Nach weißer Anregung ist die Emission zumeist am höchsten. Bei Blau als Referenz ist das

Gelb/Blau-Verhältnis im Spektrum besonders einfach ablesbar.

4.2.2.1.4 Spektrenbeispiel

Ein Spektrum von Möhren und Weizen zeigt die folgende Grafik. Dargestellt ist die Meßgröße R40 bezogen auf die bei weißer Anregung gemessenen Werte (R40% w).

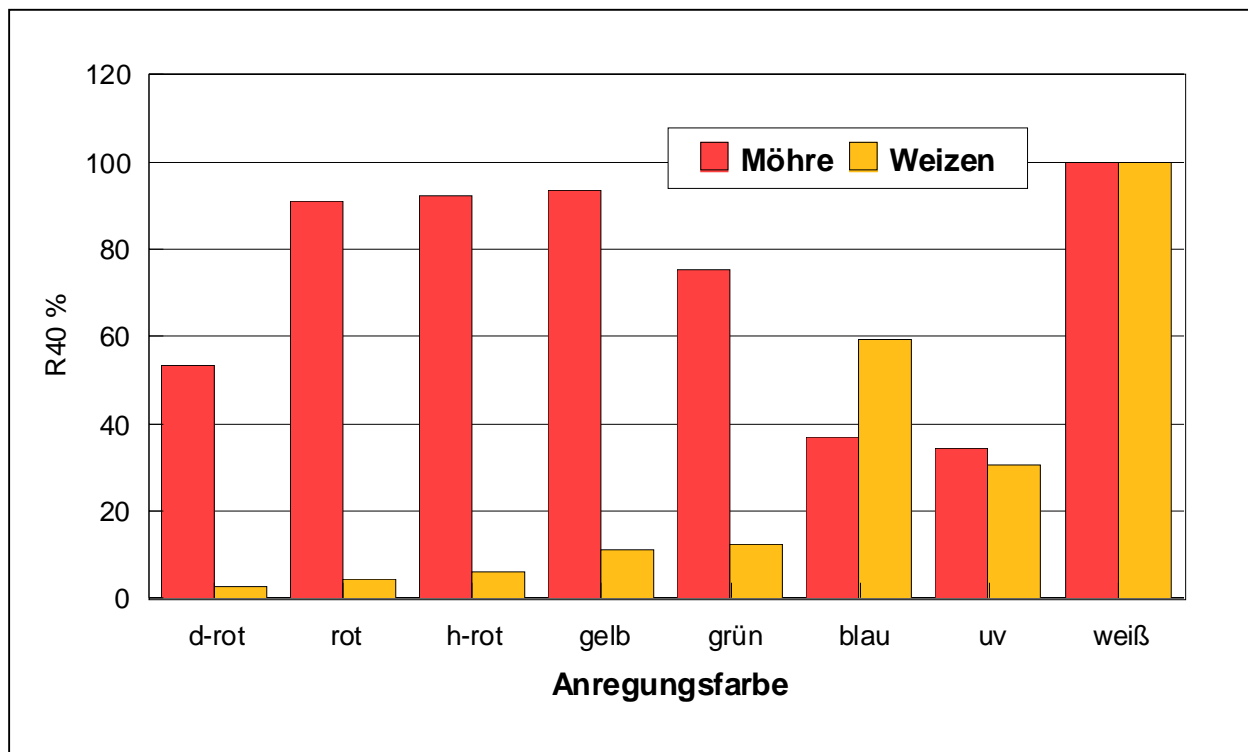


Abbildung 33: Spektren von Möhren und Weizen im Vergleich.

Dargestellt die relative Lumineszenz (Meßgröße R40) der Probe bei den verschiedenen Farben der optischen Anregung bezogen auf Weiss.

Möhren als vegetativer Pflanzenteil zeigen ein breites Spektrum über alle Anregungsfarben mit Betonung des roten, gelben und grünen Bereichs. Weizen als Same zeigt dagegen schwache Anregbarkeit im roten und gelben Bereich und bevorzugte Anregbarkeit durch Blau.

4.2.2.1.5 Abhängigkeit der Messwerte von der Probenoberfläche

Die Meßwerte Mw1 und R40 steigen grundsätzlich (aber nicht ausschließlich) mit der Oberfläche der Probe. Bei Flüssigkeiten (z.B. Eidotter) und Schüttgütern (Samen) ist eine Standardisierung des Probenvolumens möglich. Bei Obst und Gemüse ist eine Standardisierung der Probenoberfläche dagegen erschwert oder unzulänglich möglich.

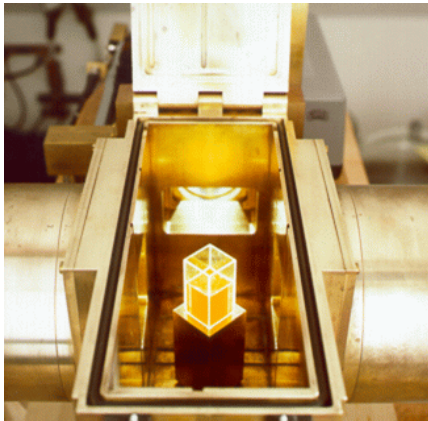


Abbildung 34: Probe mit standardisierbarer Oberfläche (Eidotter) im Probenraum der geöffneten Messkammer des Messgerätes

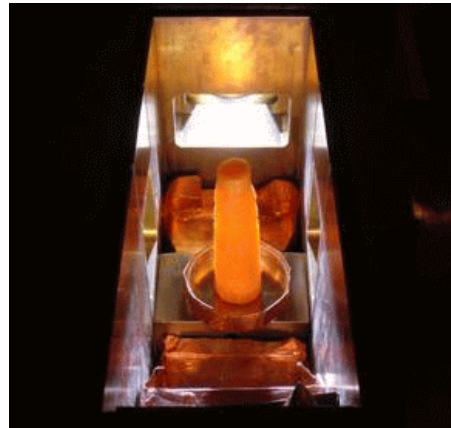


Abbildung 35: Probe mit nicht standardisierbarer Oberfläche (Möhre)

Bei standardisiertem Probenvolumen ist die Bewertung von Absolutwerten der Emission und von Spektren möglich. Bei nicht standardisierbaren Probenoberflächen lassen sich vorwiegend abgeleitete, oberflächenunabhängige Meßgrößen (Relativspektren, Abklingkinetiken) bewerten.

Um die Vergleichbarkeit von Mw1 u. R40 zwischen verschiedenen Proben im Hinblick auf die Oberfläche zu sichern, kommen gleiche Probeneinwaagen oder gleiche Probenvolumina in Betracht. Einzelheiten enthält die jeweiligen, auf die Probenart bezogene Verfahrensbeschreibung.

4.2.2.1.6 Probenmittelwerte und die Messung von Einzelexemplaren

Bei dem vorliegenden Verfahren werden unzerkleinerte Proben gemessen. Das Bilden von Mischproben vor der Messung, zum Ausgleich exemplarbedingter Unterschiede, ist damit auf wenige Probenarten beschränkt. Mischproben lassen sich bei Samen bilden. Wie viele Samen als Mischprobe gemessen werden können, hängt von der Samengröße ab. Bei Weizen sind es mit den gegenwärtig zur Verfügung stehenden Küvetten ca. 90 Körner, bei weißen Bohnen ca. 10 Samen. Dagegen wird bei Möhren pro Meßgang eine Möhre gemessen.

Um dennoch eine für eine Probe repräsentative Anzahl von Exemplaren in die Messung einzubeziehen, wird eine ausreichende Zahl von Einzelexemplaren gemessen und rechnerisch der Mittelwert aus den Einzelexemplaren gebildet. D.h. die bei vielen chemischen Verfahren übliche „mechanische“ Mittelwertbildung durch Zerkleinerung und Homogenisierung wird durch eine mathematische Mittelwertberechnung ersetzt. Dies hat den Vorzug, daß der natürliche

Schwankungsbereich ebenfalls erkannt werden kann.

4.2.2.1.7 Probenvergleiche

Die Beurteilung von Proben basiert auf dem Vergleich von Meßwerten dieser Proben. Für den Vergleich ist die absolute Skalierung der Meßwerte ohne Bedeutung, so lange die angewandte Skalierung bei der Messung aller Proben gleich bleibt. Diese Voraussetzung ist gegeben.

Alle gemessenen Werte sind zunächst geräteinterne Meßgrößen, ähnlich wie bei Untersuchungen mittels HPLC z.B. die Absorption in der Meßzelle eine interne Meßgröße darstellt. So wie bei der HPLC erst durch Bezug auf einen Standard (Kalibrierung) die internen Meßgrößen zu einer Aussage über eine Probe führen, so werden auch bei der FAS durch Bezug der internen Meßgröße auf eine Probe die Meßgrößen interpretierbar. Unterschiede interner Meßgrößen zeigen Unterschiede der Proben.

Meßergebnisse verschiedener Proben einer Art sind miteinander vergleichbar, da sie mit gleicher Geräteeinstellung gemessen werden. Manche Probenarten erfordern unterschiedliche probenspezifische Einstellungen. Beispielsweise ist die Anregbarkeit von Weizen durch weißes und blaues Licht deutlich größer als durch rotes und gelbes Licht. Um dennoch bei sämtlichen Anregungsfarben den linearen Meßbereich optimal nutzen zu können, wird für Weizen bei Rot, Gelb und Grün eine höhere Intensität der Anregung (Lampenhelligkeit) eingesetzt als für die Anregung mit blauem, ultraviolettem oder weißem Licht. Den Unterschied in der spektralen Darstellung zeigt die folgende Grafik.

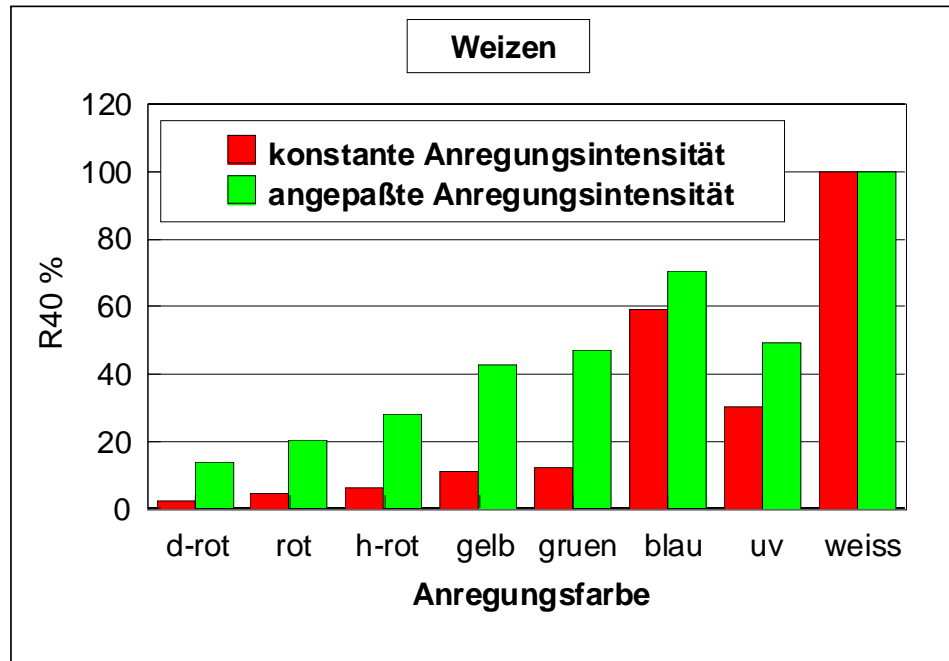


Abbildung 36: Veränderung des Spektrums durch an das Probenmaterial angepaßte Intensität im anregenden Spektralabschnitt. Verminderte Anregungsintensität bei Blau, UV und Weiß führt zu überproportionaler Erhöhung der Werte bei Rot, Gelb und Grün, wenn Weiß jeweils 100% entspricht.

Für die Grafik wurde die Emission R40 nach farbloser Anregung (Weiß) gleich 100 % gesetzt. Durch die Anpassung der Anregungsintensität wird die Emission nach roter, gelber und grüner Anregung relativ stärker angehoben als nach Blau und UV.

Weizen wird bei den nachfolgend dargestellten Untersuchungen grundsätzlich mit angepaßten Intensitäten angeregt. Beim Vergleich von Spektren verschiedener Probenarten ist dieser Unterschied zu beachten; er führt im allgemeinen dazu, daß die Unterschiede von Spektren verschiedenartiger Proben geringer erscheinen, als sie tatsächlich sind.

Durch die grundsätzlich vergleichende Untersuchung und Bewertung lassen sich bislang Proben unterscheiden und bewerten, die gleichzeitig vorliegen und für die vergleichbare Voraussetzungen gegeben sind und bei denen der oder die variierten Parameter bekannt sind. Solche Proben können z.B. die verschiedenen Kulturvarianten bei einer Weizensorte sein. Nach Aufbau einer Datenbank mit Untersuchungsdaten von Möhren und Weizen verschiedenster Herkunft wären auch Vergleiche von Proben denkbar, die nicht gleichzeitig vorliegen oder bei denen der variierte Parameter nicht bekannt ist.

4.2.2.1.8 Gerätebeschreibung

Das Gerät dient der Messung der induzierten verzögerten Fluoreszenz bei optischer Anregung der Proben mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge. Dazu verfügt es über einen lichtdichten Probenraum mit 3 Verschlüssen (Shutter) für die Lichtwege und eine verschließbare Öffnung für die Probenaufgabe. Eine Lichtquelle mit Filtern erzeugt Licht hoher Intensität in definierten Spektralabschnitten.

Einer der drei Verschlüsse gibt den Weg frei für das Licht zur optischen Anregung der Probe. Die zwei weiteren Verschlüsse geben für das von der Probe emittierte Licht den Weg frei zu zwei Photovervielfachern (Photomultipliern).

Die Messung des emittierten Lichts erfolgt durch gekühlte Photovervielfacher. Nach rechnerischer Abschätzung ist zu erwarten, daß bei einer Probenoberfläche von 10 cm^2 Emissionen in der Größenordnung bis herab zu $10 \text{ Photonen/s cm}^2$ erfaßt werden. Vorverstärker und Diskriminatoren sind für die Erfassung von Einzel-Photonen ausgelegt. Die quartzgesteuerte Zeitbasis ermöglicht umschaltbare Zählintervalle. Die gesamte Steuerung des Meßablaufs und die Datenaufnahme erfolgen durch einen PC.

Das Gerät ist ausgelegt für die Messung der Fluoreszenz im Zeitbereich von Sekunden und Minuten nach optischer Anregung der Probe. Der Probenraum ist so groß ausgeführt, daß unzerkleinerte Äpfel und Möhren gemessen werden können.

Die gemessenen Werte und Spektren eignen sich zum Vergleich von Proben, die auf der gleichen Anlage gemessen wurden. Bei Verwendung einer anderen Anlage gleichen Prinzips ist zu erwarten, daß absolute Meßwerte und der Verlauf des Spektrums etwas abweichen werden, was jedoch auf das Untersuchungsprinzip und das Bewertungsverfahren ohne Einfluß bleibt.

Als für die Untersuchung wichtiger Spektralbereich der anregenden Lichtquelle hat sich der rote bis blaue Abschnitt des Spektrums erwiesen. Dieser wird besonders gut durch eine Halogenlampe abgedeckt. Die Emission im nahen UV ist bei Halogenlampen bereits relativ gering. In den Spektren erscheint der UV-Anteil deshalb geringer, als ein Spektroskopiker erwarten wird, der mit Deuteriumlampen als UV-Quelle vertraut ist.

4.2.2.1.8.1 Gerätekomponenten

- Probenraum (Meßkammer) mit pneumatisch betätigten Verschlüssen und elektronischer Fernsteuerung, Sensoren für Temperaturüberwachung, Verschlußstatus und Verschlußzeitenkontrolle, Verschlußsicherung gegen Fehlbedienung, Helligkeitssensor
- 2 Meßköpfe mit Photovervielfachern
- Primär-Peltierkühlung der Photovervielfacher, Sekundärkühlung im Wasserumlaufverfahren, Temperatur-Sensoren für Peltierkühlung und Wasserkühlung
- Lichtquelle für Licht verschiedener Farben, fernsteuerbar in den Funktionen Farbe und Intensität, Positionskontrolle für Filternullstellung
- Hochspannungsgeräte zur Versorgung der Photovervielfacher
- Steuerungsrechner (PC) mit zusätzlichen ISA-Steckkarten zur Steuerung der Anlagenkomponenten und Funktionsüberwachung
- Software zur automatischen Steuerung von Meßabläufen, Datenaufzeichnung und Datenaufbereitung
- Netzspannungsstabilisierung und Netzstörungsfilterung

4.2.2.1.8.2 Technische Daten

- Probe in Küvette mit extrem geringer Fluoreszenz auf Küvettenständer oder freistehend auf Probenhalter in lichtdichter Meßkammer vor Photodetektor
- Beleuchtung der Probe mittels Halogenlampe (Pelekt.=150W) über verschiedene Farbfilter
- für die optische Anregung verwendete Filter (Standardfilter der Fa. Schott): RG715, RG630, OG530, VG6, BG12, UG11
- Anregungsdauer: 5 Sekunden (1 Sekunde bis 20 Minuten einstellbar)

- Emissionsmessung breitbandig, Spektralbereich: ca. 260 - 850 nm (bestimmt durch die S20-Kathode des Photomultipliers und synth. Quarzglas Suprasil für Fenster und Küvette)
- Quanteneffizienz max. 0,2; abhängig von der Wellenlänge (S20-Kathode des Photomultipliers)
- Photodetektor: Photomultiplier EMI 9202 QA selektiert für geringes Rauschen; Durchmesser der Photokathode 48mm, Hochspannungserzeugung mit Thorn EMI PM28B, nachgeschaltete Elektronik für Single-Photon-Counting mit Thorn EMI Amplifier Discriminator C604-A
- Eigenrauschen: ca. 1,3 Counts/100 mS
- Fenster: Quarzglas-Suprasil
- Meßbeginn: 200 mS nach Beleuchtungsende
- Countintervall: einstellbar von 10 mS bis 20 Sek.
- Meßdauer: 100 Countintervalle (nach jeder Beleuchtungsperiode)
- Meßwerte: Meßwerte werden in Counts je Countintervall angegeben

4.2.2.2 Bewertungsverfahren

Bei der Bewertung der Daten ist zu unterscheiden zwischen Samen und eher vegetativen Pflanzenteilen wie Früchten oder Wurzelfrüchten. Die Bewertung beruht auf empirischen Beziehungen zwischen Spektraldaten und bekannten Eigenschaften von Proben. Sie lassen sich durch ein einfaches Schema ausdrücken (siehe Abbildung 37).

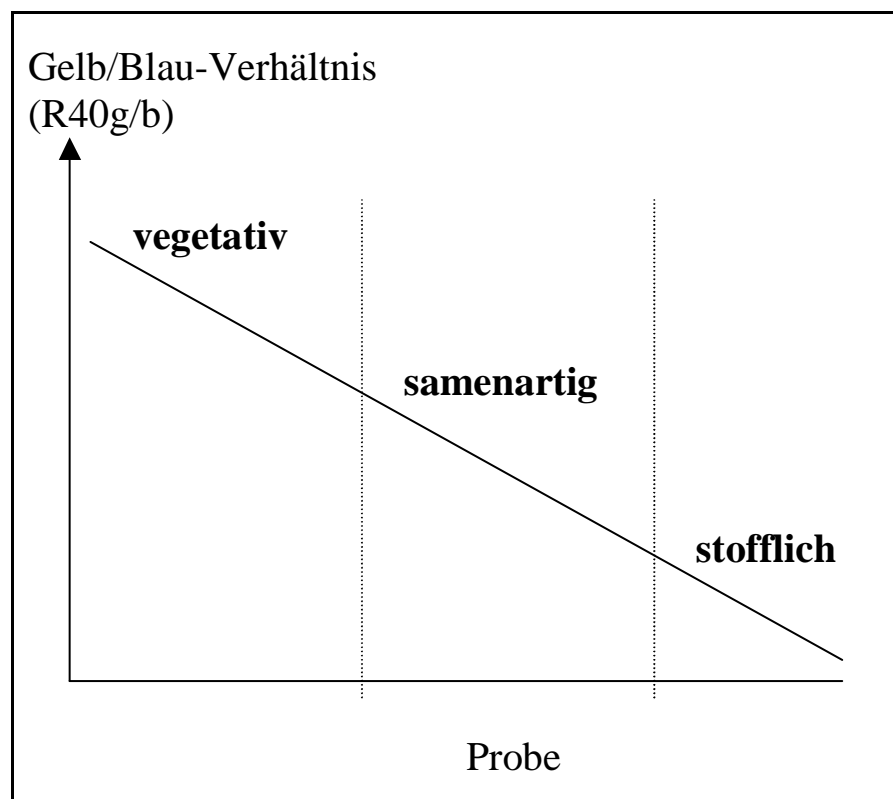


Abbildung 37: Abhängigkeit des Gelb/Blau Verhältnisses von der Probenart
Vegetative Pflanzenteile (Blätter, Früchte, Wurzelfrüchte) unterscheiden sich von Samen im Quotienten der Meßwerte R40gelb/R40blau. Bei Einzelsubstanzen liegt der R40gelb/blau besonders niedrig. Die Werte von Weizen variieren bei gleicher Sorte und gleichem Standort in Abhängigkeit vom Kulturverfahren im samenartigen Bereich.

Diese Beziehung wurde extrahiert aus Spektraldaten verschiedener Proben. Ein Beispiel zeigt die folgende Grafik.

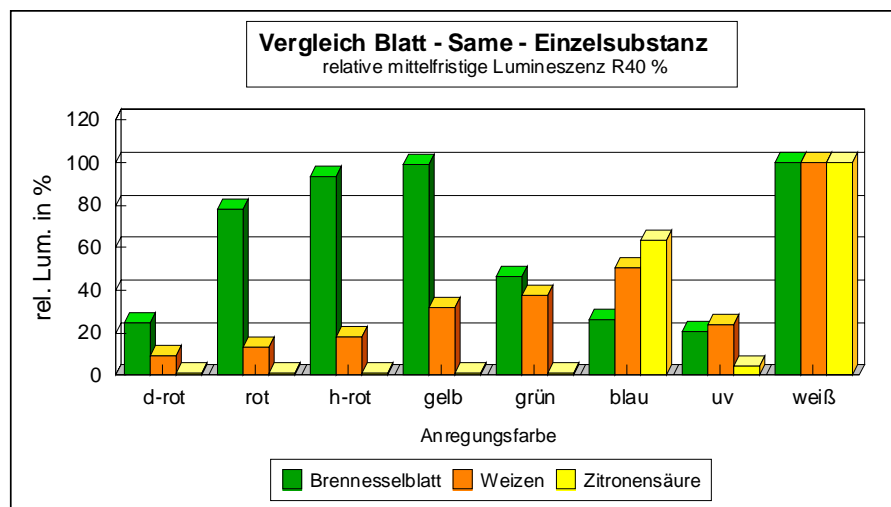


Abbildung 38: Spektrum in Abhängigkeit von der Probenart

Samen (hier repräsentiert durch Weizen) stehen mit ihrer Anregbarkeit durch verschiedene Lichtfarben zwischen vegetativem pflanzlichem Material (hier repräsentiert durch ein Brennesselblatt) und chemischen Einzelsubstanzen (hier repräsentiert durch Zitronensäure) (STRUBE et al. 1999a). Der Unterschied der Spektren läßt sich prägnant durch das Verhältnis der Emissionen nach gelber und blauer Anregung ausdrücken.

Für Samen gilt grundsätzlich, daß ihr Gelb/Blau-Verhältnis schwanken kann. Ein bestimmter Same wird bei hohem Wassergehalt ein hohes Gelb/Blau-Verhältnis zeigen und umgekehrt. Innerhalb des samenartigen Bereichs sind die Verhältnisse reversibel. Bei Keimung geht das Gelb/Blau-Verhältnis des Samens wie zu erwarten in den vegetativen Bereich über und wird irreversibel. Entsprechendes gilt bei zu starker Erhitzung des Samens. Er geht dann irreversibel in den stofflichen Bereich des Gelb/Blau-Verhältnisses über.

Bei Äpfeln entspricht die Ausprägung nach diesem Schema ihrer morphologischen Differenzierung. Mit zunehmender Reife nimmt die morphologische Differenzierung der Frucht zu, der Fruchtkörper wird im Gelb/Blau-Verhältnis vegetativer, zugleich werden die Apfelkerne stärker samenartig (STRUBE et al. 2002). Ob dies auch für andere Probenarten gilt, bleibt zu untersuchen.

Unter gleichen Meßbedingungen lassen sich Samen am Gelb/Blau-Verhältnis unterscheiden. Vermutlich entspricht ein geringes Gelb/Blau-Verhältnis einem höheren Grad von "Samenartigkeit" oder Samenruhe (Dormanz). Von dieser Unterscheidungsmöglichkeit wird bei der Differenzierung von Weizen aus konventionellem und ökologischem Anbau Gebrauch gemacht. Zusammen mit dem Gelb/Blau-Verhältnis verändern sich bei Samen zumeist weitere Spektraldaten in charakteristischer Weise. Die sind insbesondere Mw1w, R40w und ChiE/H50w.

Die Beziehung zwischen einem geringen Gelb/Blau-Verhältnis bei R40 und dabei hohem Mw1 zeigen die folgenden beiden Grafiken.

Je nach Umständen kann die Differenzierung zwischen Proben bei den weiteren Meßgrößen manchmal sogar deutlicher sein. Es hat sich deshalb als sinnvoll erwiesen, die weiteren Meßgrößen

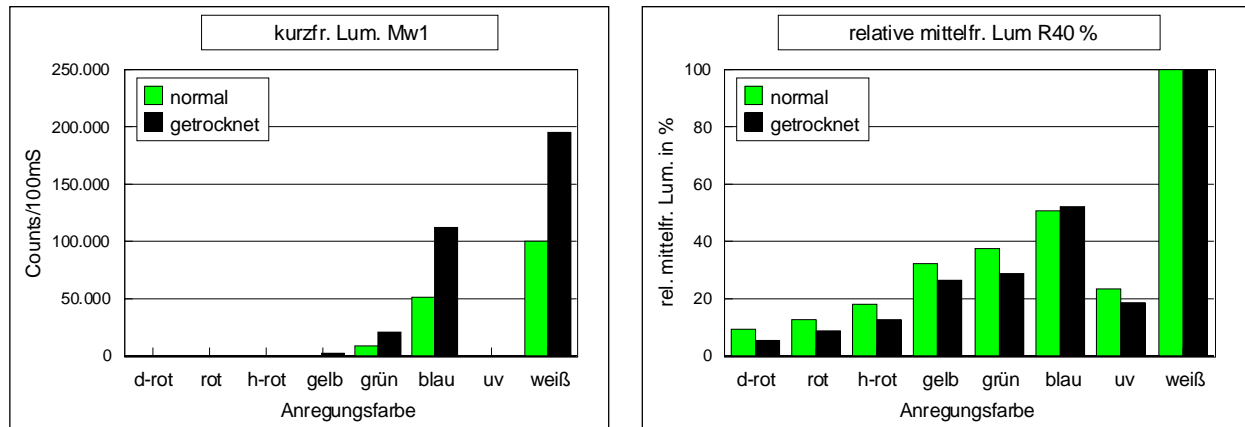


Abbildung 39 Samen (hier Weizen) zeigen bei geringerem Wassergehalt eine höhere kurzfristige Lumineszenz (Mw1) und eine schmalbandigere, blaubetontere Anregbarkeit bei der relativen mittelfristigen Lumineszenz (R40% w).

in die Auswertung einzubeziehen. Für Samen wurde versucht, diese Meßgrößen in einem "Index der samentypischen Ausprägung" zusammenzufassen, der weiter hinten eingeführt wird. Auf weitere Einzelheiten wird an entsprechender Stelle des Berichts im Zusammenhang mit ergänzenden Daten eingegangen.

Für Möhren lagen bisher weniger Erfahrungen vor. Eine Arbeitshypothese für die vorliegende Untersuchung bestand darin, daß Möhren als vegetativer Pflanzenteil sich durch ein hohes Gelb/Blau-Verhältnis auszeichnen könnten. Dies hat sich bestätigt. Allerdings ist das Gelb/Blau-Verhältnis nur eine der möglichen Meßgrößen. Bei Samen variiert es relativ deutlich. Bei Möhren hat sich gezeigt, daß je nach Anbaum Umständen andere Meßgrößen deutlicher reagieren.

4.2.3 Stand der Methoden zu Projektbeginn

Die Aufgabe des vorliegenden Projektes ist es zu zeigen, ob es möglich ist Weizen bzw. Möhren aus unterschiedlichen Kulturverfahren meßtechnisch zu differenzieren.

In Folge des zunehmenden Interesses für den organischen Landbau wurde 1981 mit Untersuchungen begonnen, ob sich unterschiedliche Kulturbedingungen mittels der ultraschwachen Photonenemission (RUTH et al. 1976) an Pflanzen feststellen lassen (TEUBNER et al. 1981; MEHLHARDT et al. 1982; TEUBNER 1983; VESELOVA et al. 1985; POPP 1987; POPP 1988; KOPP et al. 1989; POPP 1989; KÖHLER et al. 1991; LAMBING 1992; FUCHSHOFEN 1994; HUTTER et al. 1994; MEIERHANS 1994; SCHULZE BÖCKENHOFF 1994).

Pflanzliches Material emittiert Licht geringer Intensität, nachdem es beleuchtet (optisch angeregt wurde). Die Lichtemission (ultraschwache Photonenemission) tritt breitbandig im Spektralbereich von 190 – 800 nm auf und klingt zeitlich ab (delayed luminescence) (RUTH 1977).

Während anfangs für die Unterscheidung pflanzlicher Proben nach ihren Kulturbedingungen die Intensität und die Abklingkinetik der Emission nach optischer Anregung durch weißes Licht untersucht wurden (TEUBNER 1983; KÖHLER et al. 1991; LAMBING 1992), erwies es sich später als aussagekräftiger, die Anregung mit weißem Licht durch Anregung mit verschiedenen Farben zu ergänzen (STRUBE et al. 1999a).

Der Vergleich von mineralisch und organisch gedüngten Pflanzen durch Messung der Photonenemission nach optischer Anregung durch weißes Licht führte zu widersprüchlichen Ergebnissen. In einigen Fällen war die höhere Emission der organischen Düngung, in anderen Fällen der mineralischen Düngung zuzuordnen. Eine Literaturstudie der bis 1993 verfügbaren Arbeiten kam deshalb zu dem Ergebnis, dass die gemessenen Unterschiede zwar zumeist die Düngungsweisen trennten, jedoch eine durchgehende Systematik der Messgröße zur Düngungsart fehlte (WOESE et al. 1995).

Die widersprüchlichen Ergebnisse konnten aufgeklärt werden, als die Anregung mit weißem Licht durch Anregungen mit verschiedenen Farben erweitert wurde. Intensitätsmessungen im Zeitbereich von > 1 Sekunde nach farbiger optischer Anregung (Rot bis nahes UV 780 – 360 nm) zeigten, dass Samen nach blauer Anregung intensiver strahlten und weniger nach roter und gelber. Blätter und Früchte dagegen strahlten nach roter und gelber optischer Anregung stärker und schwächer nach blauer (siehe Abbildung 40).

Bei organischer Düngung von Pflanzen nimmt bei Blättern und Früchten die Emission nach gelber Anregung zu, bei Samen dagegen ab. Nach blauer Anregung ist es umgekehrt. Bei Anregung durch weißes Licht überlagern sich die Effekte und können zu widersprüchlichen Ergebnissen führen.

Daraus ergab sich, dass Früchte und Samen getrennte Auswertekriterien erfordern. Zusätzlich ließ sich die Abhängigkeit der Intensität von der Probengröße durch Normierung der Emission nach farbiger Anregung auf die Emission nach weißer Anregung umgehen. Durch diese Normierung entstehen Spektren, die auch den Vergleich verschieden großer Proben ermöglichen (STRUBE et al. 1999a). Messtechnisch ausgedrückt, wurde damit die Messung der ultraschwachen Photonenemission zu einer Form der bekannten Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie.

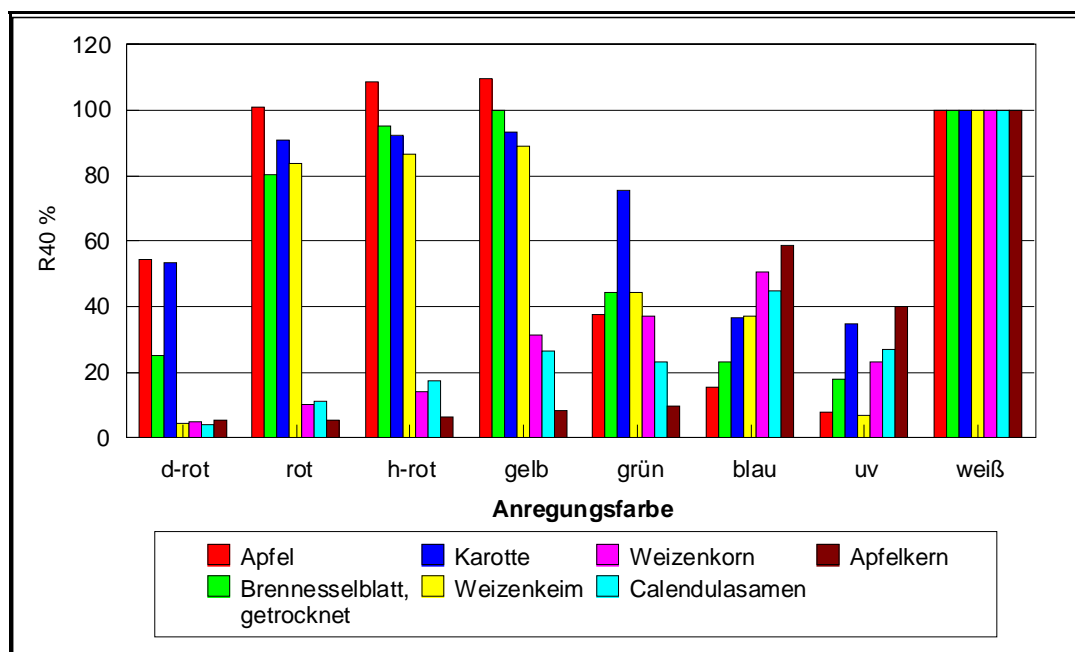


Abbildung 40: Samen (hier Weizen, Apfelkerne, Calendulasamen) emittieren stärker nach blauer Anregung, hingegen emittieren Früchte, Blätter und Keimlinge (Apfel, Brennesselblatt, Karotte, Weizenkeimling) stärker nach roter und gelber Anregung. Die jeweilige Emission ist bezogen auf die Emission nach weißer Anregung.

Die ultraschwache Photonenemission in Form der Anregungs-Spektroskopie wurde in Vergleichsstudien unterschiedlicher Anbaumethoden eingesetzt. Beim Vergleich von Anbau in Hydrokultur und in Erde bei Bohnen wurden die Proben unter Blindbedingungen den Kulturformen und der Saatgutherkunft (ökologisch und konventionell) richtig zugeordnet (STRUBE et al. 2000). Bei Äpfeln wurden die fünf vorkommenden Reifestadien unter Blindbedingungen richtig ermittelt. Auch bei Untersuchungen zur Wirkung von unterschiedlich intensivem Licht und der Auswirkung biologisch-dynamischer Präparate auf das Wachstum von Äpfeln konnten die Proben systematisch getrennt werden (BLOKSMA et al. 2001a; BLOKSMA et al. 2001b). Bei Calendulasamen wurden

die Anbauformen konventionell, kontrolliert ökologisch und biologisch-dynamisch unter Blindbedingungen getrennt und sachgemäß zugeordnet (STRUBE et al. 2001c). Die Messtechnik ist inzwischen so stabil, dass bei Auswertung der Abklingkinetik in Untersuchungen des gleichen Probenmaterials (Äpfel) bei zwei verschiedenen Arbeitsgruppen mit verschiedenen Geräten unter Blindbedingungen die gleichen Probenreihenfolgen ermittelt wurden (BLOKSMA et al. 2001a).

Obwohl das Verfahren vielfach angewandt wurde, existierten kaum rein methodische Arbeiten. Es fehlten Grundlagenarbeiten über Verfahrenseinzelheiten sowie Präzision, Reproduzierbarkeit und Stabilität der Methode. Ziel des Teilprojektes ist es daher, die Methode der Anregungs-Spektroskopie der ultraschwachen Fluoreszenz zu dokumentieren und in Untersuchungen an Probenmaterial aus wissenschaftlich kontrollierten Anbauversuchen zu validieren. Darauf aufbauend könnten Spektren verschiedener Probenarten mit bekannten Herkunftsbedingungen in einer Datenbank gesammelt werden und die Basis für zukünftige Vergleiche und Bewertung von pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedlichster Anbauform bilden. Das weitere in den Spektren enthaltene Informationspotenzial ließe sich nutzen.

4.2.4 Vorversuche und Begleituntersuchungen

Hier werden die Untersuchungen zu einigen methodischen Varianten und Einzelfragen der Optimierung der Probenvorbereitung dargestellt, die vor und während des Validierungsprozesses durchgeführt wurden.

4.2.4.1 Weizen

Für Weizen wurden mehrere Entfeuchtungs- und Äquilibrierungsverfahren untersucht. Eine Trocknung bei Raumtemperatur ist mit mehr als 6 Wochen zu zeitaufwendig. Die Trocknung bei vermindertem Druck erfordert ca. 2 Wochen und damit etwa gleich viel wie bei Normaldruck und erhöhter Temperatur über Silicagel. Die Art des Trocknungs- u. Äquilibrierungsverfahrens ist praktisch von geringem Einfluß auf das Ergebnis, wie eine weiter hinten dargestellte Untersuchungsreihe zeigt. Dennoch wurde ein Standardverfahren definiert und eingesetzt.

4.2.4.1.1 Untersuchung des Einflusses des Wassergehalts der Proben

Der Wassergehalt von Getreide steht mit der Luftfeuchtigkeit der Umgebung im Gleichgewicht. Bei hoher Luftfeuchtigkeit nimmt das Getreide entsprechend Feuchtigkeit auf. Der Einfluß des Feuchtegehalts auf die Meßwerte wurde untersucht.

Material

Die Untersuchung wurde zeitgleich an 10 Weizenproben durchgeführt. Es wurden verschiedene Sorten verwendet, wobei einzelne Sorten zudem von mehreren Standorten kamen. Dadurch sollte ein eventuell sortenspezifisches Ergebnis vermieden werden.

Methode

Teilproben wurden in gemeinsamer Atmosphäre (Exsikkator) über frisch aktiviertem Silicagel getrocknet und dadurch zugleich äquilibriert. Zur beschleunigten Trocknung der Proben wurde der Exsikkator auf 40°C erwärmt.

Vor Meßbeginn (d.h. im Anlieferzustand der Proben) und während des Untersuchungszeitraums erfolgten Gewichtsbestimmungen und FAS-Messungen. Gewichtsminderungen des Weizens wurden in Anlehnung in die ICC-Standardmethode 110 als Wasserverlust interpretiert.

Die Untersuchungen wurden nach der weiter hinten beschriebenen Methode durchgeführt. D.h. vor einer Meßreihe wurden sämtliche Teilproben in luftdicht verschlossene Glasbehälter überführt. Für die Dauer der Messung befand sich der Küvetteninhalt in Kontakt zur Umgebungsluft. Nach der Messung wurde der Küvetteninhalt wieder in den zugehörigen luftdicht verschlossenen

Glasbehälter überführt. Nach Beendigung einer Meßreihe wurden sämtliche Teilproben zur weiteren Trocknung erneut in den Exsikkator gegeben.

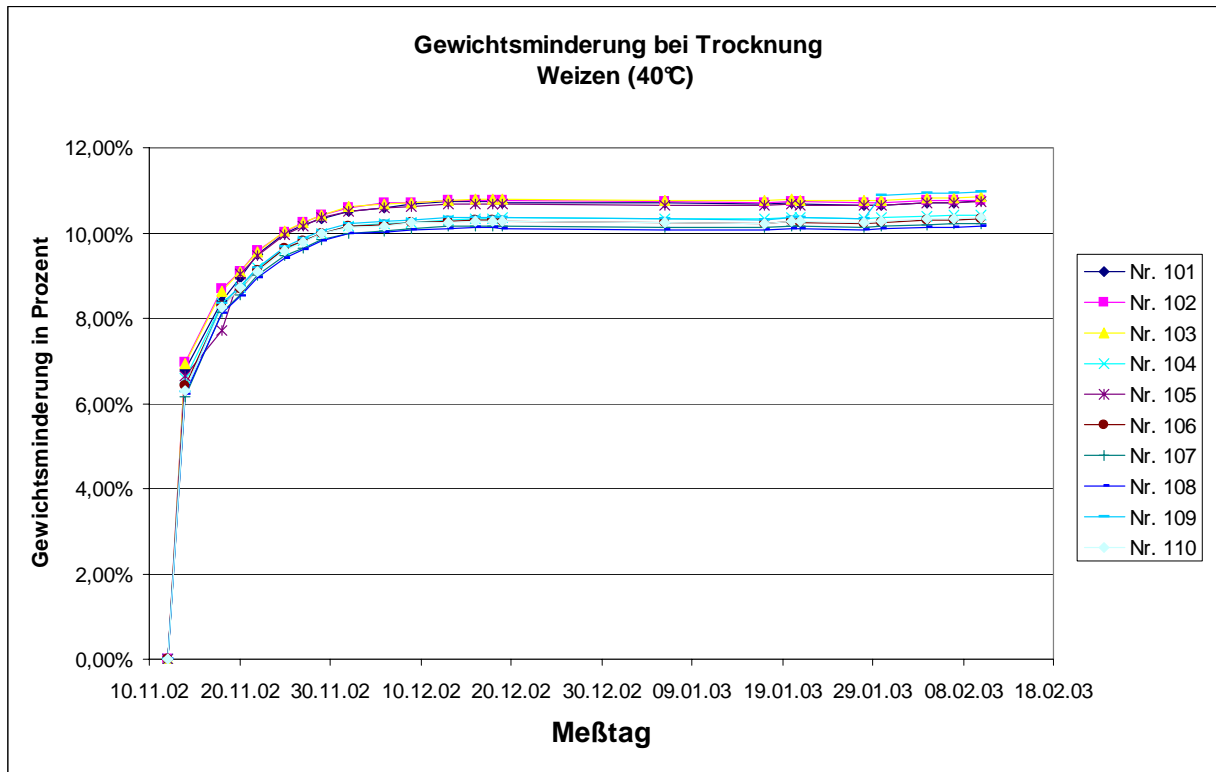


Abbildung 41

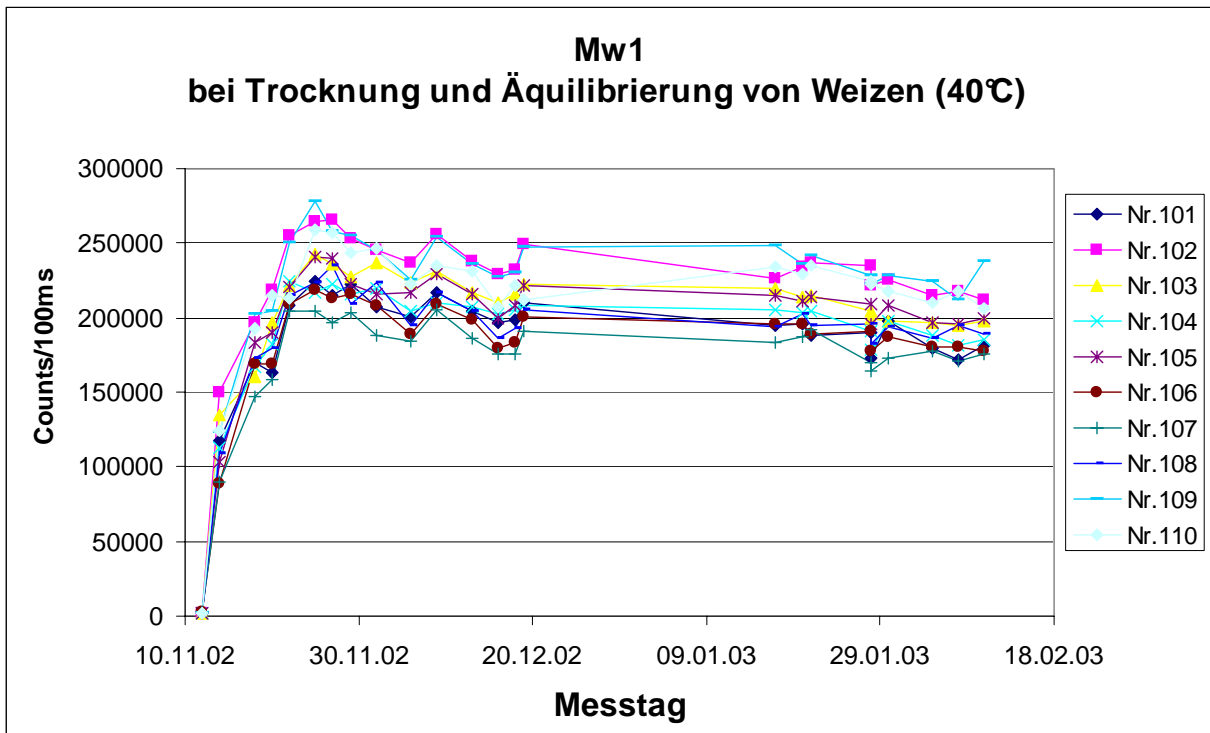


Abbildung 42

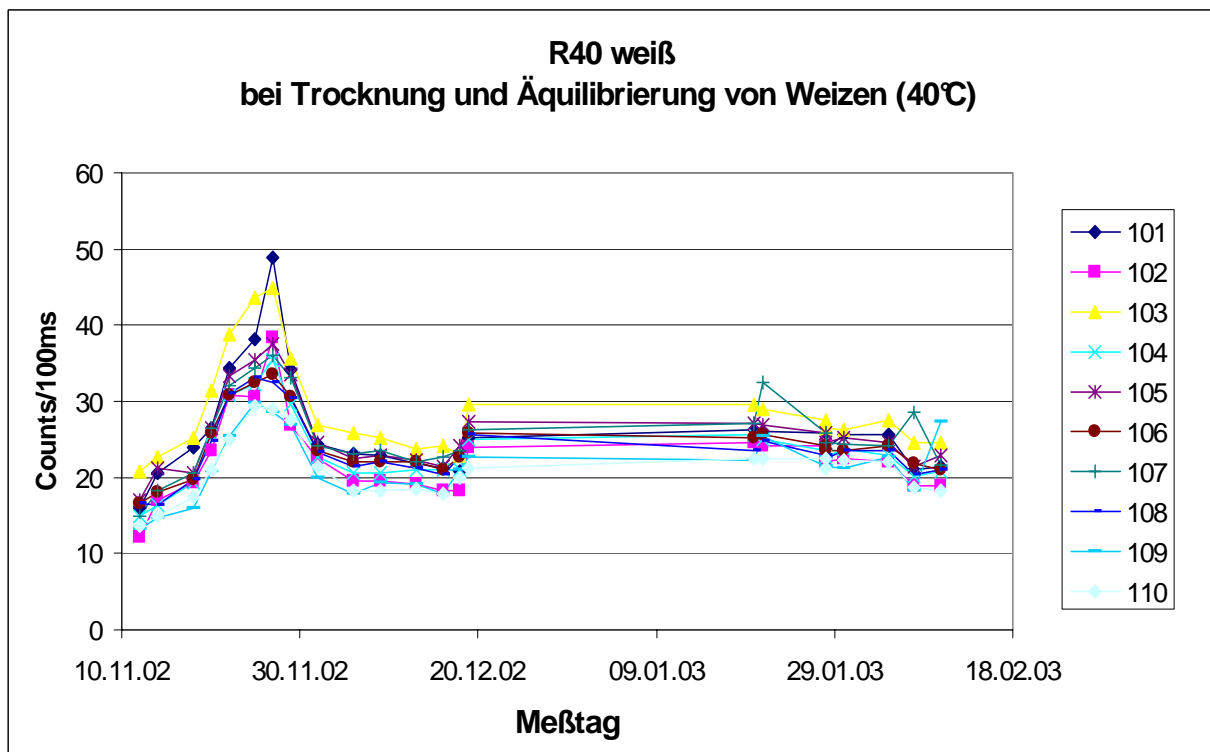


Abbildung 43

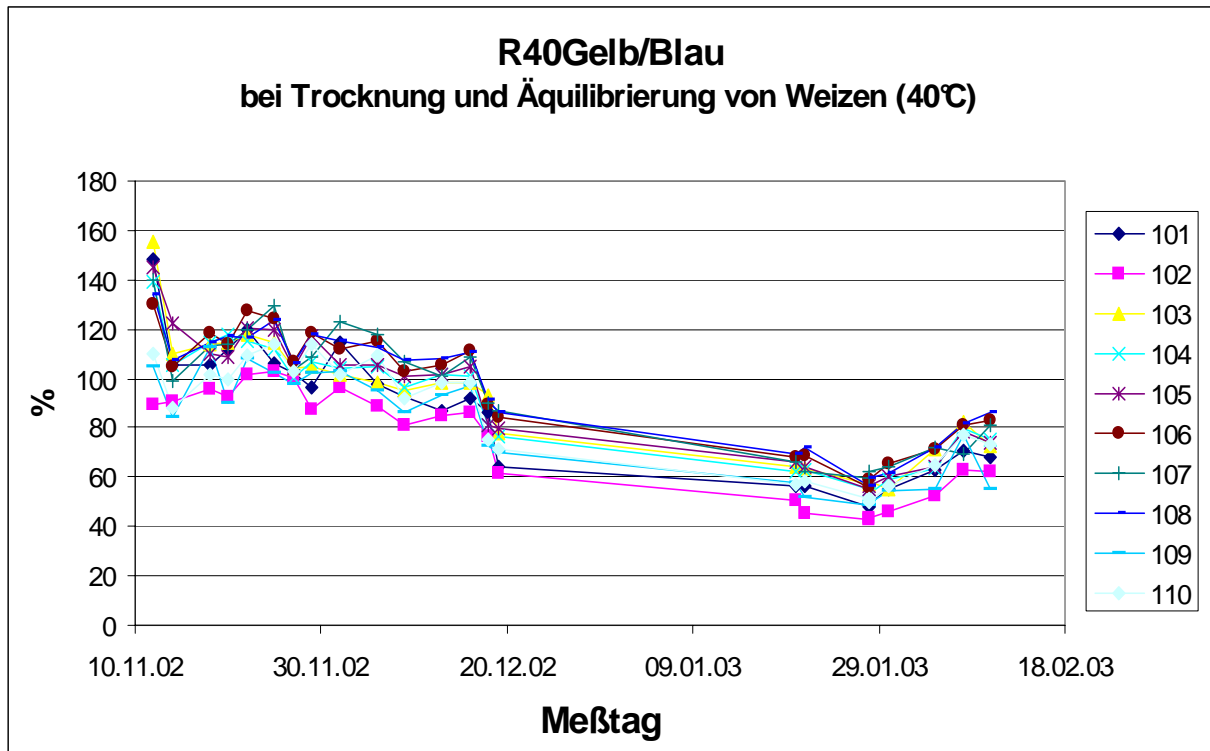


Abbildung 44

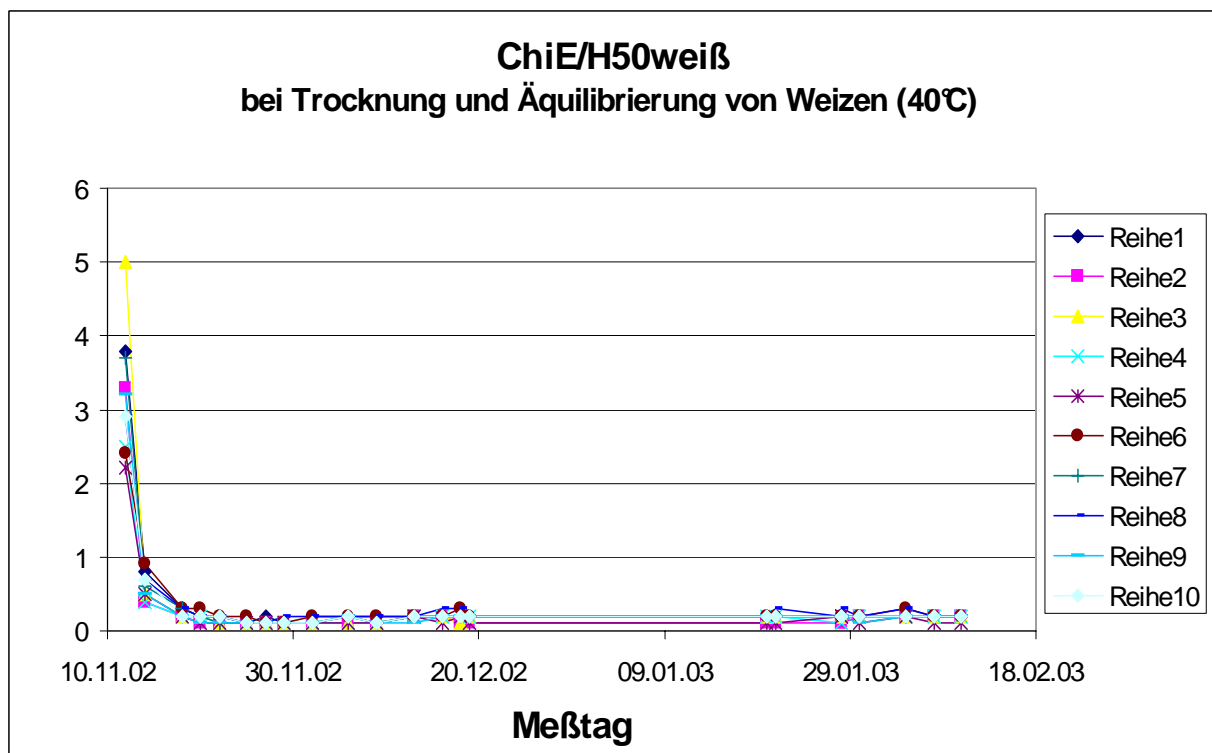


Abbildung 45

Abbildungen 41 bis 45: Wirkung der Trocknung von Weizen auf das Gewicht (Abb. 41) und die FAS-Meßparameter

Mw1w, R40w, R40Gelb/Blau und ChiE/H50w (Abb. 42 bis 45). Die Trocknung erfolgte in gemeinsamer Atmosphäre im Exsikkator über aktiviertem Silicagel. Die unterschiedlichen Verläufe legen nahe, daß die Meßparameter voneinander unabhängige Anteile enthalten.

Ergebnisse der Trocknungsuntersuchung

Die Ergebnisse der beschleunigten Trocknung unterscheiden sich nicht grundsätzlich von denen der Referenzreihe. Nachfolgend werden Ergebnisse unabhängig von der Trocknungsweise berichtet.

Bei sinkendem Wassergehalt stieg der Meßwert Mw1. Nach dem Erreichen eines Maximums sank Mw1, obwohl das Gewicht sich weiter verminderte (der Wassergehalt weiter abnahm). Das Mw1-Maximum wurde zeitlich früher erreicht als das Gewichtsminimum (Wassergehaltsminimum, siehe Abbildungen 41-45).

Diskussion der Trocknungsuntersuchung

Das zeitlich frühere Erreichen des Mw1-Maximums (vor dem Gewichts- bzw. Feuchte-Minimum) läßt sich durch einen Feuchtegradienten im Weizenkorn von der Oberfläche zur Kornmitte erklären. Während des Trocknungsprozesses wird die Oberfläche zeitlich vor dem Korninneren den geringstmöglichen Wassergehalt erreichen. Dabei wird angenommen, daß Mw1 vom Wassergehalt der Kornoberfläche abhängt.

Der Abwärtstrend der Mw1-Werte von ca. 20 % nach dem Maximum kann teilweise auf die abnehmende Helligkeit der zum Untersuchungszeitpunkt verwendeten Lichtquelle zurückgeführt werden. Die Anregungsintensität verminderte sich vom Maximum bis zum Messungsende um 12,2%. Die Intensitätsabnahme der Lichtquelle erklärt jedoch weder den Trend vollständig noch erklärt sie den Wiederanstieg der Meßwerte. Der Mw1w-Verlauf wird jedoch verständlich, wenn man annimmt, daß die Probe während der Messung Feuchtigkeit aus der Luft aufnimmt. Tatsächlich ist eine geringe Gewichtszunahme zwischen Beginn und Ende der Messung zu registrieren. Die Meßgröße R40w zeigt weniger stark ausgeprägte kurzfristige Schwankungen. Dies könnte darauf hindeuten, daß die mittelfristige Lumineszenz R40w in stärkeren Maße von tieferen Kornschichten abhängt, die von eindiffundierendem Wasser weniger schnell erreicht werden.

Die unterschiedlichen Datenverläufe über der Zeit in den weiteren Grafiken zeigen, daß es sich bei den Größen Mw1w, R40w, R40gelb/blau und ChiE/H50w um Meßgrößen handelt, die nicht miteinander korrelierte Anteile enthalten.

4.2.4.2 Möhren

Bei Möhren kommen hin und wieder einzelne Exemplare mit auffallend hohen Messwerten vor. Insbesondere bei einzelnen Möhren fallen besonders hohe Meßwerte auf. Möhren können am krautseitigen Ende (Blattansatz) grünliche Stellen aufweisen. Diese grünlichen Stellen wurden als Ursache der gemessenen extrem hohen Emission vermutet. Zur systematischen Klärung wurden Blattansatz, Mittelstück und Wurzelseite von 4 Möhren mit grünlichem Blattansatz untersucht. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse.

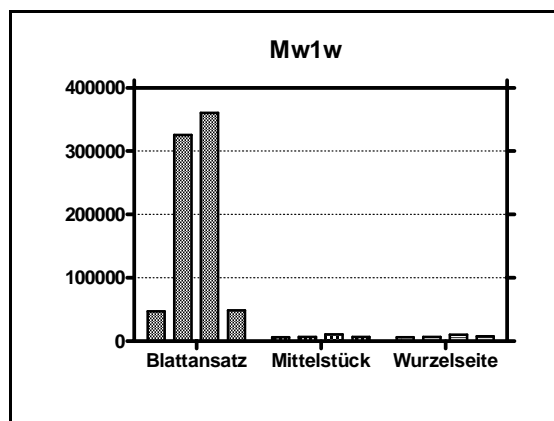


Abbildung 46

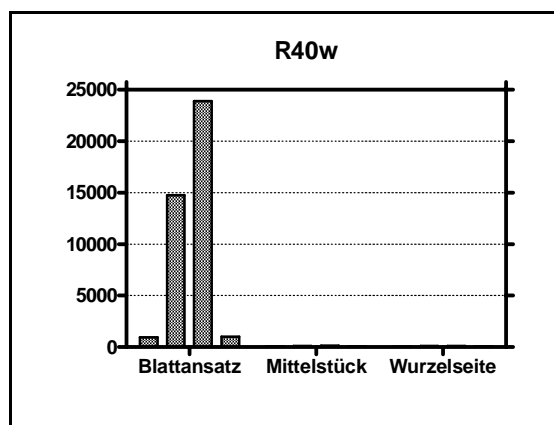


Abbildung 47

Abbildungen 46 und 47: Möhrenabschnitte im Vergleich.

Dunkle Möhrenbereiche in der Nähe des Blattansatzes weisen besonders hohe Emission auf. Solche Bereiche können zu Ausreißern in den Meßdaten führen.

Die 4 Blattansätze zeigten im Vergleich auffällig höhere Meßwerte als die zugehörigen 4 Mittelstücke und 4 Wurzelseiten. Unter den 4 Blattansätzen zeigten die Ansätze 2 u. 3 (mittlere Balken der Gruppe Blattansatz) die stärkste Dunkelfärbung und die höchsten Meßwerte. Für die

Probenbehandlung bedeutet dies, daß der grünliche Bereich am blattseitigen Ende einer Möhre vor der Messung vollständig entfernt wird. Die verbleibende Streuung zeigt das folgende Histogramm, für das insgesamt 180 Möhren einzeln jeweils von 2 Seiten gemessen wurden (360 Datensätze).

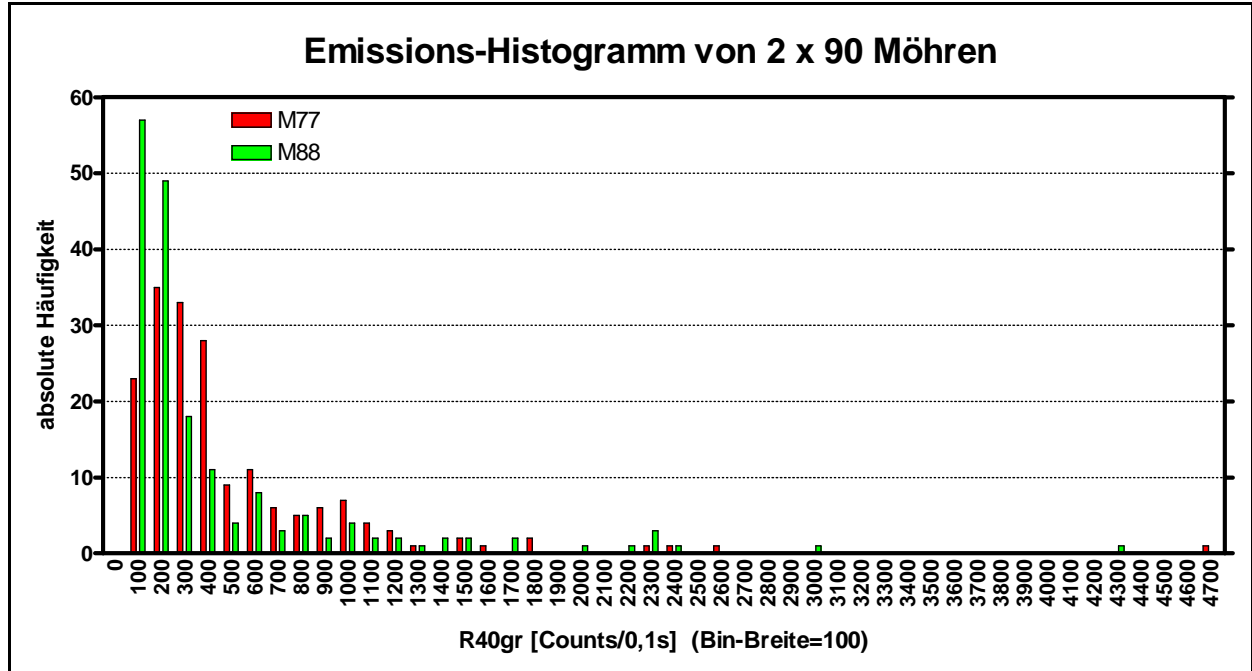


Abbildung 48: Häufigkeit der Emissions-Intensität einzelner Möhren aus zwei Möhrenproben.

Das Histogramm zeigt, daß die Verteilung bei niedriger Emission zwischen den Proben unterschiedlich ist. Werden vereinzelt vorkommende Ausreißer mit extrem hoher Emission nicht entfernt, können Mittelwerte stark verschoben werden.

Die Verteilung ähnelt einer Poisson-Verteilung. Die weitaus meisten Möhren liegen mit ihren Meßwerten im Bereich von 100 – 400 Counts/0,1s (links im Diagramm). Einzelne Möhren erreichen jedoch die zehnfachen Werte (rechts in Abb. 48).

Beim statistischen Vergleich von Proben verschlechtern solche Ausreißer die Trennung. Sie sollten deshalb bei der Berechnung nicht berücksichtigt werden. Als Grenz-Kriterium für Ausreißer wird das 10-fache des Verteilungsmaximums gewählt. Im vorliegenden Fall liegt das Verteilungsmaximum für M77 bei 200, für M88 bei 100. Das 10-fache des höheren Maximums von 200 ist 2000. Proben mit Werten oberhalb 2000 werden nicht berücksichtigt. Die Grenze von 2000 wird für beide Proben verwendet. Damit werden für die Probe mit dem niedrigeren Maximum (hier M88) relativ mehr hohe Ausreißer zugelassen. Der Unterschied der Proben wird dadurch geringer, als er tatsächlich ist. Das Verfahren zur Eliminierung von Ausreißern bleibt dadurch konservativ, d.h. es schafft nicht zufällige Unterschiede, sondern wird eher einen bestehenden Unterschied verringern.

Das Histogramm der Möhrendaten zeigt weiterhin, daß es sinnvoll ist, für die genaue Untersuchung von Möhren-Proben möglichst viele Exemplare zu messen. Weitere Untersuchungen wurden zum Zusammenhang der Meßdaten mit Länge, Gewicht und Dicke von Möhren durchgeführt. Auch der Einfluß der Lagerdauer von Möhren auf das Meßergebnis wurde untersucht. Auf die Wiedergabe dieser Untersuchungen wird aus Platzgründen verzichtet. Durch eine ausreichende Anzahl Möhren ($n \geq 20$) werden Längen- und Dickenunterschiede ausreichend ausgeglichen. Die gleichartige Lagerung aller Proben und das gewählte Verfahren der verschachtelten Messung der Proben stellt sicher, daß Veränderungen der Möhren während der Meßzeit sich auf den Vergleich von Möhren nicht auswirken.

4.2.5 Verfahrensbeschreibung

4.2.5.1 Verfahrensbeschreibung Weizen

4.2.5.1.1 Grundsätzliches zur Meß-Methode bei Weizen

Zur Messung wird Weizen in einer Quarzglasküvette in den Probenraum des Meßgerätes gebracht, optisch angeregt und die Fluoreszenz gemessen.

Ziel der Untersuchung ist es, solche Unterschiede von Weizen möglichst sicher zu erfassen, die auf Sorte, Anbau-Standort, Düngung oder einer anderen gezielten Anbauvariante beruhen. Dagegen sollen Inhomogenitäten der Probe das Untersuchungsergebnis möglichst nicht beeinflussen. Als Inhomogenität treten Unterschiede von Weizenkörnern in Größe, Form, Farbe, Wassergehalt etc. innerhalb einer Probe (Variante) auf.

Instabilitäten treten bei Weizen insbesondere dadurch auf, daß das Korn mit der Luftfeuchtigkeit der Umgebung ein Gleichgewicht anstrebt. Es folgt den Veränderungen der Atmosphäre. Die Untersuchungsmethode ist so angelegt, daß sie Instabilitäten so weit wie möglich vermindert oder kompensiert. Auf Einzelheiten wird weiter unten eingegangen.

4.2.5.1.2 Standardisiertes Probenvolumen

Die Meßwerte Mw_1 und $R40$ steigen mit der Oberfläche der Probe. Um die Vergleichbarkeit von Mw_1 u. $R40$ zwischen verschiedenen Proben zu sichern, kommen gleiche Proben-Einwaagen oder gleiche Proben-Volumina in Betracht. Für Weizen wurde die Methode auf gleiche Proben-Volumina festgelegt. Weizen wird in Rundküvetten gemessen, die randvoll gefüllt werden (siehe Foto in Abbildung 50).

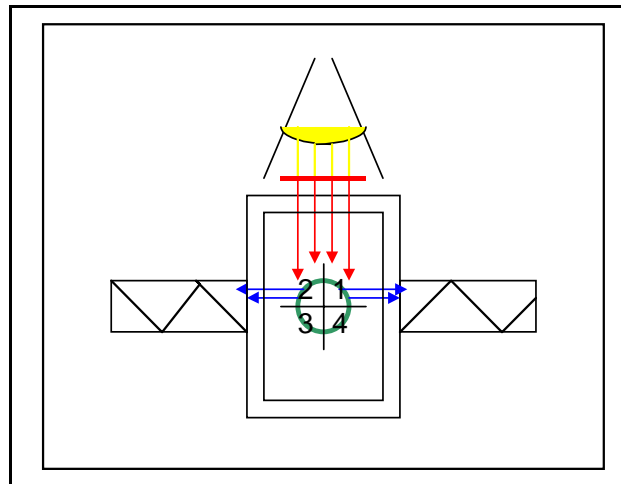


Abbildung 49: Messungen bei Rundküvetten.

Bei Rundküvetten werden die Sektoren 1 und 2 durch den rechten bzw. linken Photoervielfacher zeitgleich gemessen. Durch Drehung der Küvette um 180 Grad können die zunächst abgeschatteten Sektoren 3 und 4 gemessen werden

Ein Photoervielfacher erfaßt bei einer einzelnen Messung von Weizen einen Küvettensektor von ca. 1/4 des Umfangs (siehe Abbildung 49). Dies entspricht einer Probenmenge von ca. 4 g. Eine Probenmenge von 100 g erfordert daher 25 Messungen. Stehen 2 Photomultiplier zur Verfügung, so können 2 Messungen gleichzeitig erfolgen.

Bei Rundküvetten werden die Sektoren 1 und 2 durch den rechten bzw. linken Photoervielfacher zeitgleich gemessen. Durch Drehung der Küvette um 180 Grad können die zunächst abgeschatteten Sektoren 3 und 4 gemessen werden.

4.2.5.1.3 Bezeichnungen

Es werden folgende Bezeichnungen verwendet (siehe nachfolgende Abbildung):

Probe: Vom Auftraggeber angeliefertes Probenmaterial (z.B. 10 Packungen mit den

Nummern 101-110)

- Teilprobe:** Zur Prüfung verwendete Teilmenge einer Probe (z.B. 6 Teilproben der Nummern 109.01-109.06). Üblicherweise wird eine Teilprobe von ca. 40 g Weizen in einer Petrischale getrocknet bzw. äquilibriert.
- Küvettenfüllung:** Probenmenge, die in den Probenraum des Meßgeräts überführt wird (ca. 19 g, Untermenge einer Teilprobe). Nach Rückführung erneut durchgeführte Küvettenfüllungen aus einer Teilprobe unterscheiden sich dadurch, daß weitere Füllungen zufallsbedingt andere Körner umfassen. Bei der Messung tatsächlich erfaßt werden von einer Küvettenfüllung ausschließlich diejenigen Körner am Glas der Küvette (d.h. vom Gesamtvolumen der Küvettenfüllung der Zylindermantel).
- Küvettensektor:** Tatsächlich vom Meßgerät erfaßte Weizenkörner (1/4 des Zylindermantels einer Küvettenfüllung = ca. 90 – 95 Weizenkörner entsprechend ca. 4 g)

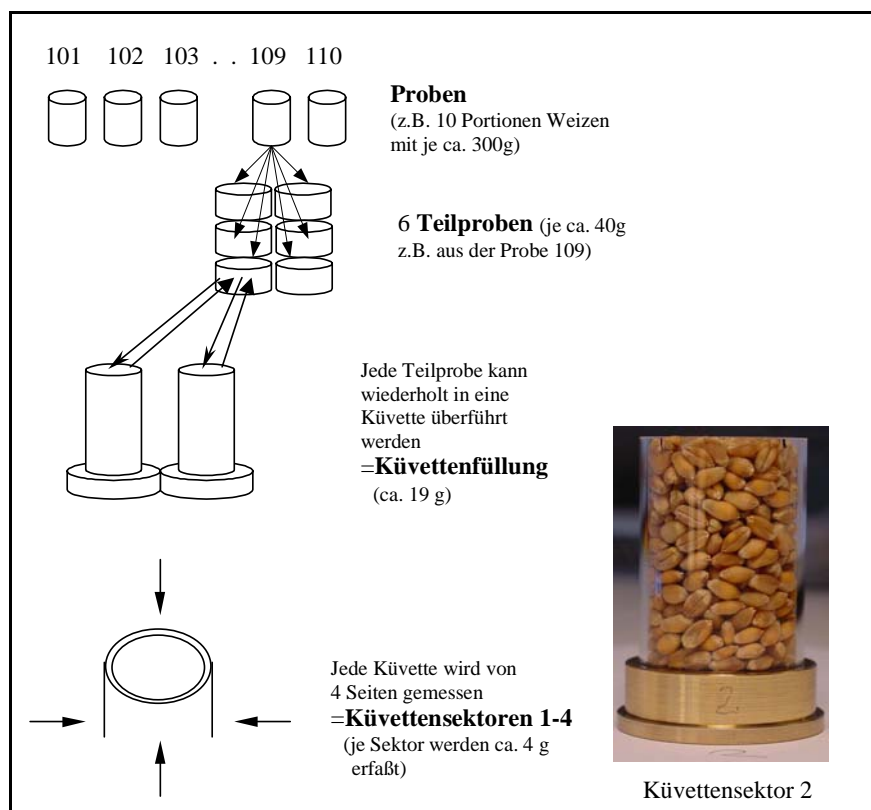


Abbildung 50: Schema der verwendeten Bezeichnungen bei der Äquilibrierung und Messung von Samen am Beispiel Weizen.

4.2.5.1.4 Methodenbeschreibung Weizen

Probenvorbereitung

- Entfernung von Fremdbesatz durch Auslesen
- Entfernung von zerbrochenen Körnern durch Auslesen

Probenaufbereitung

- je Probe 4 Teilproben zu 40 g in 4 Petrischalen einwiegen
- die Petrischalen aller Proben in einen gemeinsamen Exsikkator mit Silicagel überführen
- Proben im Exsikkator im Wärmeschrank bei 40° C 10 Tage trocknen und äquilibrieren
- Trocknung wird durch Messung von Mw1w überprüft
- Trocknung ist ausreichend, wenn $Mw1 > 150.000 \text{ Counts}/100\text{ms}$

Messung

- Messungen erfolgen bei einer Raumtemperatur von 15 – 17 °C
- Exsikkator 1/2 Stunde vor der Probenentnahme in den Dunkelraum (15-17°C) überführen
- Teilproben zeitgleich entnehmen und in luftdicht verschließbare Glasgefäße überführen
- zu messende Teilprobe erst unmittelbar vor der Messung aus dem luftdichten Glasgefäß in die Meßküvette überführen
- Messung von 2 Sektoren der Teilprobe unmittelbar nacheinander (ohne Umfüllen)
- Meßfolge: Beispiel für die Proben A, B, C, D:

Teilmenge	Probe	Probe	Probe	Probe
	A	B	C	D
1	1	2	3	4
2	8	7	6	5
3	10	9	11	12
4	15	16	14	13

Tabelle 8: Messfolgetabelle für mehrere Messreihen (Teilmengen) der gleichen Probe(Weizen)

Weitere Meßreihen werden nach diesem Beispiel zuerst rückwärts, danach mit der Teilmenge 2 beginnend weitergeführt. Bei anderen Probenzahlen ist entsprechend zu verfahren.

Probennachbehandlung

- Unmittelbar nach der Messung erfolgt die Rücküberführung der Teilprobe in das zugehörige luftdichte Glasgefäß.
- Nach Abschluß der Messung zeitgleiche Rücküberführung der Teilproben in die zugehörigen Petrischalen.
- Rücküberführung der Petrischalen mit den Teilproben in den Exsikkator
- Proben im Exsikkator im Wärmeschrank weiter bei 40°C äquilibrieren

Auswertung

Für alle Meßgrößen (Mw1w, R40w, R40g/b, ChiE/H50w, ggf. weitere) wird aus allen Meßwerten der zugehörige Tagesmittelwert $Mw1wMT1$ gebildet. Aus den Tagesmittelwerten aller Meßserien wird der Gesamtmittelwert $Mw1wG$ errechnet. Das Verhältnis des Tagesmittelwerts zum Gesamtmittelwert $Mw1wMT1/Mw1wG$ ergibt den Kompensationsfaktor $KFMw1wT1$ für den jeweiligen Meßwert. Beträgt der Tagesmittelwert des 1. Meßtages z.B. für Mw1w q vom Gesamtmittel, so werden alle Mw1w-Werte des 1. Meßtages durch q dividiert, d.h. allgemein wird errechnet $Mw1w_{kompT1} = Mw1wT1 / KFMw1wT1$. Entsprechend wird mit allen Meßwerten aller Meßtage verfahren. Auf diese Weise wird ein möglicher Tagesgang der Meßwerte kompensiert.

Für alle Meßgrößen (Mw1w, R40w, R40g/b, ChiE/H50w, ggf. weitere) wird aus allen Meßwerten der Datensatz für die jeweilige Probe gebildet. Datensätze der Proben werden mittels t-Test (bei 2 Proben) bzw. Varianzanalyse (bei mehr als 2 Proben) statistisch bewertet. Die Normalverteilung der

Meßwerte bzw. die Varianzhomogenität wird geprüft oder ggf. ein nichtparametrischer Test eingesetzt.

4.2.5.2 Verfahrensbeschreibung Möhren

Es werden folgende Bezeichnungen verwendet:

Probe:	Vom Auftraggeber angeliefertes Probenmaterial (z.B. 5 Beutel mit den Nummern 1 - 5) bestehend aus n Möhren je Probe
Möhre:	Jede einzelne Möhre einer Probe wird einzeln gemessen.
Möhrensektor:	Tatsächlich vom Meßgerät erfaßter Bereich einer Möhre (ca. 1/4 des „Zylindermantels“ einer Möhre)
Proben-Meßwert:	Mittelwert über die n Meßwerte einer Möhrenprobe (ggf. 2*n Meßwerte falls 2 Möhrensektoren je Möhre gemessen werden).

4.2.5.2.1 Methodenbeschreibung Möhren

Probenvorbereitung

- Lagerung bei 6 °C im perforierten Polybeutel
- entfernen von Erdresten durch Waschen, ca. 1 Stunde vor Meßbeginn
- Proben werden mindestens 1/2 Stunde vor Meßbeginn in den Meßraum (15-17°C) gebracht
- Möhre wiegen, Gewicht notieren
- Möhrenlänge messen, notieren
- mittleren Durchmesser der Möhre messen und notieren

Probenaufbereitung

- Durchführung während der Messung der vorhergehenden Möhre, d.h. ca. 5 Minuten vor der Messung
- evtl. Fraß- u. Faulstellen ausschneiden
- Blattansatz soweit abschneiden, daß visuell keine Grün- oder Dunkelfärbung mehr

erkennbar ist

- Wurzelseite so weit abschneiden, daß das Mittelstück 12 cm Länge erhält

Messung

- Messungen erfolgen bei einer Raumtemperatur von 15 – 17 °C
- jede Möhre wird einzeln gemessen, dazu:

Möhre senkrecht auf Probenständer setzen

Messung von 2 Sektoren der Möhre unmittelbar nacheinander

Meßfolge: Beispiel für die Proben A, B, C, D

Teilmenge	Probe A	Probe B	Probe C	Probe D
1	1	2	3	4
2	8	7	6	5
3	10	9	11	12
4	15	16	14	13

Tabelle 9: Messfolgetabelle für mehrere Messreihen (Teilmengen) der gleichen Probe(Möhre)

Weitere Meßreihen werden nach diesem Beispiel zuerst rückwärts, danach mit der Teilmenge 2 beginnend weitergeführt. Bei anderen Probenzahlen ist entsprechend zu verfahren.

Auswertung

Die Anzahl der Möhren sollte ≥ 20 sein. Die Verteilung der Rohdaten für Mw1 und R40 wird geprüft. Im allgemeinen wird eine Verteilung grob ähnlich der Poissonverteilung auftreten. Datensätze mit Werten größer als das 10-fache des Wertes beim Maximum der Verteilung werden als Ausreißer entfernt.

Für alle Meßgrößen (Mw1w, R40w, R40g/b, ChiE/H50w, ggf. weitere) wird aus allen Meßwerten der Datensatz für die jeweilige Probe gebildet. Datensätze der Proben werden mittels t-Test (bei 2 Proben) bzw. Varianzanalyse (bei mehr als 2 Proben) statistisch bewertet. Die Normalverteilung der Meßwerte bzw. die Varianzhomogenität wird geprüft oder ggf. ein nichtparametrischer Test

eingesetzt.

4.2.6 Dokumentation und Rückverfolgbarkeit

Für die Validierung wurden die im Labor bestehenden Standardverfahren der Dokumentation aller von der Probe durchlaufenen Prozesse, wie Probeneingang, Auftraggeber, Untersuchungsarten, Untersuchungsdaten, Bearbeiter und Untersuchungsergebnisse eingesetzt. Die Verfahren im nicht akkreditierten Bereich entsprechen den Verfahren im nach ISO 17025 akkreditierten KWALIS-Labor. Deren Organisation und Struktur ist im KWALIS-Qualitätsmanagement-Handbuch geregelt.

Für die Durchführung der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie wurden Prüfanweisungen für die Probenarten Weizen und Möhre erstellt. Sie regeln die Durchführung der Prüfung. Arbeitsanweisungen regeln die von der Probenart unabhängigen Prozesse einschließlich ihrer Dokumentation. Durch das Gesamtverfahren ist die Rückverfolgbarkeit der Ergebnisse jeder untersuchten Probe gegeben.

4.2.7 Validierung

4.2.7.1 Validierungsfragen

Die diesem Teilprojekt zugrundeliegende Validierungsfrage lautet:

“Lassen sich durch geeignete Größen aus dem Fluoreszenz-Anregungs-Spektrum die vorliegenden Proben von Möhren und Weizen aus unterschiedlichen Kulturverfahren zuverlässig differenzieren?”

Dabei ist das Gesamtverfahren zu validieren. Im Einzelnen ist zwischen der Meßpräzision, d.h. der instrumentellen Seite der Messung und der Methodenpräzision, d.h. der matrixabhängigen Bestimmung von Meßgrößen bei den vorliegenden Matrices Weizen und Möhren zu unterscheiden. An die Bestimmung der Meßgrößen schließt sich deren Bewertung im Hinblick auf die Trennung von Kulturverfahren an, so daß auch die Güte dieser Trennung zu bestimmen ist.

Für jede Meßgröße lauten die Validierungsfragen:

1. Läßt sich die Meßgröße ausreichend präzise bestimmen?
2. Ist das ausgewählte Verfahren der Bestimmung einer Meßgröße an der Probe ausreichend präzise?
3. Ist das ausgewählte Verfahren der Bestimmung einer Meßgröße an der Probe ausreichend wiederholbar?
4. Ist die Meßgröße zum Nachweis des Unterschiedes der Kulturverfahren geeignet?

4.2.7.2 Validierungsweg

Die Validierung gliedert sich entsprechend in drei Abschnitte:

1. Präzision bei unmittelbar aufeinander folgenden Messungen und Wiederholbarkeit von Messungen, die Tage oder Wochen auseinander liegen, bezogen auf den instrumentellen Meßvorgang
2. Präzision bei unmittelbar aufeinander folgenden Messungen und Wiederholbarkeit von Messungen, die Stunden, Tage oder Wochen auseinander liegen, bezogen auf den matrixabhängigen Meßvorgang für die Probenarten Weizen und Möhren
3. Statistische Prüfung der Herkunftsdifferenzierung anhand der Meßdaten

Für das Verfahren existieren keine Standardproben, mit denen eine Bestimmung absoluter Meßwerte und deren Präzision erfolgen könnte. Als Weg zur Validierung unter diesen Bedingungen wurde die Prüfung von Präzision (Einfluß kurzfristiger Fehler) und Wiederholbarkeit (Einfluß langfristiger Fehler) mittels Prüfkörper und Proben gewählt. Hinzu kommt eine systematische Prüfung von Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen könnten. Beim geräteabhängigen Messvorgang sind bei der kurzfristigen Präzision vor allem zufällige Fehler und bei der langfristigen Wiederholbarkeit zufällige und systematische Fehler zu erwarten. Beim matrixbezogenen Messvorgang sind dagegen bereits bei der kurzfristigen Präzision zufällige und systematische Fehler zu erwarten, da das Probenmaterial zeitlichen Veränderungen unterliegt.

Entsprechend obiger Gliederung wurde getrennt untersucht, innerhalb welcher Genauigkeit mit dem Gerät gemessen werden kann, welche Genauigkeit in Abhängigkeit vom Probenmaterial erreicht wird und welche Faktoren darauf Einfluß haben. An diese Untersuchungen schloß sich die Prüfung des Gesamtverfahrens mittels der codierten Proben an, die allen Projektpartnern zu diesem Zweck in gleicher Weise zur Verfügung standen.

Als zu validierende Meßgrößen wurden alle diejenigen verwendet, aus denen Spektren zur Bewertung von Proben gebildet werden (Mw1, R40, R40rel, ChiE/H50). Als Messgröße der Validität wird die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) verwendet.

4.2.7.3 Präzision und Wiederholbarkeit des instrumentellen Meßvorgangs

Als erster Schritt im Validierungsprozeß wurden für den gerätebedingten Teil des Meßvorganges Präzision und Wiederholbarkeit bestimmt.

Der als Maß für Präzision und Wiederholbarkeit dienende Variationskoeffizient (V_K) wurde aus mindestens 6 einzelnen Messungen bestimmt.

Bei instrumentellen Meßvorgängen werden in der Regel Variationskoeffizienten von 1 % (HPLC, GC, Photometrie) bis 2 % (Feuchtemessung, Kapillarelektrophorese) erreicht (KROMIDAS 1999, S. 81). Diese Größenordnung des V_K wird auch im vorliegenden Fall für den instrumentellen Meßvorgang als Eignungsgrundlage angesehen.

4.2.7.3.1 Eigenschaften des Gerätes

Das Gerät verfügt über 2 Photoervielfacher. Es können damit 2 Sektoren der Probenoberfläche zeitgleich gemessen werden. Die angegebenen Validierungsdaten beziehen sich auf den Photoervielfacher 2 (PM2), da ein Photoervielfacher während der Projektlaufzeit ausfiel und der Hersteller der Photoervielfacher kein entsprechend rauscharmes Exemplar nachliefern konnte. Untersuchungen mit Ersatztypen wurden durchgeführt. Im Interesse der Klarheit der Darstellung wird auf die Detailangaben verzichtet. Die Unterschiede bestehen darin, daß der verwendete PM1 eine geringere Zählrate aufweist, was zu Variationskoeffizienten führt, die etwa um den Faktor 2 größer sind.

4.2.7.3.2 Systematische Beurteilung der Faktoren, die den instrumentellen Meßvorgang beeinflussen können

4.2.7.3.2.1 Zu erwartende Einflußgrößen auf Meß-Präzision und Meß-Wiederholbarkeit

Allmähliche Abnahme der Helligkeit der Lichtquelle mit der Brenndauer der Lampe. Dieser Einfluß käme als langfristiger Trend zum Ausdruck (systematischer Fehler).

1. Bei extrem niedrigen Meßwerten könnte sich ein systematischer Fehler ergeben, wenn das Eigenrauschen eine Drift seines Mittelwertes aufweist.
2. Hauptursache der zufälligen Meßunsicherheit ist der Zufallsanteil der Emission einer Probe. Das gesetzmäßige Abklingen der Emission ist überlagert von zufälligen Schwankungen. Dieser zufällige Anteil ist um so geringer, je höher die Emission einer Probe ist. Hinzu kommt das Eigenrauschen des Photomultipliers. Es beträgt ca.

1,3 Counts/0,1s und variiert rauschbedingt etwas. Auch dieser Zufallsanteil im Meßwert wirkt sich um so geringer aus, je größer die Lichtemission einer Probe (eines Prüfkörpers) ist. Hohe Meßwerte führen deshalb zu niedrigen Variationskoeffizienten.

3. Einen weiteren, theoretisch zu erwartenden Beitrag zur zufälligen Meßunsicherheit könnte die Variation der Öffnungs- und Schließzeiten der mechanischen Verschlüsse (Shutter) zur Lichtquelle und zum Photomultiplier bilden. Dieser Einfluß müßte bei den Mw1-Meßwerten als Variation der Mw1-Werte auftreten und wäre als nicht zu unterschreitender ‚Sockel‘ des V_K zu erkennen. Diese Variation kann so klein sein, daß sie nicht erkennbar ist.
4. Instabilitäten der Hochspannung könnten zu zufälligen oder systematischen Verstärkungsänderungen der Photomultiplier führen und sich sowohl als Variation des Eigenrauschens auswirken als auch über die Verstärkung die Absoluthöhe der gemessenen Fluoreszenz beeinflussen. Dementsprechend wird die Hochspannung geregelt und überwacht.
5. Instabilitäten der Kühlung der Photomultiplier könnten zu Veränderungen des Eigenrauschens führen. Die Kühlung wird geregelt und überwacht.

4.2.7.3.2.2 Untersuchung einzelner Einflußgrößen auf die Meßpräzision des Gerätes

Relevante Einflußgrößen auf die Meßpräzision wurden untersucht. Der Einflußfaktor Helligkeit der Anregungslichtquelle wurde durch Regelung minimiert. Das Eigenrauschen des Photovervielfachers ist von untergeordneter Bedeutung, wird jedoch überwacht. Einzelheiten werden nachfolgend dargestellt.

4.2.7.3.2.2.1 Helligkeit der Lichtquelle für die Anregung der Proben

Vor Beginn des Projektes waren ausschließlich Vergleiche zwischen nahezu zeitgleich gemessenen Proben vorgenommen worden. In solche Vergleiche gehen langfristige Veränderungen der Lichtquelle nicht ein. Für das vorliegende Projekt wurde beabsichtigt, auch Absolutwerte der Emission als Bewertungsgröße einzubeziehen. Es wurde dafür bei Absolutdaten zunächst so verfahren, daß ein Einfluß der Helligkeitsänderung auf die Daten geprüft und gegebenenfalls rechnerisch berücksichtigt wurde. Durch Helligkeitsregelung der Lichtquelle ergab sich konstante Helligkeit. Diese wird am Beginn und Ende jedes Meßtages überprüft. Zufällige Veränderungen der

Helligkeit gehen in den Variationskoeffizienten der Wiederholbarkeit ein.

Die Helligkeit der Lampe bei konstanter Betriebsspannung nimmt mit der Brenndauer ab (siehe Abbildung 51).

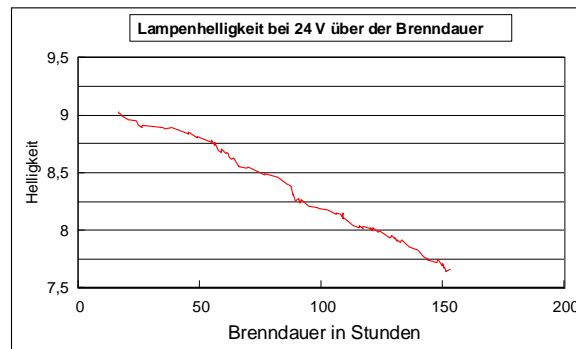


Abbildung 51: Abhängigkeit der Helligkeit von der Betriebszeit der Lampe ohne Regelung

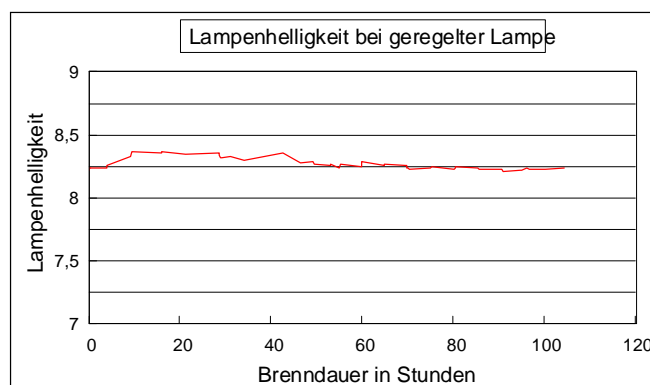


Abbildung 52: Abhängigkeit der Helligkeit von der Betriebszeit der Lampe mit Regelung

Zunächst wurde die Lampe nach ca. 120 Betriebsstunden gewechselt (entspricht ca. 10 % Helligkeitsminderung). Versuchsweise wurde die Lampe über die maximal 120 Stunden hinaus betrieben, um Helligkeitsminderungen und ihren Einfluß deutlich zu erfassen. Die Helligkeit wird durch einen Photosensor erfaßt.

Während der Betriebszeit wird die Lampenhelligkeit weitgehend konstant gehalten. Dazu wird die Lampenspannung der Betriebszeit der Lampe angepaßt. Diesen Zustand zeigt Abbildung 52.

Die verbleibende Abweichung liegt innerhalb von 3% vom Sollwert. Unterschiede zwischen

Lampenexemplaren werden durch die Regelung ebenfalls ausgeglichen.

4.2.7.3.2.2 Überwachung des Eigenrauschens

Die langfristige Stabilität des Eigenrauschens wird mittels Kontrollkarte überwacht. Dazu werden an Meßtagen vor der Messung und nach Abschluß der Messungen Kontrollwerte erhoben. Auf Grund der statistischen Natur des Rauschens schwanken die Werte. Die besondere Verteilung des Rauschens erfordert eine angepaßte Überwachungsstrategie.

Zur Kontrolle wird das Eigenrauschen während 5 Minuten in Intervallen von 10 Sekunden aufgezeichnet (30 Meßwerte) und daraus das Mittel als Kontrollwert errechnet. In Anlehnung an Vogelgesang (VOGELGESANG 1997) wurden als Warn- bzw. Eingreifschwelle vorläufig Abweichungen vom Mittelwert der ersten 22 Messungen um die 2-fache bzw. 3-fache Standardabweichung festgelegt. Dabei wurde eine Normalverteilung der zufälligen Schwankungen des überwachten Wertes vorausgesetzt. Diese Voraussetzung ist jedoch nicht gegeben.

Das Rauschen von Photomultipliern entspricht näherungsweise einer Poisson-Verteilung. Im Unterschied zur Normalverteilung treten Ereignisse unterhalb des Mittelwertes seltener auf als bei der Normalverteilung, höhere dagegen häufiger.

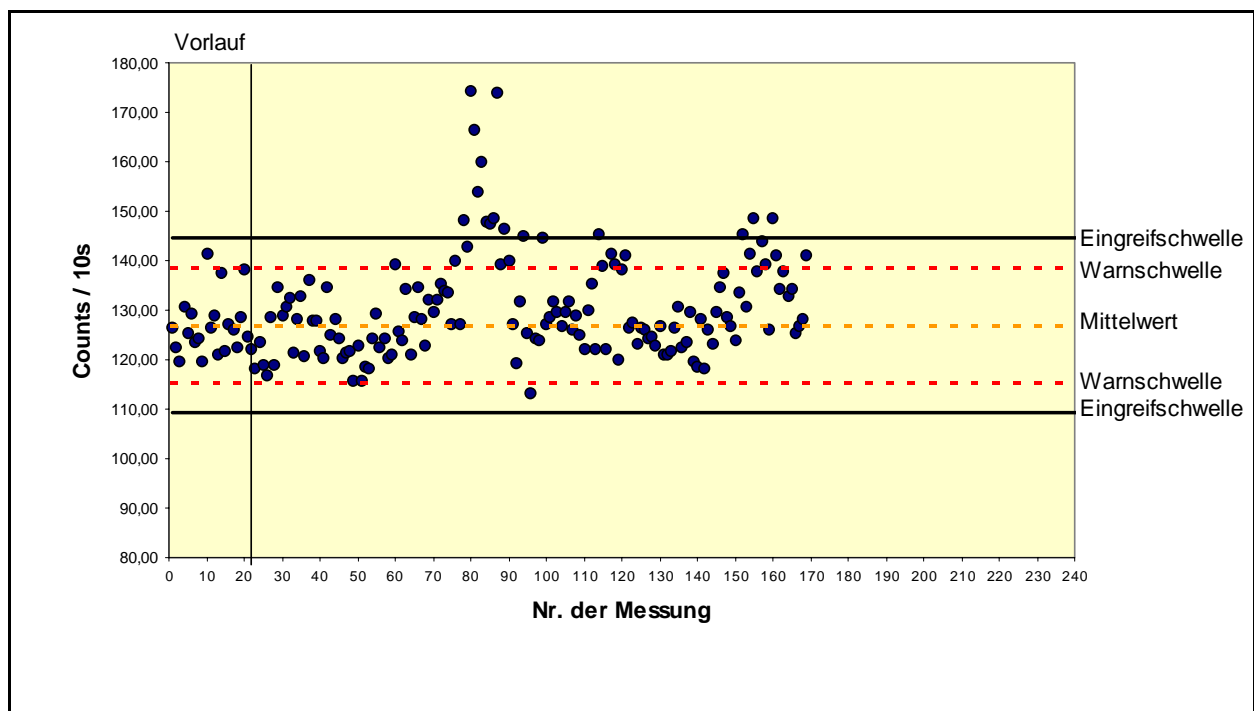


Abbildung 53: Kontrollkarte zur Überwachung des Eigenrauschens eines Photovervielfachers

Bei Voraussetzung einer Normalverteilung treten Werte oberhalb der Eingreifschwelle relativ häufig auf und führen zu übereilten Eingriffen. Ein Beispiel zeigt die vorangehende Grafik. Wegen der Wertefolge oberhalb der Eingreifschwelle (siehe obige Abbildung) wurde eine Störung der Kühlung vermutet. Eine Prüfung des Kühlsystems blieb ohne Befund. Spätere erneute Überschreitungen der oberen Eingreifschwelle führten zu einer genaueren Untersuchung der Rauschverteilung. Die einer Poisson-Verteilung ähnliche Verteilung kann zwar wiederholt erhöhte Werte erklären, nicht jedoch fortlaufende Überschreitungen. Solche gelegentlich auftretenden Anstiege des Rauschens wurden mehrfach gemessen. Inzwischen gibt es Hinweise, daß kosmische Strahlung dafür in Betracht zu ziehen ist.

Insgesamt sind Veränderungen des Rauschens in der aufgetretenen Größenordnung als tolerabel einzustufen. Bei Möhren beträgt der Signal-Rauschabstand 200:1, bei Weizen 20:1. Die in der Grafik erkennbare Spitze des Rauschens führt bei Weizen zu einem Fehler von 2,5%. Dieser Wert liegt im Bereich der ohnehin unvermeidlichen Inhomogenität der Probe.

Die Überwachung des Eigenrauschens mittels Kontrollkarte ist also ein geeignetes Instrument, diesen möglichen Einflußfaktor auf die instrumentelle Meßpräzision zu erkennen.

4.2.7.3.2.2.3 Prüfkörper

Konstanz und Meßpräzision des Gerätes wurden an Prüfkörpern ermittelt. Verwendet wurden:

Prüfkörper 1: Glasstab aus AR-Glas; Durchmesser 20,8 mm, Höhe 88mm;

Prüfkörper 2: Preßglas-Formstück mit Durchmesser 80mm, Höhe 26 mm

4.2.7.3.2.2.4 Helligkeitskontrolle mit Prüfkörper

Die Wiederholbarkeit der mit dem Gerät bestimmten Meßdaten wird mittels der Fluoreszenz eines Prüfkörpers kontrolliert. Die M_w1 - und die R40-Fluoreszenz des Prüfkörpers sind als proportional zur Lampenhelligkeit zu erwarten. Den Zusammenhang zwischen Lampenhelligkeit und R40w-Wert des Prüfkörpers zeigt die folgende Abbildung, wobei der R40w-Wert aufgrund des Rauschanteils und der Temperaturabhängigkeit des Prüfkörpers stärker schwankt als die Helligkeit.

Ein idealer Prüfkörper würde unabhängig von der Temperatur emittieren. Die Emission aller bisher untersuchten Prüfkörper hing von der Temperatur ab. Entsprechend bedarf es für die Kontrolle der Konstanz der Lampenhelligkeit einer von der Fluoreszenz des Prüfkörpers unabhängigen Meßgröße. Diese liefert ein Helligkeitssensor. In Abhängigkeit vom Meßwert des Helligkeitssensors wird die Lampenhelligkeit geregelt (siehe oben). Darüber hinaus wird kontrolliert, ob die tatsächliche Fluoreszenz des Prüfkörpers der Helligkeit entspricht.

Die folgende Abbildung zeigt die Mw1-Fluoreszenz des Prüfkörpers 1 bei den Kontrollen während

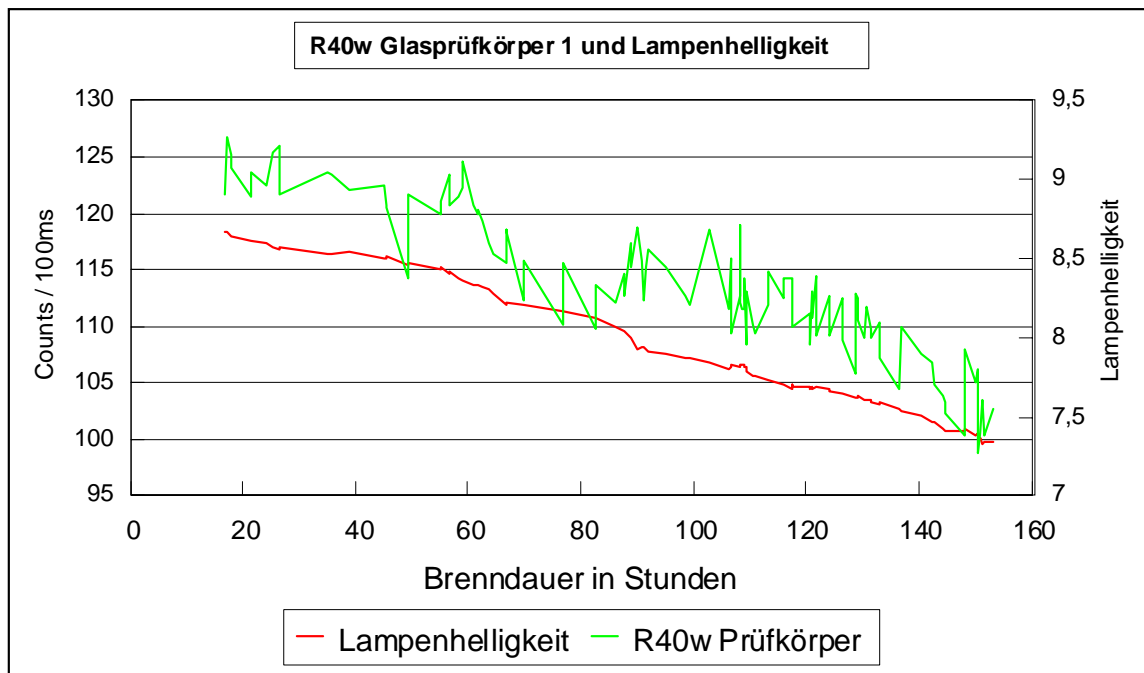


Abbildung 54: Zusammenhang zwischen Lampenhelligkeit (als Sensor-Ausgangssignal) und Lumineszenz (R40) eines Prüfkörpers aus Glas

der Betriebszeit einer Lampe. Die zugleich dargestellte Temperatur in der Meßkammer läßt erkennen, daß Fluoreszenz und Temperatur des Prüfkörpers negativ korreliert sind.

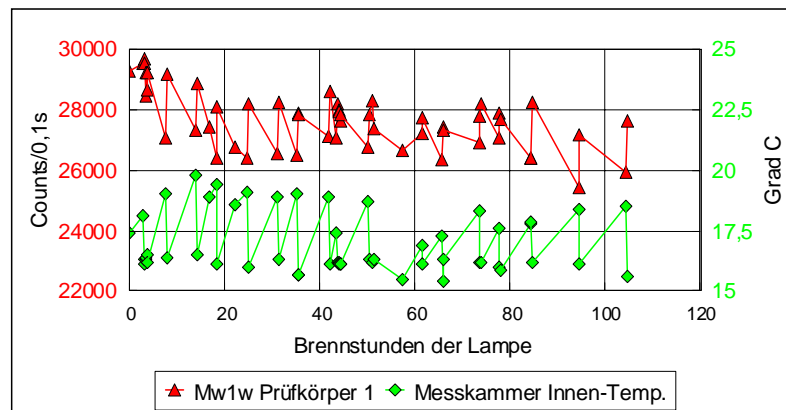


Abbildung 55: Lumineszenz (Mw1) eines Prüfkörpers aus Glas und Temperatur in der Meßkammer. Die Werte sind negativ miteinander korreliert.

Es wäre möglich, den von der Temperatur abhängigen Teil der Variation herauszurechnen. Da auch ohne eine solche Maßnahme die Wiederholbarkeit von Mw1w einen $V_K < 5\%$ aufweist, wurde darauf verzichtet.

4.2.7.3.3 Meßpräzision des instrumentellen Meßvorgangs

Die Meßpräzision wurde an den Prüfkörpern 1 u. 2 ermittelt. Es ist zu erwarten, daß der V_K von der Höhe des Meßwertes (der Intensität der Probenemission) abhängt. Entsprechend reicht es nicht aus, den V_K bei nur einer Intensität zu bestimmen, sondern es ist sinnvoll, den V_K an mehreren Stellen über den gesamten Meßbereich zu ermitteln.

Meßwerte können geräteintern durch einfache oder mehrfache Messung ermittelt werden. Der Integrationsparameter BelW gibt die Anzahl der internen Messungen an (BelW=1 entspricht 1-facher Messung, BelW=3 entspricht 3-facher Messung usw.). Die V_K wurden getrennt für die gebräuchlichen Einstellungen BelW=3 und BelW=5 bestimmt.

Der Variationskoeffizient ist keine Konstante. Als aus Meßgrößen abgeleiteter Wert unterliegt er einer statistischen Verteilung. Entsprechend treten bei wiederholter V_K -Bestimmung unterschiedliche Werte des V_K auf, die wiederum einer Normalverteilung entsprechen sollten. Im vorliegenden Validierungsprozeß wurde der V_K mehrfach bestimmt und teilweise auch mehr als die Mindestzahl von 6 Meßwiederholungen durchgeführt, um einen genaueren Überblick zu erhalten.

Es wurden die Variationskoeffizienten derjenigen Größen bestimmt, die für die Beurteilung von Proben verwendet werden. Diese Größen lassen sich unterscheiden in gemessene Größen und abgeleitete Größen.

gemessene Größen:

Mw1: erster Meßwert nach Anregung

R40: Mittelwert aus den Meßwerten 61 –100. R40 ist streng genommen kein Meßwert, sondern der Mittelwert aus 40 geräteinternen Meßwerten. Er wird hier behandelt wie ein Meßwert, da er meßbar wäre.

abgeleitete Größen:

R40 relativ: Verhältnis zweier Meßgrößen R40 bei verschiedener Anregung

Chi E/H 50w: Maß für die Abklingkinetik nach weißer Anregung, berechnet über 50 Meßwerte

Da die Variation dieser Werte hauptsächlich durch die Stabilität der Helligkeit der Lichtquelle sowie das in den Meßwert eingehende Rauschen des Photomultipliers bestimmt ist, wird angenommen, daß der bei einer Anregungsfarbe bestimmte Variationskoeffizient auch bei anderen Anregungsfarben gültig ist. Geprüft wird diese Annahme dadurch, daß die Variationskoeffizienten bei verschiedenen Anregungsfarben bestimmt werden und auf einer nur von der Intensität abhängigen Geraden liegen müssen. Wie in den Grafiken zu erkennen, ist dies in ausreichender Weise der Fall.

4.2.7.3.3.1 Variationskoeffizient der Meßgröße Mw1

Der V_K sinkt bei steigendem Meßwert, da der Anteil des Rauschens am Meßwert relativ abnimmt.

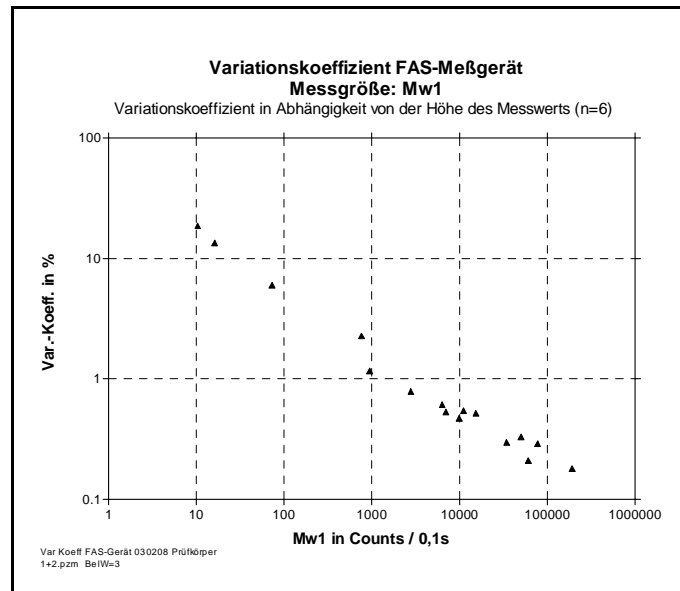


Abbildung 56: Messgröße Mw1, Integrationsparameter BelW=3

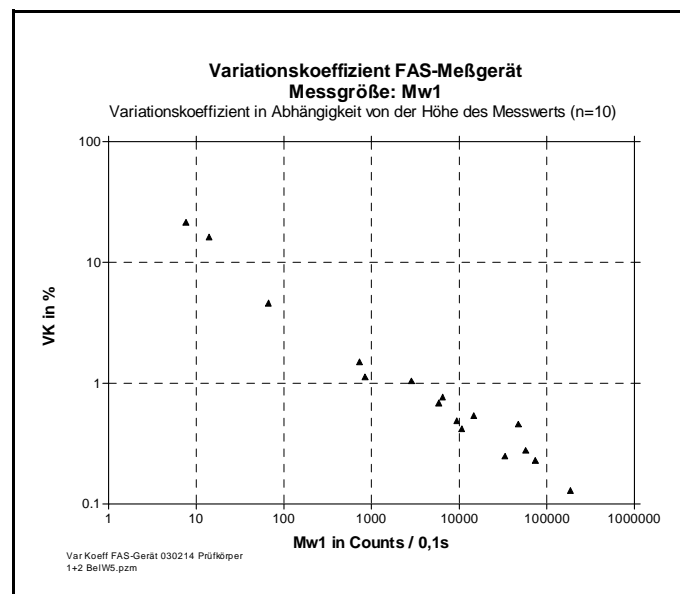


Abbildung 57: Messgröße Mw1, Integrationsparameter BelW=5

4.2.7.3.3.2 Variationskoeffizient der Meßgröße R40

Der V_k von R40 sinkt bei steigendem Meßwert, da der Anteil des Rauschens am Meßwert relativ abnimmt. Bei erhöhter Anzahl interner Messungen mittelt sich der Rauschbeitrag grundsätzlich stärker heraus, jedoch beträgt die theoretisch zu erwartende Verbesserung $v = 1,29$, ein kaum zu erkennender Unterschied.

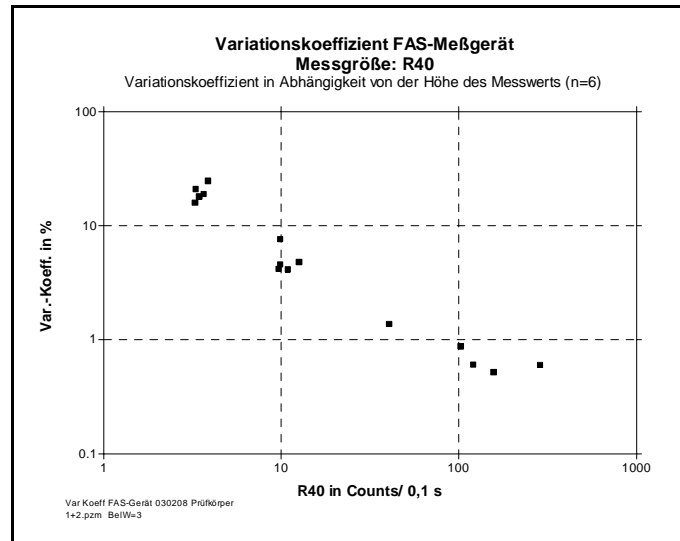


Abbildung 58: Messgröße R40, Integrationsparameter BelW=3

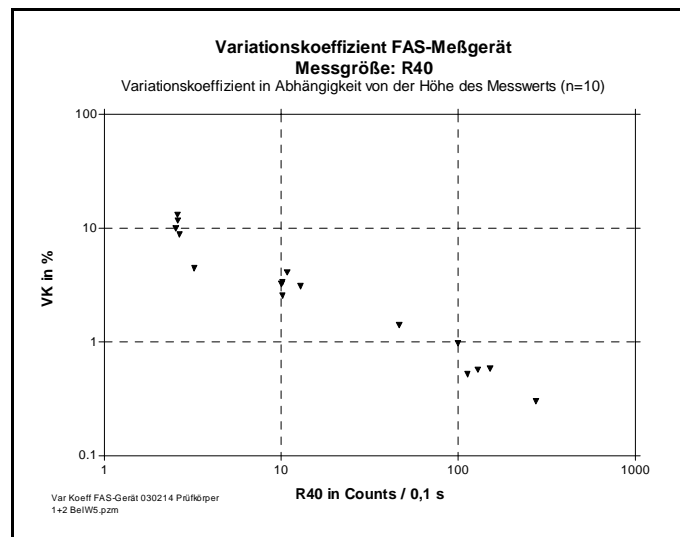


Abbildung 59: Messgröße R40, Integrationsparameter BelW=5

4.2.7.3.3.3 Variationskoeffizient von R40 relativ

Für die Größe R40relativ wird der Quotient zweier Meßwerte gebildet ($R401/R402$), so daß die Variation zweier Meßwerte in das Ergebnis eingeht. Das Verhältnis von zwei R40-Werten ist eine dimensionslose Zahl. Der Variationskoeffizient der R40relativ-Werte hängt von der Absoluthöhe der R40-Werte ab, da diese rauschbehaftet sind.

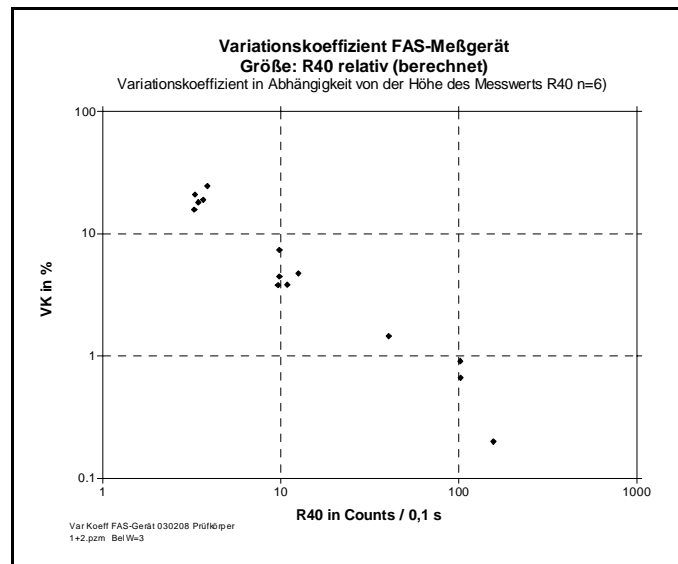


Abbildung 60: Messgröße R40relativ, Integrationsparameter BelW=5

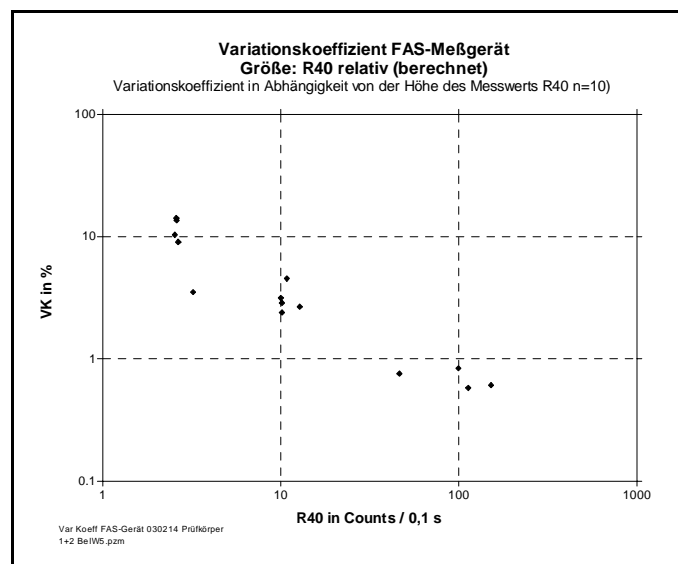


Abbildung 61: Messgröße R40relativ, Integrationsparameter BelW=3

4.2.7.3.3.4 Variationskoeffizient von ChiE/H50

ChiE/H50 ist eine berechnete Größe und in starkem Maße rauschempfindlich. Entsprechend können große V_K vorkommen. Es ist sowohl eine Abhängigkeit der Größe von der Absoluthöhe der gemessenen Werte als auch von der Kurvenkrümmung zu erwarten. Entsprechend wurden $V_{K,s}$ für beide Abhängigkeiten bestimmt.

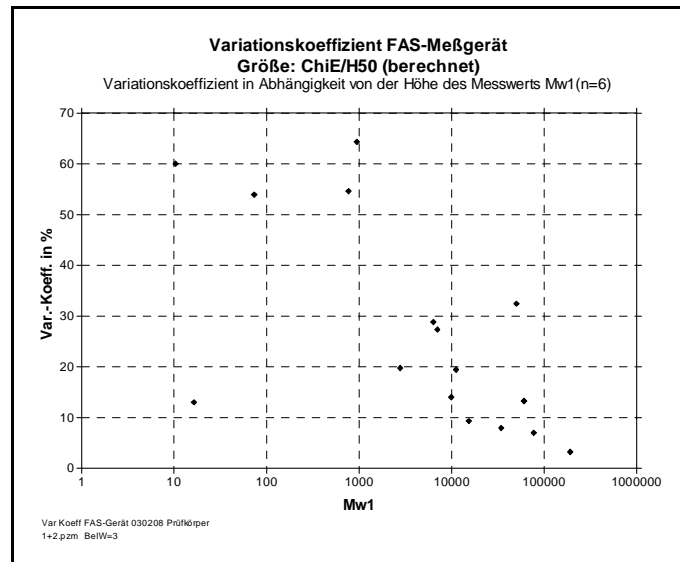


Abbildung 62: Messgröße Chi/H50, Integrationsparameter BelW=3

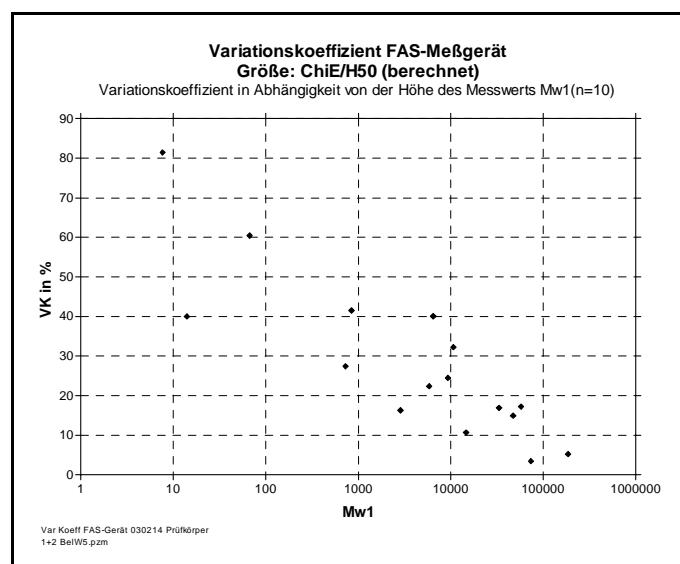


Abbildung 63: Messgröße Chi/H50, Integrationsparameter BelW=5

Der verwendete Prüfkörper aus Glas weist ein schnelles Abklingen seiner Emission auf. Entsprechend tritt schnell ein relativ hoher Rauschanteil auf, der zwangsläufig zu starken Schwankungen der Größe ChiE/H50w führt. Bei pflanzlichen Proben klingt die Emission zumeist langsamer ab und führt zu ChiE/H-Werten mit geringerer Variation. Der ermittelte V_K stellt daher eine konservative Abschätzung dar.

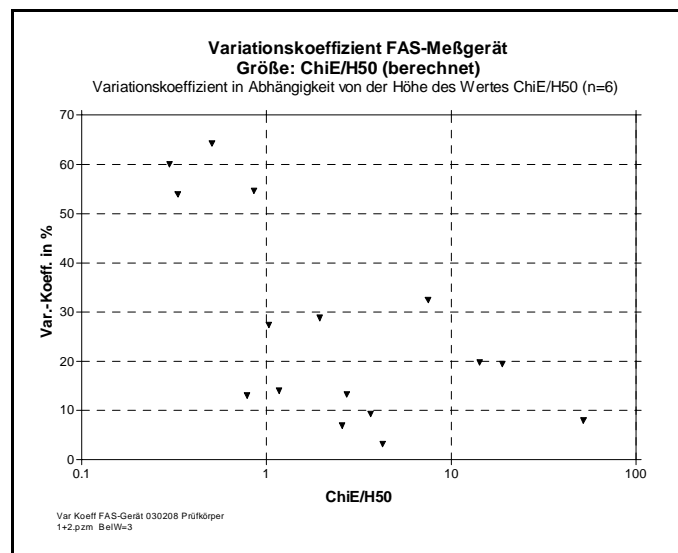


Abbildung 64: Messgröße Chi/H50, Integrationsparameter BelW=5

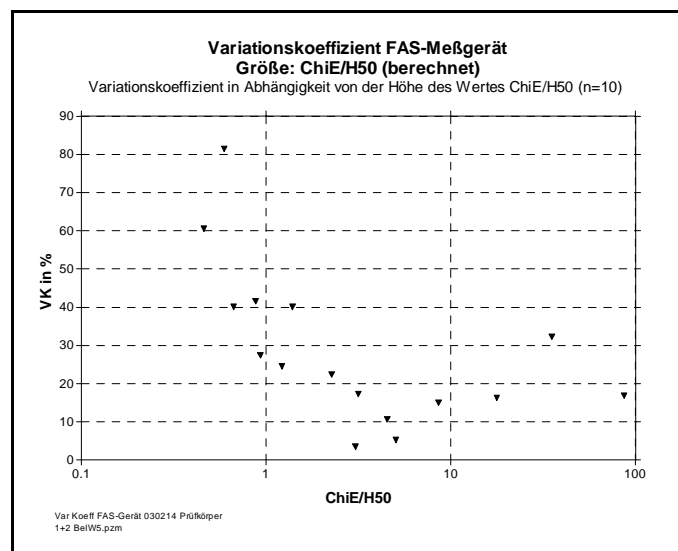


Abbildung 65: Messgröße Chi/H50, Integrationsparameter BelW=3

4.2.7.3.4 Wiederholpräzision des instrumentellen Meßvorgangs

Die Wiederholpräzision wurde an 6 verschiedenen Meßtagen mittels Prüfkörper 1 bestimmt. Das Meßwertniveau bei Mw1w und R40 liegt so, daß die zugehörige Meßpräzision 0,5 % bzw. 1% beträgt. Der gegenüber der Meßpräzision höhere V_K der Wiederholpräzision ist plausibel, da aufgrund der zusätzlich eingehenden langfristigen zufälligen Fehler die Wiederholpräzision nicht besser als die Meßpräzision werden kann.

Messtag	1	2	3	4	5	6	Mittelwert	Std.-Abw	V_K
Mw1w [Counts/0,1s]	30969	30978	31778	31575	33078	32291	31732,7	871	2,74 %
R40w [Counts/0,1s]	112,10	106,78	109,05	107,45	107,33	111,05	108,96	2,19	2,01 %
R40blau/uv [%]	38,096	39,570	41,583	40,309	38,144	41,661	39,890	1,58	3,97 %
ChiE/H50w	77,4	57,2	20,9	66,9	50,6	38,6	51,9	20,2	38,9 %

Tabelle 10: Wiederholpräzision bei Glasprüfkörper an 6 Messtagen

Die Wiederholpräzision wird als voll zufriedenstellend angesehen. Sie stellt eine konservative Abschätzung dar, da die Emission des Prüfkörpers von der Temperatur abhängt und dessen Temperaturvariation mit in die Wiederholpräzision einging. Der hohe V_K für ChiE/H50w spiegelt die starke Empfindlichkeit gegen Rauschanteile wider und ist zu einem geringeren Anteil auch auf die Eigenart des Prüfkörpers zurückzuführen.

4.2.7.4 Präzision und Wiederholbarkeit des matrixabhängigen Meßvorgangs für die Probenart Weizen

Dieser Abschnitt stellt den zweiten Teil der Validierung dar. Zusätzlich zur bereits untersuchten Meßpräzision beeinflussen jetzt von der Probe abhängige Faktoren die Präzision des Meßvorgangs. Die Eigenschaften der Probenart Weizen führen zur gewählten Meßweise. Es wird dargestellt, welche systematischen Fehler durch eine Meßweise auftreten und wie sie vermieden werden. Die Robustheit des Verfahrens wird durch Variation der Trocknungsbedingungen demonstriert.

4.2.7.4.1 Systematische Beurteilung der Faktoren, die den matrixabhängigen Meßvorgang bei Weizen beeinflussen können

Von folgenden Faktoren ist Einfluß auf die Methodenpräzision zu erwarten:

- Probengröße (mittelt die Inhomogenität des Probenmaterials aus)

- Luftfeuchte
- Temperatur

4.2.7.4.1.1 Probengröße

Wie alle (biologischen) Proben zeigt auch Weizen bei seinen Meßgrößen eine Streubreite innerhalb der gleichen Probe (Proben-Inhomogenität). Die vorliegende praktische Erfahrung hatte gezeigt, daß eine geeignete Stichprobe ca. 40 g Weizen umfaßt. Zusätzlich durchgeführte Untersuchungen führten schließlich zu der Aussage, daß mittels 12 – 14 Messungen von je 4 g Weizen mit 95%iger Wahrscheinlichkeit solche Unterschiede zwischen den Proben gefunden werden, die größer sind als das 2-fache der Standardabweichung der Messung. D.h. bei einem V_K der Weizenmessung von 2,5 % lassen sich mit 95 % iger Wahrscheinlichkeit Unterschiede finden, die größer als 5 % sind.

Dieses Ergebnis führte auf eine Probengröße von 48 – 56 g Weizen, ein Wert der gut mit der vorliegenden Erfahrung übereinstimmt.

4.2.7.4.1.2 Luftfeuchte

Wegen des bekannten Zusammenhangs zwischen Meßwerten und Wassergehalt werden Weizenproben vor der Prüfung im Exsikkator gemeinsam getrocknet und dadurch zugleich äquilibriert.

Die Meßgröße Mw1 hängt besonders stark mit dem Wassergehalt zusammen. Sie wird deshalb bei der FAS-Messung als Indikator des Wassergehalts verwendet. Der Trocknungsverlauf wird anhand der Mw1-Werte verfolgt. Dazu dienen abgekürzte Meßzyklen (,Vorbereitungsmessungen‘), die durch den Integrationsparameter BelW=1 weniger Zeit beanspruchen als Messungen mit BelW=3 oder BelW=5 (,reguläre Messungen‘). Sind Meßwerte oberhalb von ca. 150.000 Counts/100ms erreicht, so wird mit den regulären Messungen begonnen.

Die Auswirkungen der nach dem Maximum auftretenden Variationen der Meßwerte auf die Methode werden weiter unten diskutiert.

4.2.7.4.2 Meßpräzision - bei einer Küvettenfüllung

Eine Küvettenfüllung wurde im gleichen Sektor 6 mal nacheinander mit 3 Einstellungen des Integrationsparameters BelW gemessen (BelW = 1, 3 und 5).

Meßwert Mw1

Die Tabelle der zugehörigen V_K von Mw1 zeigt, daß bei Weizen ein höherer V_K auftritt, als beim

Gerät allein (siehe Abschnitt 4.3.6.3.3.1).

Mw1	BelW=1	BelW=3	BelW=5
Mittelwert	238 834,7	232 549,2	219 135,5
Standardabw.	1 881,2	3 980,0	3 926,0
V_K Weizen	0,79 %	1,71 %	1,79 %
V_K Gerät allein		< 0,3 %	< 0,3 %

Tabelle 11: Messpräzision des Messwertes Mw1 bei Weizen (gleiche Küvettenfüllung)

Bei BelW=3 und 5 ergab sich ein größerer V_K als bei BelW=1. Ursache ist ein Trend der Meßdaten zu sinkenden Werten (siehe folgende Grafik).

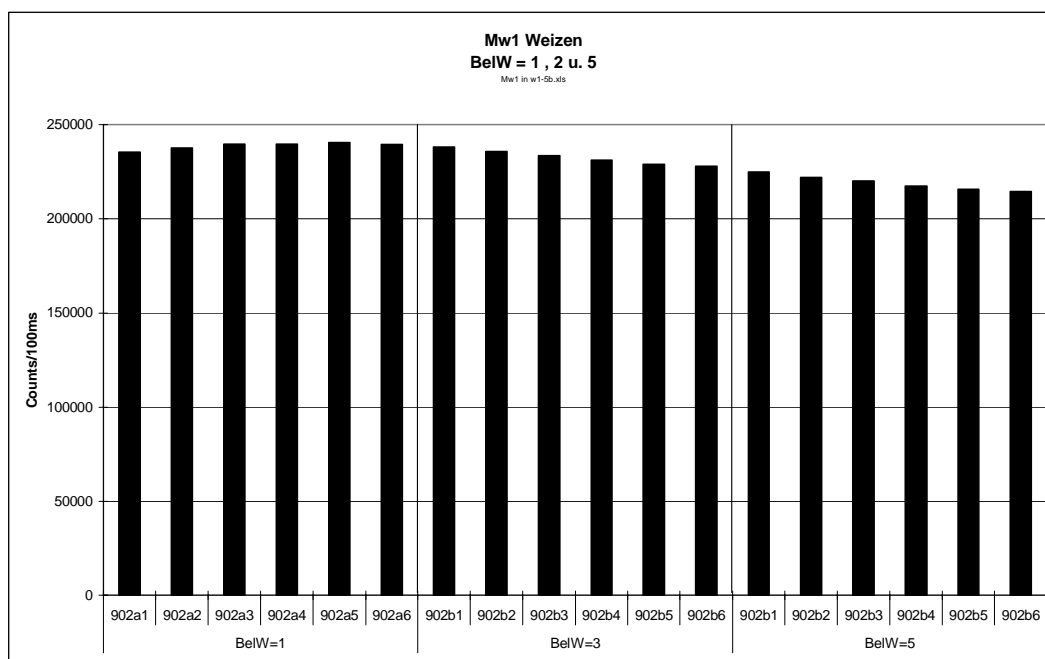


Abbildung 66 Drei 6-fach Bestimmungen des Meßwertes Mw1 bei Weizen, wobei der Integrationsparameter BelW variiert wurde (links: BelW=1, Mitte: BelW=3, rechts: BelW=5).

Die längere Meßdauer bei BelW=3 und 5 führt vermutlich dazu, daß Feuchtigkeit aus der Luft in die extrem trockene Kornoberfläche eindiffundiert und sich dies entsprechend in deutlich sinkenden Meßwerten zeigt. Wie weiter oben bereits dargestellt wurde, ist erhöhter Wassergehalt mit geringeren Mw1-Werten korreliert.

Um systematische Fehler durch einen solchen Trend zu vermeiden, wird dieselbe Weizenprobe maximal 2 mal nacheinander gemessen. Vor weiteren Messungen folgt eine Zwischentrocknung

und -äquilibration im Exsikkator über Silicagel gemäß Verfahrensbeschreibung Weizen.

Meßwert R40w

Ein Trend der Meßwerte war hier nicht erkennbar, wie die folgende Grafik zeigt.

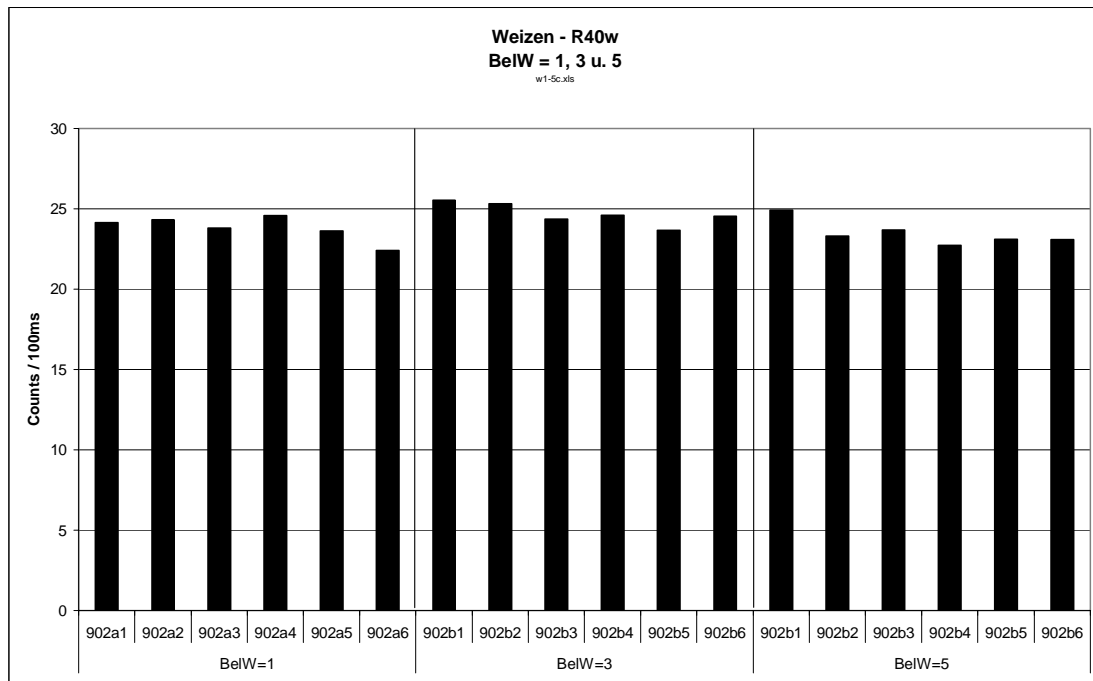


Abbildung 67: Drei 6-fach Bestimmungen des Meßwertes R40w bei Weizen, wobei der Integrationsparameter BelW variiert wurde (links: BelW=1, Mitte: BelW=3, rechts: BelW=5).

R40w	BelW=1	BelW=3	BelW=5
Mittelwert	23,80	24,66	23,46
Standardabw.	0,765	0,674	0,777
V_k Weizen	3,21 %	2,73 %	3,31 %

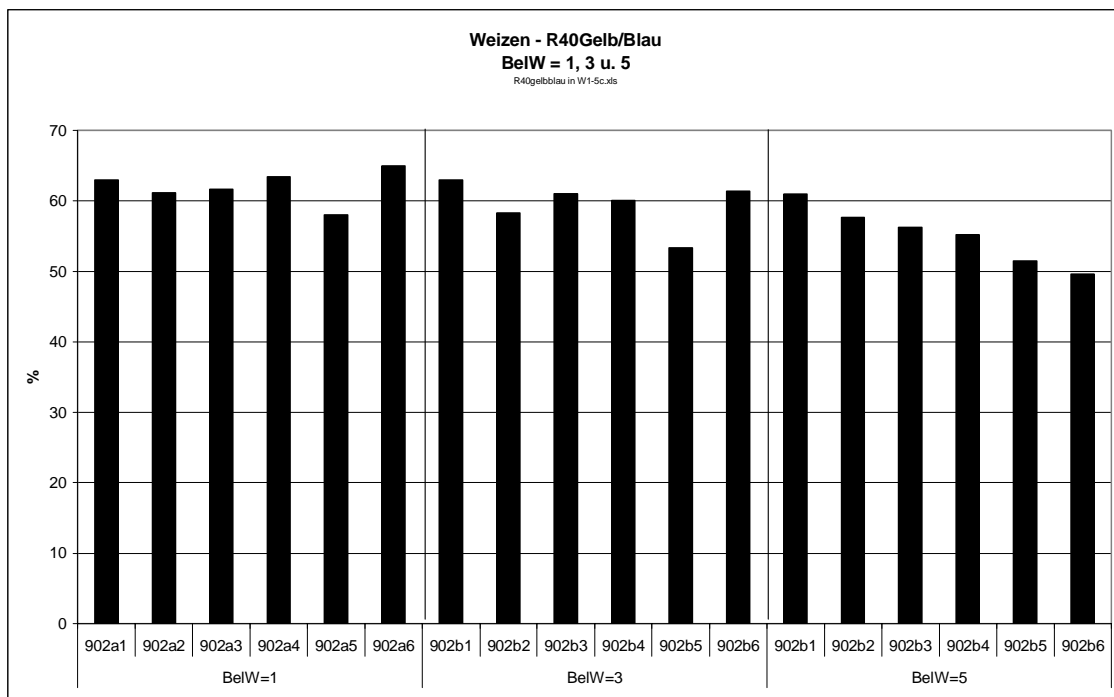
Tabelle 12: Messpräzision des Messwertes R40w bei Weizen (gleiche Küvettenfüllung)

Meßwert R40gelb/blau

R40gelb/blau	BelW=1	BelW=3	BelW=5
Mittelwert	62,03	59,51	55,19
Standardabw.	2,373	3,404	4,138
V_K Weizen	3,83 %	5,72 %	7,50 %
V_K Gerät allein		< 2 %	< 1 %

Tabelle 13: Messpräzision des Messwertes R40gelb/blau bei Weizen (gleiche Küvettenfüllung)

Beim Integrationsparameter BelW=5 ergab sich der höchste V_K . Er war auf einen Trend zu sinkenden Werten zurückzuführen (siehe folgende Grafik). Als Ursache kommt wie bei Mw1 die zunehmende Wasseraufnahme durch die Kornoberfläche in Betracht.

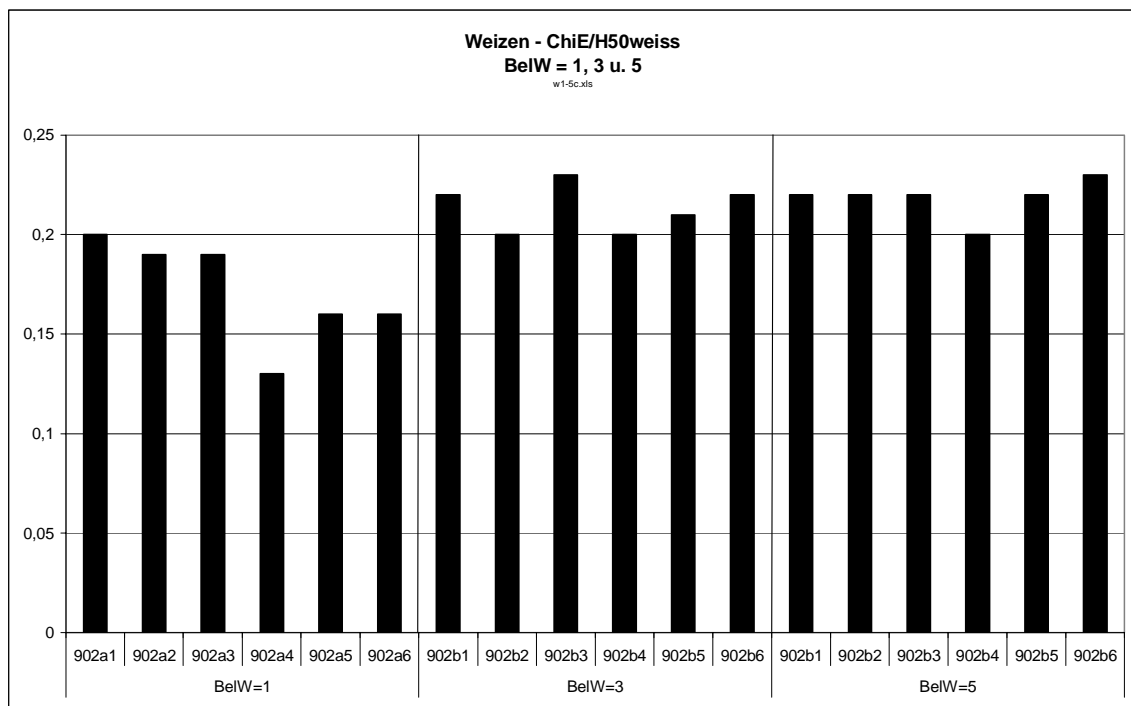
**Abbildung 68:** Drei 6-fach Bestimmungen des Meßwertes R40gelb/blau bei Weizen, wobei der Integrationsparameter BelW variiert wurde (links: BelW=1, Mitte: BelW=3, rechts: BelW=5).

Meßwert ChiE/H50w

ChiE/H50weiss	BelW=1	BelW=3	BelW=5
Mittelwert	0,172	0,213	0,218
Standardabw.	0,026	0,012	0,010
V_K Weizen	15,4 %	5,68 %	4,50 %
V_K Gerät allein		< 20 %	< 20 %

Tabelle 14: Messpräzision des Messwertes Chi/H50w bei Weizen (gleiche Küvettenfüllung)

Die Streuung der Daten ist hier besonders stark vom Integrationsparameter BelW abhängig, da für die Berechnung des Kurvenverlauf zunächst eine mittlere Kurve aus den vorhandenen Daten errechnet wird. Bei einer Kurve (BelW=1) wirkt sich der Rauschanteil noch relativ stark aus, bei 5 Kurven (BelW=5) ist der Rauschanteil bereits relativ gut herausgemittelt (siehe Abbildung 69).

**Abbildung 69:** Drei 6-fach Bestimmungen des Meßwertes ChiE/H50w bei Weizen, wobei der Integrationsparameter BelW variiert wurde (links: BelW=1, Mitte: BelW=3, rechts: BelW=5).

4.2.7.4.3 Meßpräzision - mehrere Küvettenfüllungen am gleichen Meßtag

Es wurde die gleiche Teilprobe gemessen, wobei die Küvette 6 mal mit dieser Teilprobe befüllt wurde. Von jeder Küvettenfüllung wurden nacheinander die Sektoren 1 - 4 gemessen ($BelW = 3$). Die Messungen erfolgten fortlaufend am gleichen Tag.

Messung	1	2	3	4	5	6	Mittelwert	Std.-Abw	V_K
Mw1w [Counts/0,1s]	249653,5	233389,8	217445,8	217837,3	207969,3	201020,5	221219,3	17696,67	8,00 %
R40w [Counts/0,1s]	26,29	25,60	24,69	23,49	23,34	21,70	24,25	1,78	7,34
R40blau/uv [%]	0,21	0,25	0,29	9,27	0,28	0,31	0,266	0,037	14,0 %
ChiE/H50w	74,75	74,04	71,32	69,14	66,25	69,43	70,82	3,22	4,54 %

Tabelle 15: Messpräzision bei Weizen bei mehreren Küvettenfüllungen am gleichen Messtag

Der V_K des Meßwertes Mw1 liegt deutlich über dem V_K einer Einzelmessung, wobei die Einzeldaten der folgenden Tabelle die Ursache des erhöhten V_K zeigen.

Messung	Mw1 Meßwerte	Mw1 Std.-Abw.	Mw1 V_K der Einzelmessung
1	249.653,5	4.057,3	1,63
2	233.389,8	4.119,9	1,77
3	217.445,8	5.289,5	2,43
4	217.837,3	5.898,1	2,71
5	207.969,3	5.058,4	2,43
6	201.020,5	7.574,0	3,77

Tabelle 16: Zeitliche Folge der Variationskoeffizienten bei Weizen bei mehreren Küvettenfüllungen am gleichen Messtag

Der Variationskoeffizient innerhalb der jeweiligen Messung steigt mit der Messungsnummer an. Besonders auffällig ist das Sinken der Meßwerte Mw1. Die folgende Grafik macht den Trend der Meßwerte sichtbar. Die Toleranzfelder geben die Standardabweichung der jeweiligen Messung an.

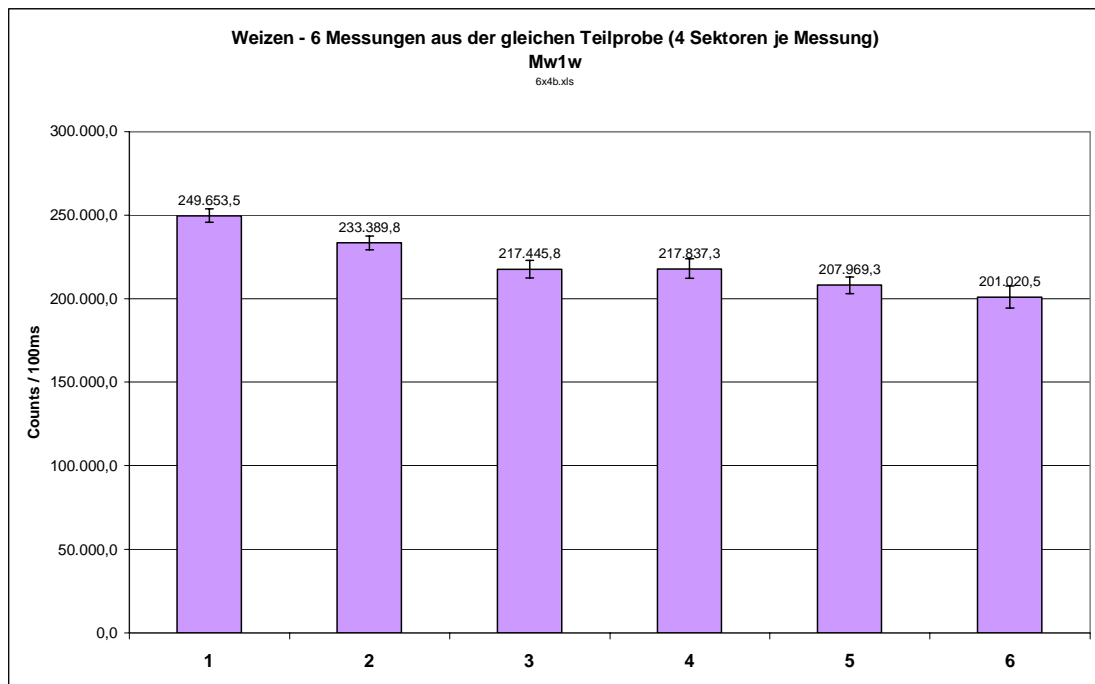


Abbildung 70: Aufeinanderfolgende Messungen von Weizen bei gleicher Teilprobe jedoch jeweils erneutem Einfüllen in die Meßküvette.

Das Absinken der Mw1-Werte anlässlich der Neubefüllung der Küvette ist deutlich. Die Berechnung des Variationskoeffizienten über die 6 Messungen ist daher eigentlich sinnlos, da der Trend zu einem systematischen Fehler führt.

Ursache des Trends ist die bereits mehrfach erwähnte Feuchtigkeitsaufnahme durch die Oberfläche der Weizenkörner. Sie tritt durch die Neubefüllung der Küvette besonders stark hervor, da die Körner bei jedem Neubefüllen intensiver mit der Luft in Kontakt kommen als ruhend in der Küvette. Auch die weiteren Meßwerte R40w und R40gelb/blau zeigen einen Trend. Auf die Darstellung der Einzelheiten wird verzichtet.

Praktisch ist die 6-fache Messung derselben Probe unmittelbar nacheinander nicht sinnvoll (wie die obigen Daten belegen) und in den Arbeitsanweisungen auch nicht vorgesehen. Statt dessen werden Proben am gleichen Meßtag nur einmal aus dem luftdichten Vorratsgefäß in die Meßküvette überführt und gemessen und dann zur nächsten Probe übergegangen. Erst nach einer Zwischentrocknung und Äquilibrierung über Silicagel während 12 Stunden wird eine weitere Meßreihe durchgeführt.

4.2.7.4.4 Meßpräzision - mehrere unabhängige Küvettenfüllungen am gleichen Meßtag

Eine Weizenprobe wurde in 6 Teilproben geteilt. Jede Teilprobe wurde als 1 Küvettenfüllung gemessen ($BelW = 3$). Die Messungen erfolgten fortlaufend am gleichen Tag. Bei dieser Untersuchungsweise der Meßpräzision geht zwar die Inhomogenität zwischen den Teilproben in den V_K mit ein, die Veränderungen der Probe im Meßzeitraum sind jedoch auf ein unvermeidliches Minimum beschränkt.

Messung	1	2	3	4	5	6	Mittelwert	Std.-Abw	V_K
Mw1w [Counts/0,1s]	255409,5	267082,0	255687,5	255953,0	261296,0	266319,5	260291,3	5427,9	2,09 %
R40w [Counts/0,1s]	30,90	30,90	31,50	29,80	31,30	31,90	31,05	0,72	2,32 %
R40blau/uv [%]	72,27	69,85	66,42	69,46	72,15	68,50	69,78	2,23	3,19

Tabelle 17: Messpräzision bei Weizen bei Küvettenfüllungen aus verschiedenen Teilproben am gleichen Messtag

Die Daten lassen erwartungsgemäß keinen Trend erkennen sondern variieren zufallsbedingt. Um sicherzustellen, daß es sich dabei tatsächlich um die normale Meßpräzision handelt, wurden Untersuchungen dieser Art an verschiedenen Tagen weitere 6 mal wiederholt. Die folgende Tabelle zeigt die V_K 's aller 7 Meßreihen zur Bestimmung der Meßpräzision von Weizen.

Meßreihe	1	2	3	4	5	6	7	mittlerer V_K
V_K -Mw1w	2,09 %	2,18 %	1,38 %	2,24 %	2,13 %	2,61 %	1,71 %	2,05 %
V_K -R40w	2,32 %	2,28 %	2,09 %	2,24 %	1,86 %	3,41 %	3,43 %	2,52 %
V_K -R40gelb/blau	3,19 %	2,27 %	3,63 %	1,87 %	4,64 %	2,76 %	2,65 %	3,00 %

Tabelle 18: Messpräzision bei Weizen bei Küvettenfüllungen aus verschiedenen Teilproben ermittelt an verschiedenen Messtagen

Die Werte für den V_K variieren in engen Grenzen zufallsbedingt, wie dies bei störungsfreien Messungen zu erwarten ist.

4.2.7.4.5 Wiederhol-Präzision - mehrere Küvettenfüllungen an verschiedenen Meßtagen

Eine Weizenprobe wurde in 6 Teilproben geteilt. An 5 Meßtagen wurden jeweils alle 6 Teilproben in 7 Meßreihen gemessen (=6-fache Wiederholung je Meßreihe). Die Meßreihen 2 u.3 erfolgten am gleichen Tag, ebenso erfolgten die Meßreihen 4 u. 5 an einem Tag. Dabei wurde jede Teilprobe als 1 Küvettenfüllung in 1 Sektor gemessen ($BelW=3$).

Messung	1	2	3	4	5	6	7	Mittelwert	Std.-Abw	V _K
Mw1w [Counts/0,1s]	260291,3	277832,5	270102,5	263173,2	253158,4	262806,1	259600,3	263852,0	7970,6	3,02 %
R40w [Counts/0,1s]	31,05	31,02	29,52	27,43	26,27	26,82	30,47	28,94	2,06	7,10 %
R40blau/uv [%]	69,78	77,84	73,68	66,23	67,80	67,61	69,41	70,34	4,07	5,79 %

Tabelle 19: Messpräzision bei Weizen ermittelt an 6 Teilproben je Messreihe (7 Messreihen an 5 Tagen)

Den zeitlichen Verlauf der Werte läßt die folgende Grafik besser erkennen. Die Meßreihe 3 ergab einen niedrigeren Wert als Meßreihe 2, ebenso die Meßreihe 5 im Vergleich zu 4. Dies bestätigt, daß bei 2 Messungen an einem Tag die Feuchtigkeitsaufnahme durch die Körner nicht vernachlässigt werden darf. Der dabei auftretende Unterschied ist jedoch gering im Vergleich zu dem Unterschied zwischen den Meßreihen 1 und 2, die an verschiedenen Meßtagen durchgeführt wurden.

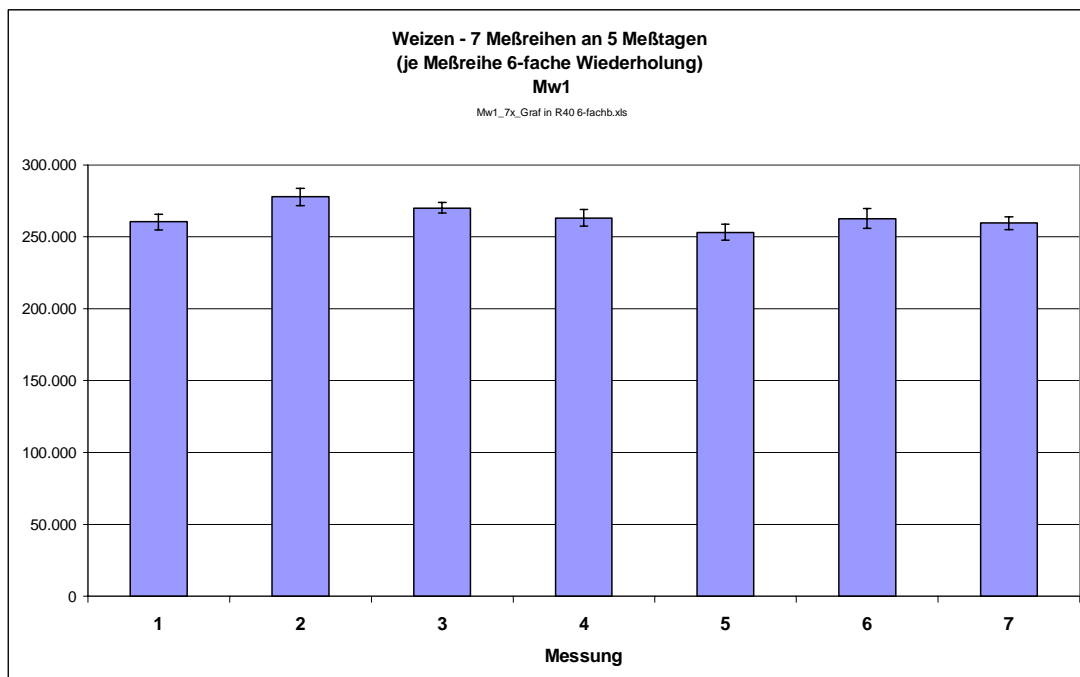


Abbildung 71. Mw1w-Ergebnisse von 7 Weizen-Meßreihen (n=6) der gleichen Teilproben an 5 Meßtagen (2 u. 3 gleicher Meßtag sowie 4 u. 5 gleicher Meßtag).

Der Verlauf der Meßwerte R40w hat eine etwas andere Zeitdynamik, wie die folgende Grafik zeigt. Auch hier sind die Unterschiede zwischen den Wiederholungen einer Meßreihe kleiner als zwischen den Meßtagen.

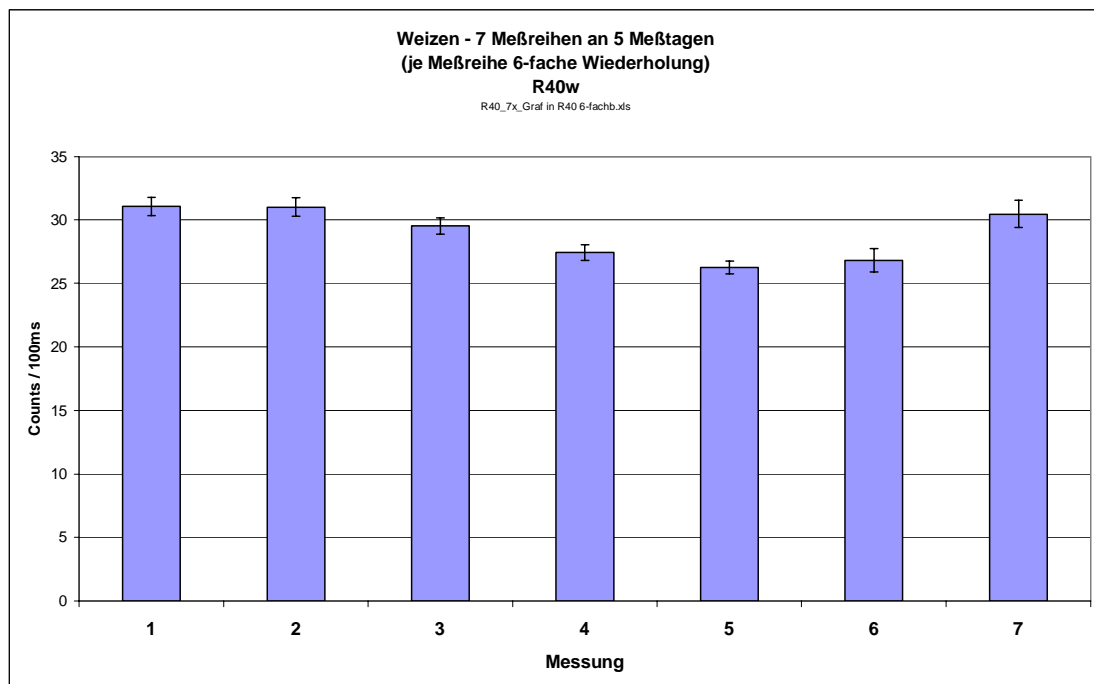


Abbildung 72: R40w-Ergebnisse von 7 Weizen-Meßreihen (n=6) der gleichen Teilproben an 5 Meßtagen (2 u. 3 gleicher Meßtag sowie 4 u. 5 gleicher Meßtag).

Die Meßwerte R40Gelb/Blau zeigen wiederum eine etwas andere Zeitdynamik, wie die Abbildung 73 zeigt. Auch hier sind die Unterschiede zwischen den Wiederholungen einer Meßreihe kleiner als zwischen den Meßtagen.

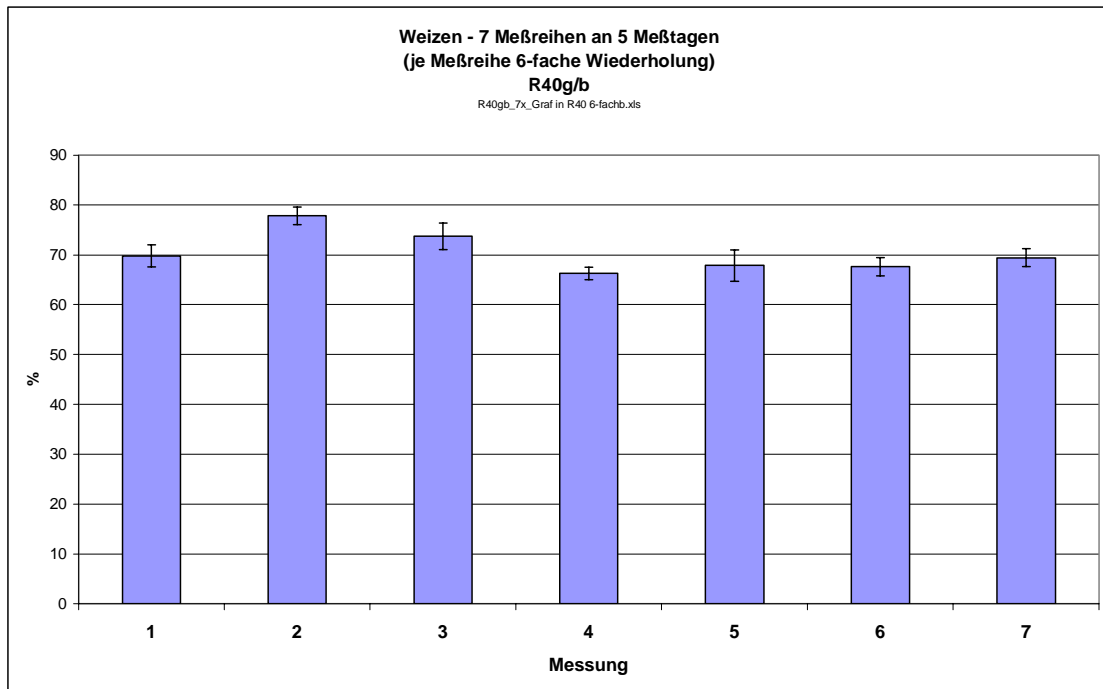


Abbildung 73. R40gelb/blau-Ergebnisse von 7 Weizen-Meßreihen (n=6) der gleichen Teilproben an 5 Meßtagen (2 u. 3 gleicher Meßtag sowie 4 u. 5 gleicher Meßtag).

Wie diese Ergebnisse zeigen, weisen Messungen der gleichen Probe an verschiedenen Meßtagen relativ große Unterschiede auf. Das bedeutet, daß das Probenmaterial Weizen innerhalb des Meßzeitraumes Veränderungen unterliegt. Vergleiche von Proben mit geringen Unterschieden würden ohne Berücksichtigung oder Kompensation dieser Veränderungen erschwert.

4.2.7.4.6 Kompensation von Veränderungen des Probenmaterials Weizen im Meßzeitraum
Es ist möglich, die Variation der Ergebnisse im vorigen Abschnitt (4.3.6.4.5) als zufallsbedingte Schwankungen anzusehen. Dies trifft jedoch nur teilweise zu. Der Trend in der Veränderung der Meßwerte bei mehrfach kurz nacheinander durchgeführten Messungen zeigt, daß dabei ein systematischer Anteil enthalten ist. Ein solcher Trend tritt bei einem Prüfkörper nicht auf. Der systematische Anteil kann also nicht durch systematische Veränderungen des Meßgerätes verursacht werden, sondern muß auf Veränderungen des Probenmaterials beruhen. Dies wird bestätigt durch die Bestimmung des V_K durch 6-fache Wiederholung einer Meßreihe mit unabhängigen Teilproben, wie sie im Abschnitt 4.6.4.4 enthalten ist. Die 6 unabhängigen Teilproben ergeben Meßwerte mit einer Standardabweichung, die deutlich geringer ist, als die der 6-fachen Messung der gleichen Probe. Außerdem zeigen die 6 unabhängigen Teilproben keinen

Trend der Meßwerte. Vermutlich ist die systematische Veränderung der Weizenproben auf Feuchtigkeitsaufnahme aus der Luft zurückzuführen.

Für die Darstellung in Abschnitt 4.3.6.4.5 wurden 7 Wiederholungen gewählt, um zumindest ansatzweise erkennbar werden zu lassen, daß Weizen systematischen Veränderungen unterliegt, so daß auch bei Messungen einer Probe verteilt über mehrere Meßtage geeignete Maßnahmen erforderlich sind, um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten.

Die Veränderung der Meßdaten von einem Meßttag zum nächsten betrifft alle Teilproben in ähnlicher Weise. Es kann sich dabei also nicht um Inhomogenitäten des Probenmaterials handeln. Nach den Langzeitmessungen gleicher Proben (siehe oben), ist davon auszugehen, daß Weizen Variationen unterliegt. Es liegt nahe, daß es sich um Reaktionen auf die an den verschiedenen Meßttagen unterschiedliche Luftfeuchte handelt. Zum Zeitpunkt dieser Messungen wurde die Luftfeuchtigkeit noch nicht aufgezeichnet. Vergleichbare Variationen beobachtete auch Neurohr bei Untersuchungen an Kressesamen während eines ganzen Jahres (NEUROHR 1992). Neurohr hatte seine Ergebnisse mit der Luftfeuchtigkeit verglichen und kam zu dem Ergebnis, daß die gemessenen Variationen durch die Luftfeuchtigkeit nur zum Teil erklärt werden. Er ging nach der Analyse seiner Daten davon aus, daß außer der Luftfeuchtigkeit ein weiterer Einflußfaktor vorliegen müßte.

Als Ergebnis der Untersuchungen der Meßpräzision ist festzuhalten, daß das Probenmaterial Weizen Veränderungen von Meßttag zu Meßttag unterliegt (im folgen als Tageseinfluß bezeichnet). Der Anteil des Tageseinflusses an der Gesamtvariation der Daten bei längeren Meßreihen läßt sich errechnen. Dazu wird der Mittelwert über alle an einem Tag gemessenen Proben gebildet (Tages-Mittelwert). Die Abweichung des Tages-Mittelwerts gegen einen langfristigen Durchschnittswert (den Durchschnittswert aller gemessenen Proben einer größeren Serie) ergibt den Tageseinfluß, der als Tagesfaktor angegeben werden kann (langfristiger Durchschnittswert =1).

Eine Kompensation um den Tageseinfluß erfolgt durch Division der Meßwerte durch den Tagesfaktor.

Alle Probenvergleiche bei Weizen wurden mit Durchführung einer solchen Kompensation berechnet.

4.2.7.4.7 Verfahrenspräzision

Aus den Untersuchungen zur Meßpräzision und Wiederholpräzision ergab sich, daß Veränderungen der Probe während des Meßvorgangs die begrenzende Größe für den V_K der Messung darstellen. Durch kurze Messungen und Meßwiederholungen nach Zwischentrocknung und Äquilibration konnten Veränderungen der Probenmatrix Weizen bereits relativ gering gehalten werden. Mehrere zu vergleichende Proben wurden jeweils am gleichen Tag gemessen. Vom Meßtag abhängige Einflüsse wurden gegen ein langfristiges Mittel kompensiert. Es war nun zu untersuchen, wie sich diese Maßnahmen beim Vergleich von Proben auswirken.

Die Verfahrenspräzision wurde an 10 verschiedenen Weizenproben bestimmt. Dazu wurden, wie oben beschrieben, an verschiedenen Meßtagen 18 Meßwiederholungen je Probe durchgeführt. Sämtliche Daten genügen bei einer Signifikanzgrenze von $p=0,05$ einer Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov test). Die Variationskoeffizienten für jede der Proben und die Meßgrößen Mw1, R40w, R40gelb/blau und ChiE/H50w enthält die folgende Tabelle:

n = 18	Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	mittlerer
	Mittelw	198223	236593	215830	202697	213518	194306	184556	201366	238788	228214	V_K
	StdAbw	6175	4591	4558	5056	3558	3369	4972	5637	6756	8109	
Mw1	V_K	3,12 %	1,94 %	2,11 %	2,49 %	1,67 %	1,73 %	2,69 %	2,80 %	2,83 %	3,55 %	2,49 %
	Mittelw	26,15	22,9	28,63	24,06	26,09	24,76	26,63	24,22	22,49	21,79	
	StdAbw	2,078	1,252	1,247	0,522	0,6514	0,7984	2,138	0,9123	2,413	0,9496	
R40w	V_K	7,95 %	5,47 %	4,36 %	2,17 %	2,50 %	3,22 %	8,03 %	3,77 %	10,73 %	4,36 %	5,25 %
	Mittelw	77,76	69,87	84,52	83,34	85,59	90,36	89,75	91,28	75,69	81,11	
	StdAbw	4,317	4,294	4,491	2,226	2,628	2,482	5,222	3,238	4,762	3,603	
R40g/b	V_K	5,55 %	6,15 %	5,31 %	2,67 %	3,07 %	2,75 %	5,82 %	3,55 %	6,29 %	4,44 %	4,56 %
	Mittelw	0,1788	0,1346	0,1598	0,1592	0,1294	0,2033	0,1703	0,2176	0,1602	0,1703	
	StdAbw	0,03659	0,03748	0,02867	0,02653	0,03646	0,04662	0,01867	0,04783	0,03098	0,01867	
ChiE/H50w	V_K	20,46 %	27,85 %	17,94 %	16,66 %	28,18 %	22,93 %	10,96 %	21,98 %	19,34 %	10,96 %	19,73 %

Tabelle 20: Verfahrenspräzision bei Weizen für die Meßgrößen Mw1w, R40w, R40gelb/blau u. ChiE/H50w, angegeben als mittlerer Variationskoeffizient, berechnet aus 10 Bestimmungen des Variationskoeffizienten.

Die rechte Spalte gibt den mittleren Variationskoeffizienten an, mit der die jeweilige Meßgröße bestimmt wurde. Diese Werte können für Weizen als repräsentativ für das Verfahren angesehen werden.

4.2.7.4.8 Wiederholbarkeit der Probentrennung bei Variation der Bedingungen

Zusätzlich zur zahlenmäßigen Bestimmung der Variationskoeffizienten unter Standardbedingungen erschien es sinnvoll, die Robustheit der Methode gegen starke Variationen des Trocknungs- und Äquilibrierungsverfahrens zu prüfen.

Dazu wurde an 10 unbekanntem Weizenproben untersucht, ob sie sich in vergleichbarer Weise trennen lassen, wenn die Trocknungsbedingungen variiert werden.

Die 4 Meßserien wurden von zwei Mitarbeiterinnen bearbeitet. Als Trocknungstemperaturen wurden 15°C (= Meßtemperatur), 20°, 40° und 45° C gewählt. Bei 20°C wurde zusätzlich der Druck reduziert. Eine Übersicht gibt die folgende Tabelle.

Meß-Serie	Wiederholungen	Trocknung	Mitarbeiter
A	n = 18	40° C, Normaldruck	A
B	n = 7	45° C, Normaldruck	A
C	n = 8	15° C, Normaldruck	B
V	n = 16	20° C, reduz. Druck	A

Tabelle 21: Übersicht über die Bedingungen beim Vergleich mehrerer Trocknungsverfahren

Die Ergebnisse werden für die 4 Meßgrößen Mw1, R40w, R40Gelb/Blau und ChiE/H50w in getrennten Diagrammserien dargestellt.

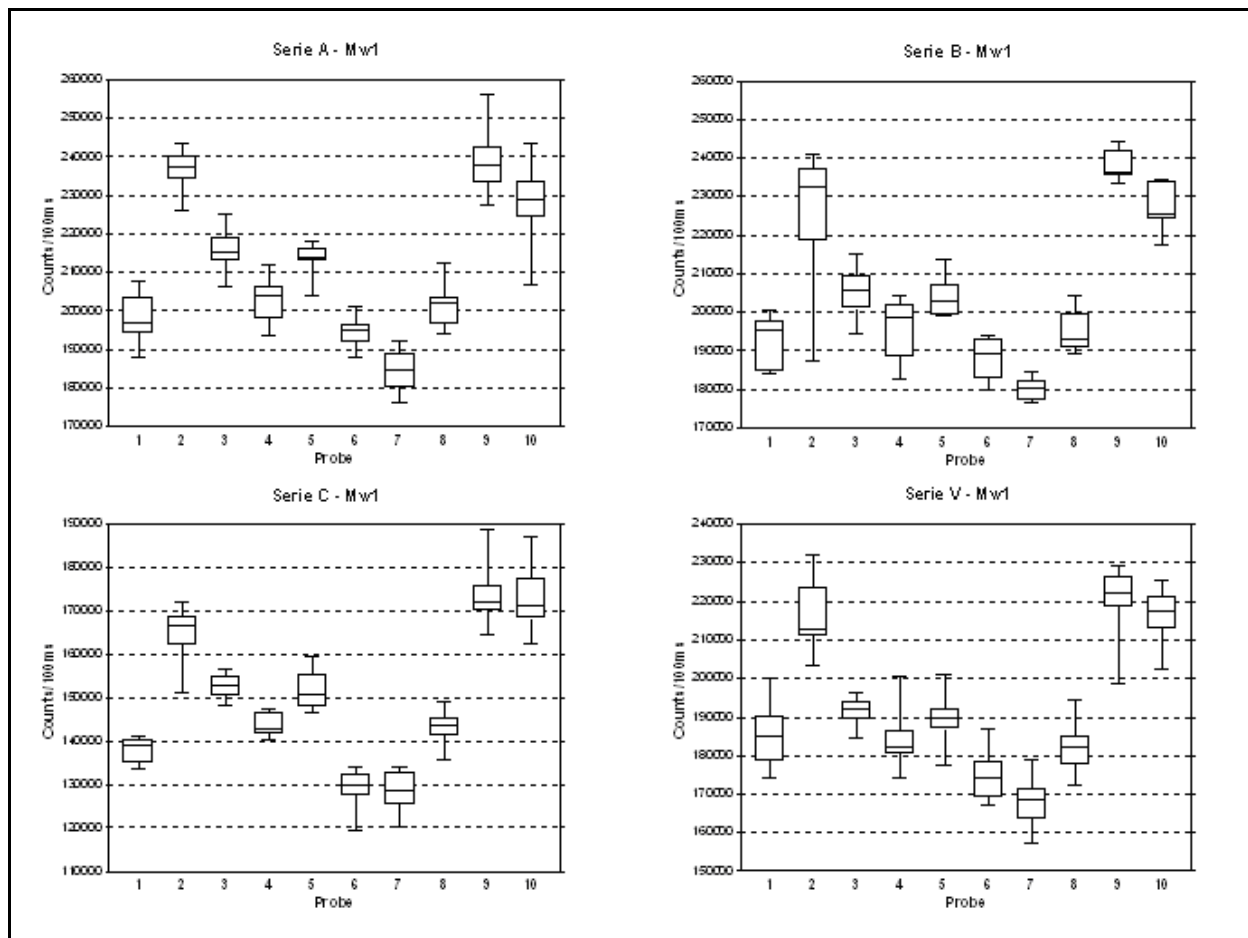
Meßgröße Mw1

Abbildung 74: Vier Trocknungsverfahren im Vergleich an 10 Weizenproben bezogen auf den Meßparameters Mw1w. Die Lage der 10 Proben zueinander ist weitgehend unabhängig vom Trocknungsverfahren.

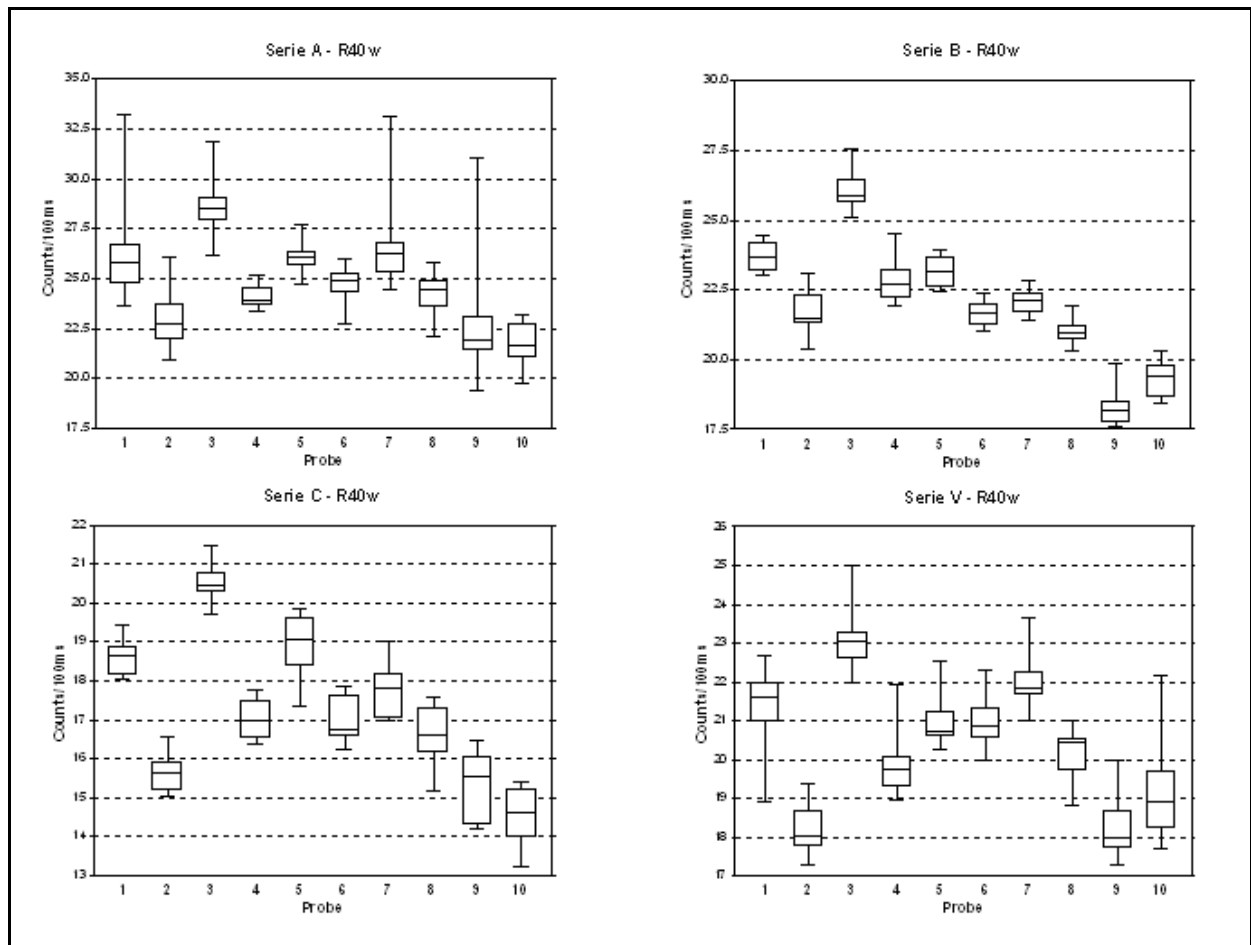
Meßgröße R40w

Abbildung 75: Vier Trocknungsverfahren im Vergleich an 10 Weizenproben bezogen auf den Meßparameter R40w. Die Lage der 10 Proben zueinander ist relativ ähnlich.

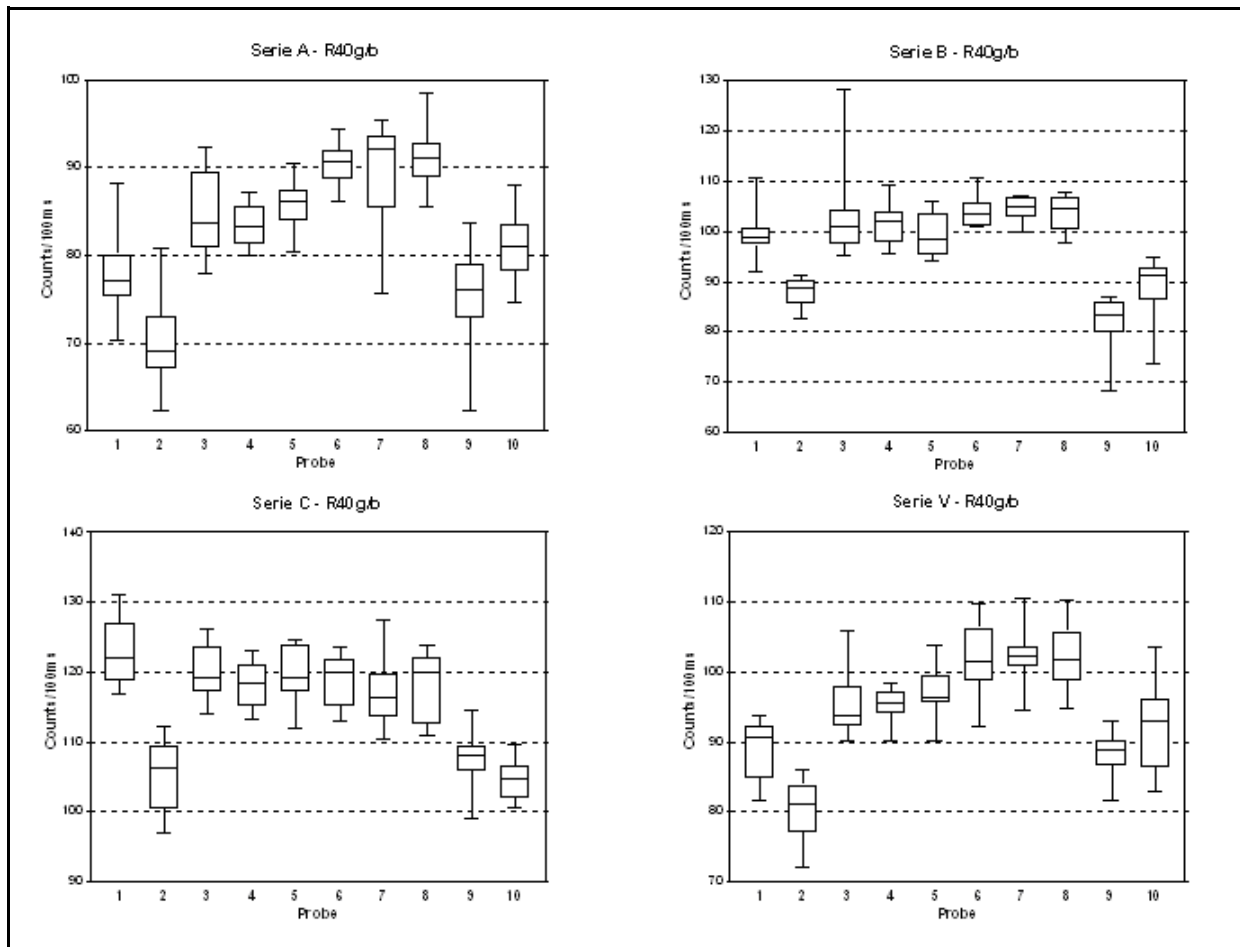
Meßgröße R40Gelb/Blau

Abbildung 76: Vier Trocknungsverfahren im Vergleich an 10 Weizenproben bezogen auf den Meßparameters R40g/b. Die Verfahren B und C mit der geringeren Zahl von Meßwiederholungen trennen hier weniger ausgeprägt.

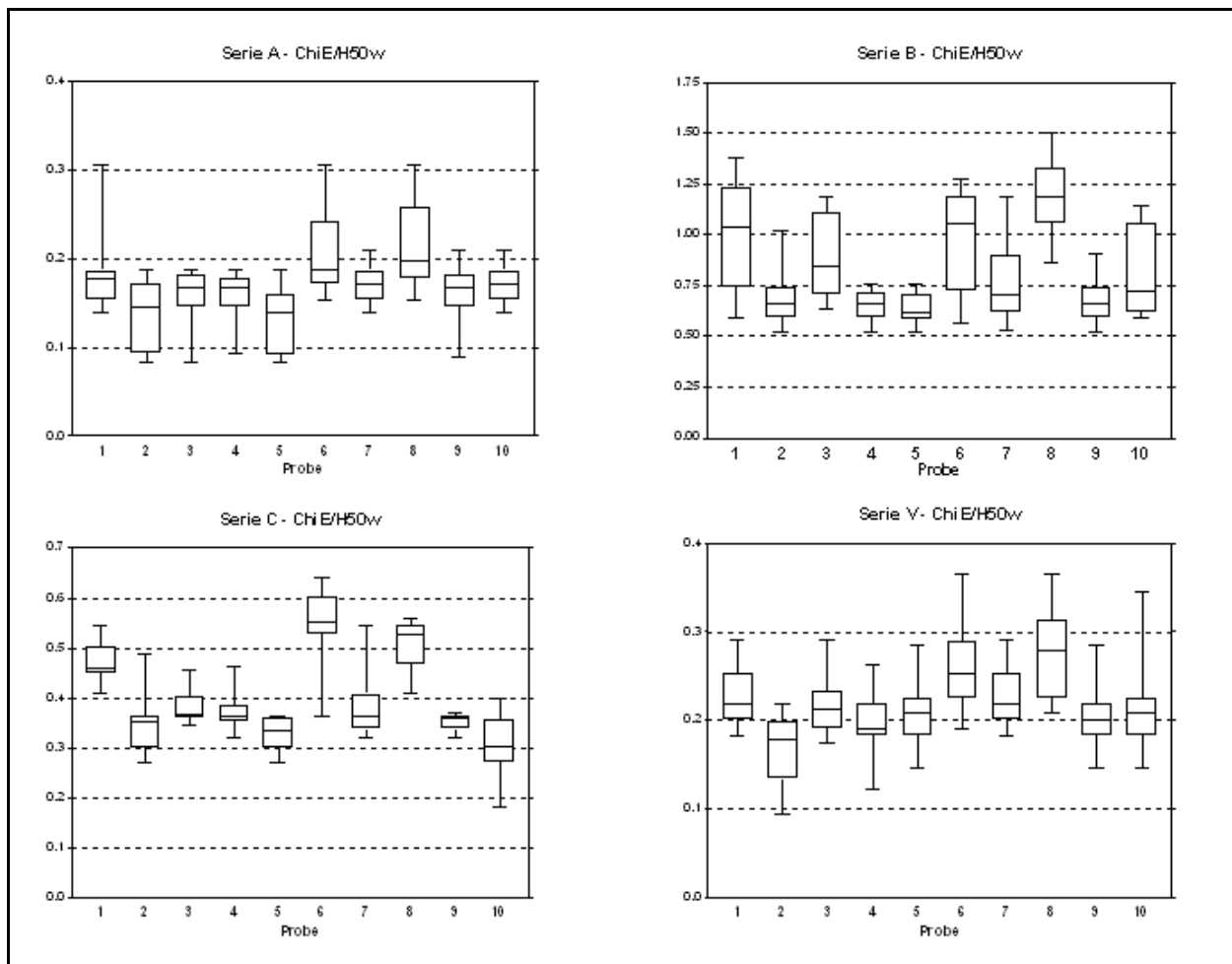
Meßgröße ChiE/H50w

Abbildung 77: Vier Trocknungsverfahren im Vergleich an 10 Weizenproben bezogen auf den Meßparameters ChiE/H50w. Hier trennt das Verfahren C am besten.

Die relative Lage der Probenergebnisse zueinander ist bei den 4 Verfahren sehr ähnlich, wenn auch nicht immer gleich stark ausgeprägt. Die statistische Auswertung erfolgte für jede Meßgröße mittels einfaktorieller Varianzanalyse, an die Tukeys Mehrfachvergleich angeschlossen wurde. Auf die Wiedergabe der umfangreichen Ergebnisse wird verzichtet. Bis auf wenige Ausnahmen trennten die 4 Verfahren die Proben in gleicher Weise. Der Unterschied besteht hauptsächlich darin, daß die Verfahren A und C auf Grund der höheren Zahl von Meßwiederholungen noch in Fällen trennten, in denen die anderen nicht oder nicht alle trennen. Lediglich beim Meßparameter ChiE/H50w war die Trennung bei Verfahren C besser.

Die Übereinstimmung der 10 Proben bei der Unterschiedlichkeit der Verfahren kann als für praktische Zwecke sehr gut ausreichend bezeichnet werden. Das Verfahren wird daher als gegen

kleine Schwankungen im Trocknungsprozeß robust angesehen.

4.2.7.5 Präzision und Wiederholbarkeit des matrixabhängigen Meßvorgangs für die Probenart Möhren

4.2.7.5.1 Zu erwartende Einflußgrößen auf die Methodenpräzision bei Möhren

Bei Möhren sind Veränderungen mit der Zeit und Inhomogenitäten des Probenmaterials zu erwarten. Der Einfluß dieser Faktoren und eventuelle Maßnahmen werden nachfolgend diskutiert.

Veränderungen der Probenmatrix Möhre treten bei längeren Meßzeiträumen (mehrere Tage) auf. Vermutlich handelt es sich um lokale Wasserabgabe aus der Oberfläche. Die Meßzeit von Möhren wird auf einen praktisch erprobten kurzen Zeitraum beschränkt. Innerhalb dieses Zeitraumes sind 2 Messungen je Möhre möglich.

Die Bestimmung der Wiederholpräzision beruht grundsätzlich auf der Voraussetzung von zeitlicher Konstanz und der Homogenität der Probe. Beides ist bei Möhren nicht erfüllt. Eine brauchbare Bestimmung von Variationskoeffizienten des Verfahrens ist dennoch möglich, wenn die Nicht-Homogenität der Probe in die Untersuchung einbezogen wird. Dazu wird eine entsprechend große Probe in mehrere Teilproben zerlegt und die Wiederholbarkeit zwischen diesen Teilproben bestimmt. Entsprechend geht neben der Wiederholpräzision des Verfahrens die Homogenität der Probe in das Ergebnis ein. Tatsächlich wird die Nicht-Homogenität der Probe der begrenzende Faktor für die Wiederholpräzision sein.

Messungen von ca. 30 Möhren je Probe erfordern wegen der Einzelmessung jeder Möhre Meßdauern von mehreren Tagen. Veränderungen des Probengutes in dieser Zeit sind unvermeidlich. Würden die Proben nacheinander gemessen, käme es zu systematischen Fehlern. Systematische Fehler werden vermieden, indem während der Meßfolge von jeder Probe abwechselnd eine Möhre gemessen wird. Bei mehreren Proben wird zusätzlich die Probenfolge gewechselt, um eventuelle systematische Effekte durch gleiche Probenfolge zu vermeiden.

Neben diesen Maßnahmen zur gleichmäßigen Auswirkung von Veränderungen auf alle Proben werden zusätzlich Maßnahmen getroffen, die Veränderungen der Proben minimieren. Maßnahmen dazu sind feuchte Lagerung und Waschen der Möhren erst kurz vor der Messung.

Exemplarunterschiede sind bei Möhren relativ hoch (siehe Abschnitt 4.3.2). In speziellen Meßreihen (hier nicht dargestellt) wurde auch der Einfluß von Länge und Dicke der Möhren auf die

Ergebnisse untersucht. (Eine kurze Zusammenfassung enthält die Tabelle im Abschnitt 4.6.6.2). Da Länge und Dicke eine Probeneigenschaft sein können, ist es nicht sinnvoll hier zu standardisieren, da damit ggf. der Unterschied zwischen Proben eliminiert würde. Als Forderung ist abzuleiten, daß eine Probe möglichst viele Möhren umfassen sollte.

4.2.7.5.2 Meßpräzision bei einer Möhre (gleicher Oberflächenabschnitt)

Bei einer Möhre wurde als 10-fach Wiederholung der gleiche Sektor (der gleiche Oberflächenbereich) gemessen. Mit zwei Photomultipliern wurden gleichzeitig zwei Sektoren erfaßt. (Integrationsparameter BelW=1)

	Mw1w	R40w	R40g/b	ChiE/H50w
V _K Sektor 1	2,5 %	2,1 %	0,6 %	9,0 %
V _K Sektor 2	1,3 %	1,3 %	0,8 %	6,0 %

Tabelle 22: Messpräzision bei einer Möhre (gleicher Oberflächenabschnitt)

Das Ergebnis zeigt, daß der gleiche Oberflächenabschnitt einer Möhre kurzfristig relativ gut wiederholbar gemessen werden kann.

4.2.7.5.3 Meßpräzision bei einer Möhre (mehrere Oberflächenabschnitte)

Bei einer Möhre wurden nacheinander 8 Oberflächenabschnitte (Sektoren) mit dem gleichen Photomultiplier gemessen. Zunächst wurden die Sektoren 1, 3, 2 u. 4 gemessen, anschließend die Übergangsbereiche der Sektoren 2/3, 1/4, 3/4 und 1/2. Das Ergebnis dieser 8-fach Bestimmung lieferte folgende Variationskoeffizienten.

	Mw1w	R40w	R40g/b	ChiE/H50w
V _K PM 2	32,0 %	30,4 %	6,7 %	16,1 %
V _K PM 1	28,8 %	26,0 %	10,6 %	17,2 %

Tabelle 23: Messpräzision bei einer Möhre (mehrere Oberflächenabschnitte)

Die Wiederholung dieser 8-fach Messung mit leichtem Versatz der Sektoren ergab folgende Variationskoeffizienten.

	Mw1w	R40w	R40g/b	ChiE/H50w
V _K PM 2	33,3 %	28,9 %	5,4 %	26,5 %
V _K PM 1	32,8 %	29,6 %	9,0 %	20,5 %

Tabelle 24: Messpräzision bei einer Möhre (mehrere Oberflächenabschnitte, Möhre gedreht)

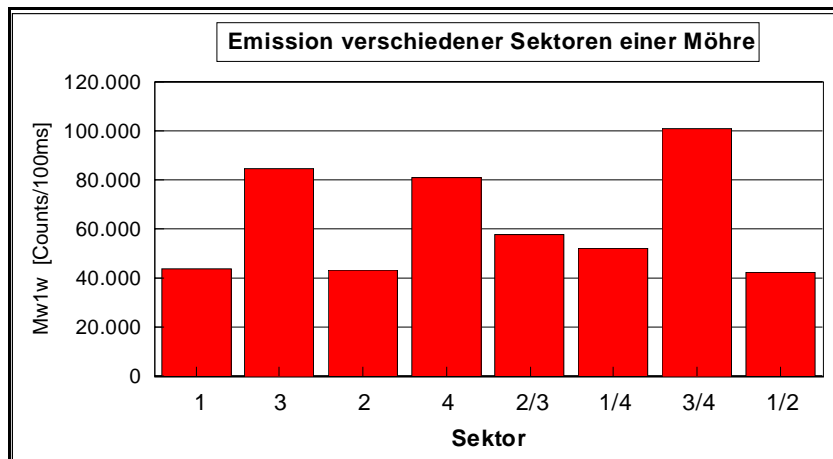


Abbildung 78: Lumineszenz Mw1w einer Möhre in Abhängigkeit von gemessenen Oberflächenabschnitt (Sektor).

Der Übergang zwischen den Sektoren 3 u. 4 ist der Bereich stärkster Emission bei dieser Möhre, der Übergang zwischen 1 u. 2 der Bereich geringster Emission.

Der große V_K bei diesen Messungen deutet auf Ungleichmäßigkeiten der Möhrensektoren bezüglich der Absolutwerte Mw1 und R40. Dies bestätigen die Einzeldaten der Möhrensektoren, die in der obigen Grafik dargestellt sind. Eine der Möhren wies einander gegenüberliegende Bereiche (1 u. 3 bzw. 2 u. 4) hoher und niedriger Emission auf. Dies gilt bei vielen Möhren. Die Meßpräzision ist entsprechend durch die Inhomogenität der Probe bestimmt.

Wie die obige Tabelle ausweist, ist der Variationskoeffizient der Werte R40g/b (Relativwerte) deutlich geringer. Das weist darauf hin, daß die höhere oder niedrigere Emission eines Möhrensektors weitgehend unabhängig von der Anregungsfarbe auftritt.

Die Inhomogenität der Möhrenoberfläche legt zunächst nahe, einen Mittelwert aus mehreren Abschnitten der Oberfläche zu bilden. Das führt jedoch nur begrenzt weiter, da auch zwischen den verschiedenen Möhrenexemplaren starke Unterschiede bestehen.

4.2.7.5.4 Wiederholpräzision Möhren

Aus einer Möhrenprobe wurden 6 Teilproben zu 4 x 18, 1 x 19 und 1 x 20 Möhren gebildet. Die Teilproben wurden durch 2 verschiedene Mitarbeiter gemessen. Diese 6-fach Bestimmung lieferte folgende Ergebnisse.

	1	2	3	4	5	6	Mittelw	StdAbw	V _k
Mw1	13.220	13.338	12.894	13.478	12.775	13.117	13.137	266,11	2,03%
R40w	227,2	192,3	172,4	192,7	208,2	207,4	200,0	18,63	9,32%
R40g/b	97,18	88,39	87,88	88,13	89,05	88,30	89,82	3,63	4,04%
ChiE/H50w	13,28	10,10	8,04	7,38	10,49	10,86	10,03	2,12	21,14%

Tabelle 25: Wiederholpräzision bei Möhren.

Für diese Bestimmung wurde eine Probe in 6 Teilproben zerlegt. Die Wiederholpräzision enthält die Probeninhomogenität

In den Variationskoeffizienten gingen Probeninhomogenität, Probenveränderung während der Zweifachbestimmung je Möhre, unterschiedliche Handhabung bei verschiedenen Mitarbeitern und Variationen des Meßgerätes ein.

Die folgenden Grafiken zeigen in den Boxen das 50 % Percentil mit dem Median. Die Toleranzlinien kennzeichnen den Minimal- bzw. Maximalwert. Die große Streubreite der Daten macht erneut die Unterschiedlichkeit der einzelnen Möhren deutlich, die bereits im Histogramm in Abschnitt 4.3.2 zu erkennen war. Für die Untersuchung von Möhren sollten deshalb grundsätzlich mehr als 18 Möhren zur Verfügung stehen.

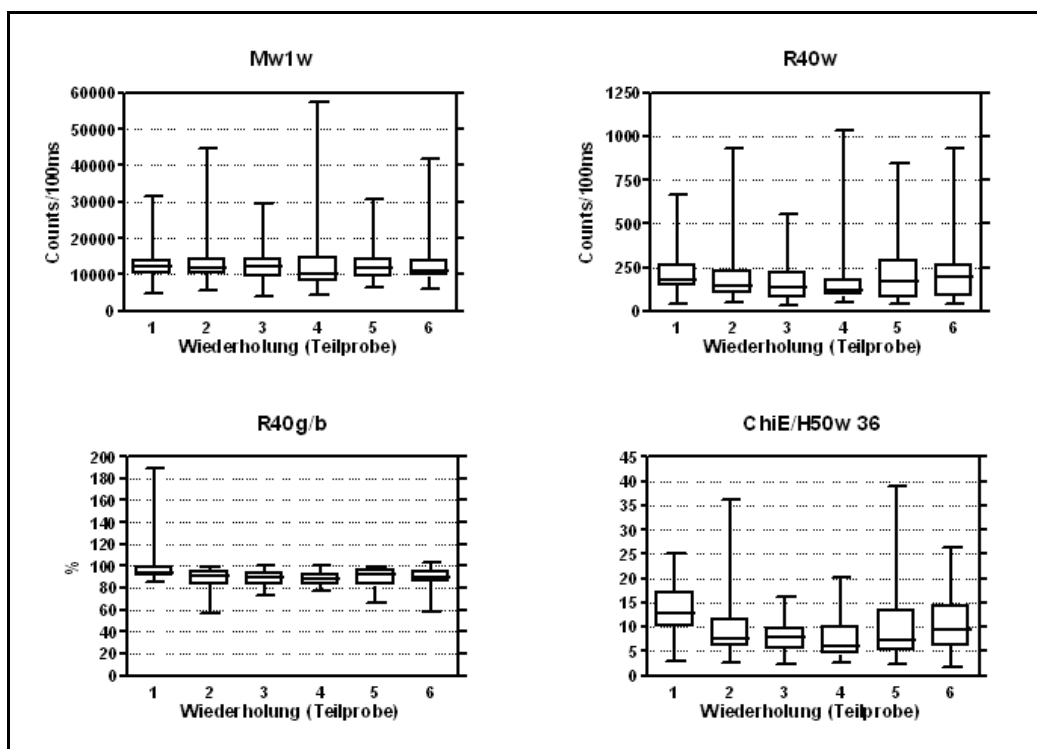


Abbildung 79: Ergebnis der Untersuchung zur Wiederholbarkeit bei Möhren für die Meßgrößen Mw1w, R40w, R40g/b u. ChiE/H50w. Eine Möhrenprobe war in 6 Teilproben zerlegt worden (4 x n=18, 1 x n=19, 1 x n=20).

4.2.7.6 Zusammenfassende Übersicht Kenn- und Einflußgrößenbestimmung

4.2.7.6.1 Gerätetechnische Einfluß- und Kenngrößen

Größe	Fragestellung	Ergebnis	Bewertung
Meßpräzision	Welche Einflußgrößen auf die Meßpräzision lassen sich erkennen?	PM-Eigenrauschen Lichtquelle Verschlußzeiten	Eigenrauschen und Lichtquelle sind zu kontrollieren und zu bewerten. Verschlußzeiten haben keinen Einfluß
Lampenbetriebszeit	Geht Lampenbetriebszeit in die Meßergebnisse ein?	Ja	Lampenhelligkeit wird geregelt und der Einfluß ausgeglichen
Lampenexemplar	Hängt die Helligkeit vom Lampenexemplar ab?	Ja,	Exemplarstreuungen der Lampe werden durch Helligkeitsregelung ausgeglichen.
Eigenrauschen des PM	Ist das Eigenrauschen des PM ausreichend konstant?	Ja	keine Maßnahme erforderlich
Verschlußzeit	Wirken sich Variationen der Verschlußzeit erkennbar aus?	Verschlußzeit-Variationen könnten in Mw1-Werte eingehen	$Mw1 - V_K < 1\%$ und damit nicht größer als nicht durch Verschlußzeit beeinflusste VKs. Verschlußzeit ist ausreichend konstant.
Meßpräzision Mw1w	Wie groß ist der Variationskoeffizient bei Mw1w?	Abhängig vom Meßwert	$VK < 1\%$ bei Meßwerten wie sie von Weizen u. Möhren zu erwarten sind.
Meßpräzision R40w	Wie groß ist der Variationskoeffizient bei R40w?	Abhängig vom Meßwert	$VK < 1\%$ bei Meßwerten wie sie von Möhren zu erwarten sind. $VK < 3\%$ bei Meßwerten wie sie von Weizen zu erwarten sind.
Meßpräzision R40relativ	Wie groß ist der Variationskoeffizient bei R40relativ?	Abhängig vom Meßwert	$VK < 1,5\%$ bei Meßwerten wie sie von Möhren zu erwarten sind. $VK < 4,5\%$ bei Meßwerten wie sie von Weizen zu erwarten sind.
Meßpräzision ChiE/H50w	Wie groß ist der Variationskoeffizient bei ChiE/H50w?	Abhängig vom Meßwert	$VK < 20\%$ bei Meßwerten wie sie von Weizen und Möhren zu erwarten sind.

4.2.7.6.2 Probenbedingte Einflußgrößen

Größe	Fragestellung	Ergebnis	Bewertung
Verfahrens- präzision Weizen	Welche Einflußgrößen auf die Verfahrenspräzision bei Weizen lassen sich erkennen?	Trocknungsgrad des Weizens Meßdauer Meßtag	Einflüsse wurden untersucht u. durch geeignete Methode ausgeglichen.
Trocknungsgrad des Weizens	Wie läßt sich ein ausreichender Trocknungsgrad erkennen?	An der Meßgröße Mw1	Mw1 wird in Voruntersuchungen erfaßt und als Freigabegröße für Hauptmessung eingesetzt.
Abhängigkeit vom Meßtag	Läßt sich die Abhängigkeit vom Meßtag bei Probenvergleichen kompensieren?	Ja, der Mittelwert aller Proben liefert Tagesfaktor	Ergibt deutliche Verringerung des Verfahrens-VK.
Meßdauer	Wirkt sich die Feuchtigkeitsaufnahme der Probe während der Meßdauer auf das Ergebnis aus?	Ja, meßbarer Trend der Meßgrößen	Bei Gleichbehandlung aller Proben keine Maßnahme erforderlich Bei Bedarf ist Kompensation des Trends möglich.
Probengröße	Welche Probengröße ist erforderlich für eine repräsentative Teilprobe (Meßprobe)?	56 g um einen Unterschied von 5% des Meßwerts mit 95% Wahrscheinlichkeit zu erfassen.	Um bei kleineren Unterschieden dennoch zu trennen, muß die Probenmenge und die Wiederholungsanzahl erhöht werden.
Verfahrens- präzision Möhren	Welche Einflußgrößen auf die Verfahrenspräzision Möhren lassen sich erkennen?	Lagerdauer vor der Messung Länge Dicke	Einflüsse sind getrennt zu diskutieren.
Lagerdauer vor der Messung	Auf welche Meßgrößen wirkt sich die Lagerdauer vor der Messung aus?	R40w	Einfluß läßt sich durch wechselweise Messung minimieren.

4.2.7.6.3 Verfahrens - Kenngrößen

	Fragestellung	Ergebnis	Bewertung
Weizen			
Verfahrens- präzision Mw1w	Wie groß ist der Variationskoeffizient bei Mw1w?	mittlerer VK = 2,49 %	o.k.
Verfahrens- präzision R40w	Wie groß ist der Variationskoeffizient bei R40w?	mittlerer VK = 5,25 %	o.k.
Verfahrens- präzision R40relativ	Wie groß ist der Variationskoeffizient bei R40relativ?	mittlerer VK = 4,56 %	o.k.
Verfahrens- präzision ChiE/H50w	Wie groß ist der Variationskoeffizient bei ChiE/H50w?	mittlerer VK = 19,73 %	erscheint hoch, hat sich dennoch als ausreichend erwiesen
Möhren		W e r t e i n c l . Inhomogenität der Probe	
Meßpräzision Mw1w	Wie groß ist der Variationskoeffizient bei Mw1w?	VK = 2,03 %	o.k.
Meßpräzision R40w	Wie groß ist der Variationskoeffizient bei R40w?	VK = 9,32 %	akzeptabel, da incl. Inhomogenität der Probe
Meßpräzision R40relativ	Wie groß ist der Variationskoeffizient bei R40relativ?	VK = 4,04 %	o.k.
Meßpräzision ChiE/H50w	Wie groß ist der Variationskoeffizient bei ChiE/H50w?	VK = 21,14 %	akzeptabel, da incl. Inhomogenität der Probe

4.2.8 Ergebnisse der Vergleichsversuche

4.2.8.1 Weizen aus dem DOK-Versuch des FIBL

4.2.8.1.1 Probenmaterial

Für die Untersuchungen standen folgende codierte Proben zur Verfügung:

Proben-Variante	Proben Kürzel	Weizen-Ernte 2002		Weizen-Ernte 2003
		Unters. Okt 02 Code	Unters. Feb. 03 Code	Unters. Okt. 03 Code
Ungedüngt	N	I	A	E
Mineralisch gedüngt 1,0 Norm	M	IV	B	D
Biologisch-dynamisch mit 1,4 DGVE/ha	D2	V	C	C
Organisch-biologisch mit 1,4 DGVE/ha	O2	II	D	B
Konventionell Integrierte Produktion 1,0 Norm Mistdüngung	K2	III	E	A

Tabelle 26: Übersicht über Untersuchungszeitpunkte und Kennzeichnung der Weizenproben aus dem DOK-Versuch des FIBL

Je Probenvariante standen 4 Feldwiederholungen zur Verfügung. Sie wurden getrennt untersucht und für die Auswertung zusammengefaßt.

Der DOK-Versuch des FIBL ist anderorts dokumentiert (MÄDER et al. 2002). Einzelheiten des Probenmaterials enthält das Kapitel 3.

4.2.8.1.2 Auswerteverfahren

Aus den Spektren wurden die 4 Größen Mw1w, R40w, R40gelb/blau und ChiE/H50w extrahiert bzw. berechnet.

Bei Weizen werden die Meßergebnisse einer Probe danach beurteilt, ob sie mehr oder weniger deutlich diejenige Tendenz zeigen, die für Samen typisch ist. Für Samen ist typisch:

Parameter	Größe
Mw1 _w	hoch
R40 _w	niedrig
R40 _{gelb/blau}	niedrig
ChiE/H50 _w	niedrig

Zur Zusammenfassung der 4 Meßgrößen zu einer gemeinsamen Indexgröße ("Index der samentypischen Ausprägung“) wurden die jeweils höchsten und niedrigsten Werte einer Größe bei Mw1w gleich 100 bzw. 0 gesetzt und umgekehrt bei R40w, R40g/b und ChiE/H50w gleich 0 bzw. 100. So bekommen alle 5 Proben bei jeder Meßgröße Relativwerte zwischen 0 und 100 proportional zu ihrem Meßwert. Die Relativwerte jeder Probe werden addiert und durch 4 dividiert. Dieser Relativ-Index mit gleicher Gewichtung der 4 Meßgrößen könnte als Index der samentypischen Ausprägung bezeichnet werden.

4.2.8.1.3 Ergebnisse der 1. Probenserie Code I-V (Okt 2002)

Um die Proben trotz geringer Unterschiede sicher differenzieren zu können, wurde die Zahl der Meßwiederholungen erhöht.

Serie	Meßwiederhlg.
I	n=38
II	n=40
III	n=40
IV	n=39
V	n=40

Tabelle 27: Anzahl der Messwiederholungen der Weizenprobe bei der ersten Probenserie

Graphische Darstellung: Box = 50% aller Meßwerte; Strich in der Box = Medianwert; Toleranzbalken = größter und kleinster Meßwert.

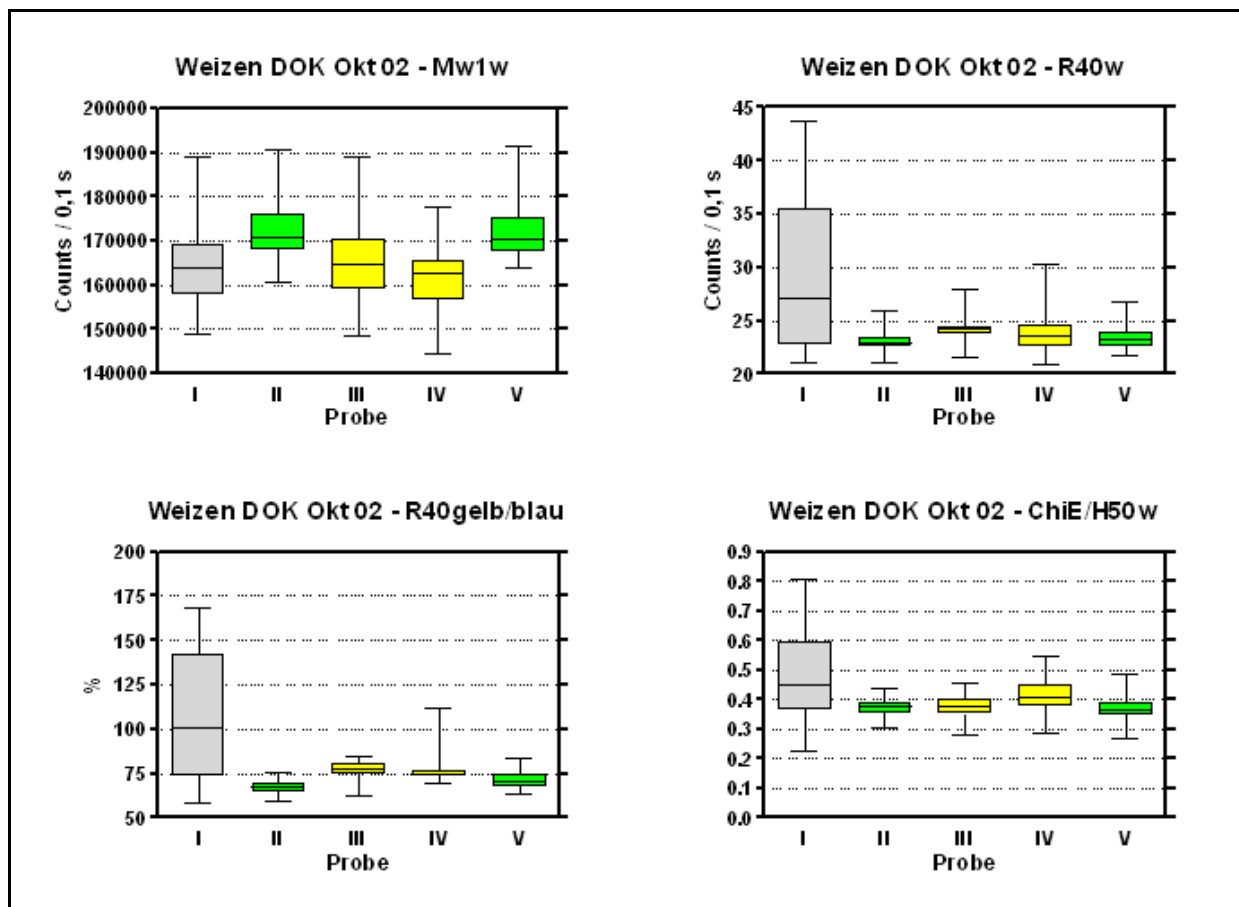


Abbildung 80: Die Weizenproben II u. V zeigen höhere Meßwerte bei Mw1w und niedrigere bei R40w, R40g/b u. ChiE/H50w. Diese Datenverteilung weist auf samenotypischere Ausprägung und damit auf Proben aus Bio-Anbau hin. Zur Signifikanz der Unterschiede siehe Tabelle und Text.

Die Daten lassen sich gruppieren in die Proben II u. V mit hohen Mw1w-Mittelwerten (die beiden organischen Proben) und die Proben I, III u. IV mit niedrigeren Mw1w-Mittelwerten (die ungedüngte Kontrolle und die mineralischen Proben). Die gleiche Gruppierung ergibt sich auch bei R40w, R40gelb/blau und ChiE/H50w, wobei dabei für II u. V jeweils die niedrigsten Werte gelten. Damit entsprechen II u. V den Kriterien für samenotypische Ausprägung gemäß obigem Schema und waren als aus biologischem Anbau zu vermuten.

Auffällig war die große Streuung der Probe I. Die nach Feldwiederholungen getrennte Darstellung zeigt, daß die große Streuung der Probe I auf 2 stark abweichenden Ergebnissen bei den

Feldwiederholungen (I-2 u. I-3) beruht.

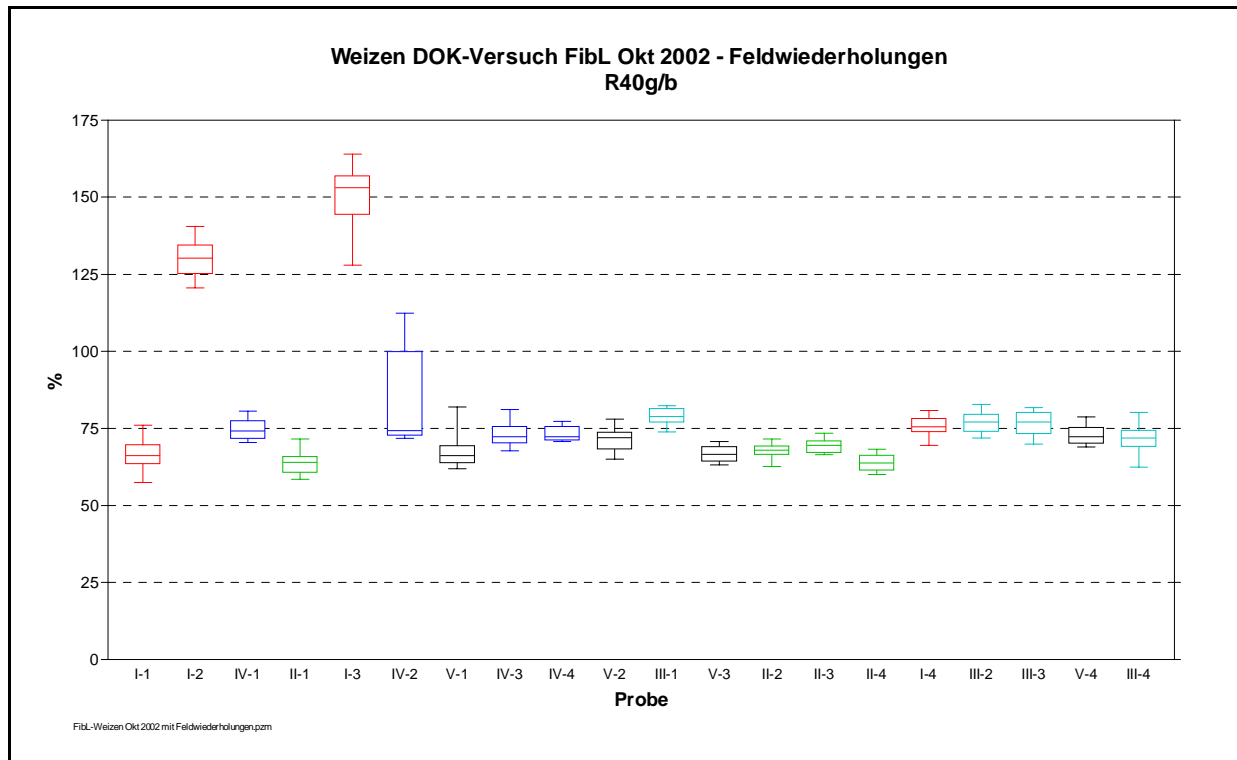


Abbildung 81: Nach den Feldwiederholungen 1-4 aufgeschlüsselte Ergebnisse der Weizenproben I-V. Die Feldwiederholungen I-2 und I-3 zeigen stark erhöhte Messwerte.

Varianzanalyse Mw1w (p-Werte): Barletts Test auf gleiche Varianzen zeigt ungleiche Varianz im Bereich der Signifikanzgrenze ($p=0,04$). Die Probe I wurde dennoch einbezogen, auch wenn sich dadurch die Trenngüte bei den übrigen Proben etwas verringert. Tukeys multipler Vergleich ergibt:

	I	II	III	IV
II	$p < 0,001$			
III	$p > 0,05$	$p < 0,001$		
IV	$p > 0,05$	$p < 0,001$	$p > 0,05$	
V	$p < 0,001$	$p > 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,001$

Varianzanalyse R40w, p-Werte. Barletts Test auf gleiche Varianzen zeigt bei Berücksichtigung von Probe I ungleiche Varianz mit $p < 0,0001$. Deshalb wurde Probe I herausgenommen. Tukeys multipler Vergleich ergibt:

	I	II	III	IV
II				
III		p<0,001		
IV		p<0,001	p>0,05	
V		p>0,05	p<0,001	p<0,001

Varianzanalyse R40g/b (p-Werte). Barletts Test auf gleiche Varianzen zeigt bei Berücksichtigung von Probe I ungleiche Varianz mit $p<0,0001$. Entsprechend wird bei Berücksichtigung der Probe I nur die Probe I von den Proben II-V unterschieden. Wird die Probe I aus der Varianzanalyse ausgeschlossen ergibt sich mittels Tukeys multiplen Vergleich:

	I	II	III	IV
II				
III		p<0,001		
IV		p<0,001	p>0,05	
V		p<0,05	p<0,001	p<0,001

Die Varianzen der verbleibenden Proben II bis V sind jedoch noch immer so unterschiedlich, daß Bartletts Test die Signifikanz mit $p<0,001$ angibt. Werden Probe I u. IV ausgeschlossen, so unterscheiden sich die Varianzen der Proben II, III u. V nicht mehr und es ergibt sich:

	I	II	III	IV
II				
III		p<0,001		
IV				
V		p>0,05	p<0,001	

Das bedeutet, daß die Proben II u. V nicht mehr unterschieden werden, die Unterscheidung der Probe III jedoch unverändert bestehen bleibt. In der vorhergehenden Analyse über die Daten der Proben II bis V ist also die Unterscheidung zwischen II u. V mit $p<0,05$ unzuverlässig.

Varianzanalyse ChiE/H50w (p-Werte). Barletts Test auf gleiche Varianzen zeigt bei Berücksichtigung von Probe I ungleiche Varianz mit $p < 0,0001$. Entsprechend wird bei Berücksichtigung der Probe I nur die Probe I von den Proben II-V unterschieden. Wird die Probe I aus der Varianzanalyse ausgeschlossen ergibt sich:

	I	II	III	IV
II				
III		$p > 0,05$		
IV		$p < 0,01$	$p < 0,01$	
V		$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,001$

Werden sämtliche Unterschiede mit $p < 0,05$ zusammengefaßt, so ergibt sich folgende Übersicht:

Param. \ Probe	I	II	III	IV	V
Mw1w	a	b	a,c	a,c	b
R40w	-	b	c	c	b
R40gelb/blau	-	b	c	c	b
ChiE/H50w	-	b	b	c	b

Bei der Berechnung des „Index für samentypische Ausprägung“ ergibt sich folgende Wertung der 5 Proben, wobei Ausreißer in der Probe I die Darstellung verzerren und die Unterschiede zwischen den biologischen und konventionellen Proben verringern.

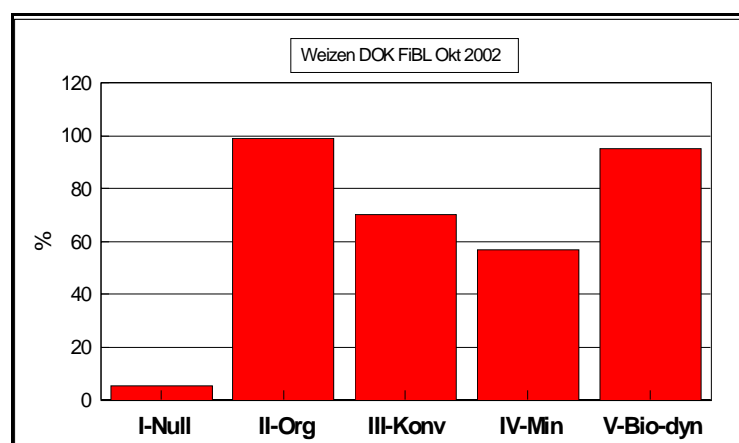


Abbildung 82: Versuchsweise gebildeter „Index der samentypischen Ausprägung“.

Er zeigt für die biologischen Weizenproben II u. V höhere Werte. Die Nullvariante erscheint auf Grund der beiden Feldwiederholungen mit Ausreißer-Charakter besonders samenuntypisch.

Werden die beiden grob vom Gesamtmittel aller Proben abweichenden Feldwiederholungen der Nullvariante (Probe I) nicht berücksichtigt, so ergibt sich folgendes Ergebnis:

Die Nullparzelle liegt nun in einer Gruppe mit den biologischen Proben. Die beiden mineralischen Proben sind davon deutlich unterschieden.

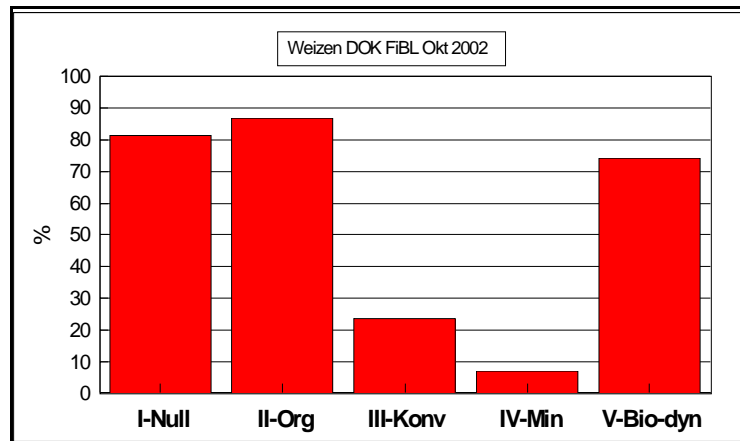


Abbildung 83: "Index der samentypischen Ausprägung" ohne die Ausreißer in der Nullvariante (I).

Die Nullvariante erscheint dann ebenso samentypisch wie die biologischen Proben (II u. V). Die konventionellen Proben (III u. IV) sind deutlich unterschieden

4.2.8.1.4 Ergebnisse Probenserie A-E (Feb. 2003)

Untersucht wurden:

Serie	Proben	Meßwiederhg.	Variante
A	A19, A37, A55, A 73	n=28	ungedüngte Nullkontrolle
B	B91, B109, B127, B145	n=28	mineralisch
C	C163, C181, C199, C217	n=28	biologisch-dynamisch
D	D235, D253, D271, D289	n=28	organisch-biologisch
E	E307, E325, E343, E360	n=28	mineralisch + Mist

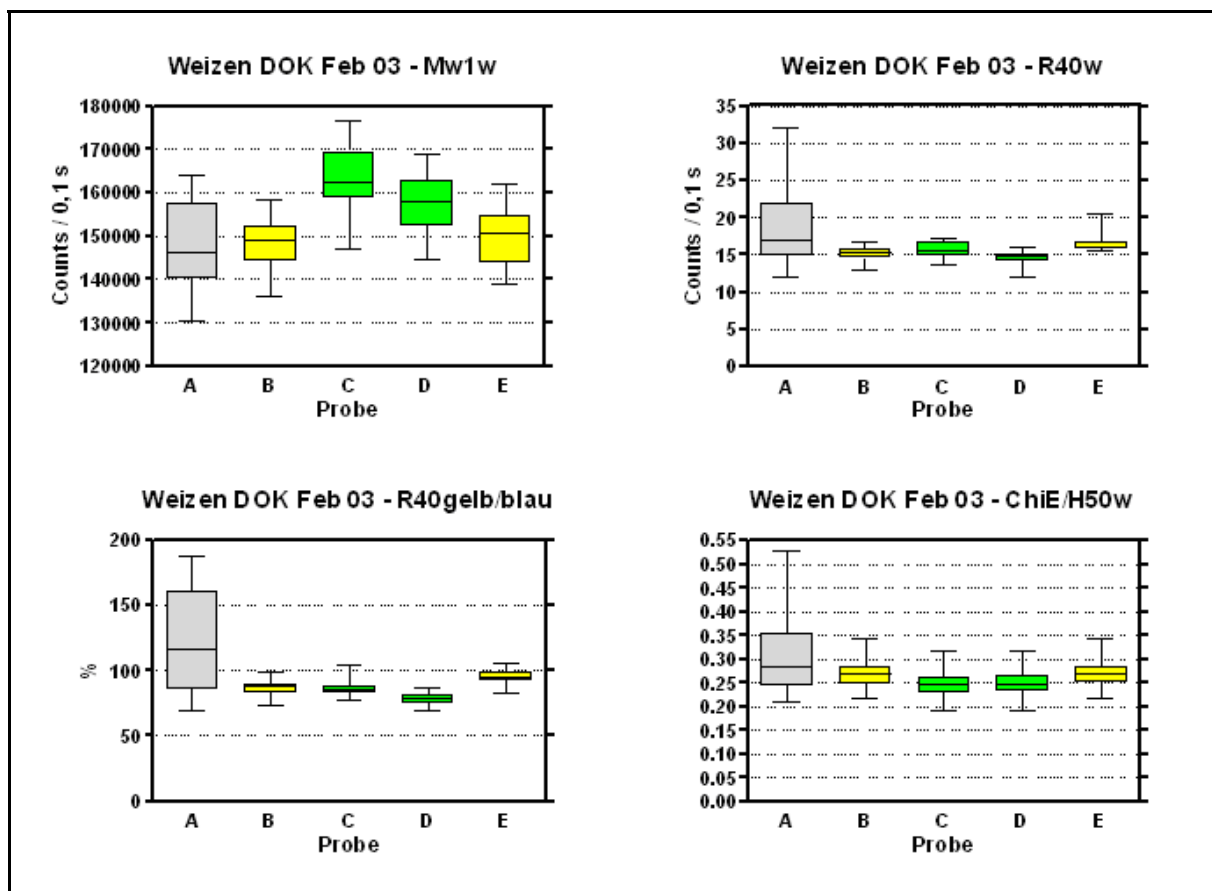


Abbildung 84: Ergebnisse von Weizen (DOK-FIBL, Februar 2003)

Die Weizenproben C u. D (biologische Varianten) zeigen höhere Meßwerte bei Mw1w und niedrigere bei R40g/b u. ChiE/H50w. Bei R40w liegt der Wert von C höher als von B. Hier zeigt sich, daß eine Meßgröße allein zur Beurteilung nicht ausreicht.

Die größere Varianz der Probe A fällt sofort auf. Es handelt sich wieder um die Nullvariante, die bereits beim Probenmaterial vom Oktober 2002 durch große Streuung auffiel.

Varianzanalyse Mw1w: Barletts Test auf gleiche Varianzen zeigt ungleiche Varianz mit $p=0,0266$. Die Probe A wurde dennoch einbezogen, auch wenn sich dadurch die Trenngüte bei den übrigen Proben etwas verringert. Tukeys multipler Vergleich ergibt:

	A	B	C	D
B	$p>0,05$			
C	$p<0,001$	$p<0,001$		
D	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,05$	
E	$p>0,05$	$p>0,05$	$p<0,001$	$p<0,01$

Varianzanalyse R40w: Barletts Test auf gleiche Varianzen zeigt bei Berücksichtigung von Probe A auffällig ungleiche Varianz mit $p<0,0001$. Deshalb wurde Probe A herausgenommen. Tukeys multipler Vergleich ergibt:

	A	B	C	D
B				
C		$p>0,05$		
D		$p>0,05$	$p<0,001$	
E		$p<0,001$	$p<0,05$	$p<0,001$

Varianzanalyse R40g/b: Barletts Test auf gleiche Varianzen zeigt bei Berücksichtigung von Probe A auffällig ungleiche Varianz mit $p<0,0001$. Entsprechend wird bei Berücksichtigung der Probe A nur die Probe A von den Proben B-E unterschieden. Wird die Probe A aus der Varianzanalyse ausgeschlossen ergibt sich:

	A	B	C	D
B				
C		$p>0,05$		
D		$p<0,001$	$p<0,001$	
E		$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$

Varianzanalyse ChiE/H50w: Barletts Test auf gleiche Varianzen zeigt bei Berücksichtigung von Probe A ungleiche Varianz mit $p<0,0001$. Entsprechend wird bei Berücksichtigung der Probe A nur die Probe A von den Proben B-E unterschieden. Wird die Probe A aus der Varianzanalyse

ausgeschlossen ergibt sich:

	A	B	C	D
B				
C		p<0,01		
D		p>0,05	p>0,05	
E		p>0,05	p<0,001	p<0,05

Werden sämtliche Unterschiede mit $p<0,05$ zusammengefaßt, so ergibt sich folgende Übersicht:

Param. \ Probe	A	B	C	D	E
Mw1w	a	a	b	c	a
R40w		b	b	b, c	d
R40gelb/blau		b	b	c	d
ChiE/H50w		b	c	b, c	b, d

Tabelle 28: Zusammenfassung signifikanter Trennung ($p<0,05$) bei den DOK-Weizenproben (Oktober 2002).

Gleiche Buchstaben markieren nicht unterschiedene Proben

Faßt man die Mittelwerte wieder zum „Relativ-Index der samentypischen Ausprägung“ zusammen, so ergibt sich folgende Unterscheidung:

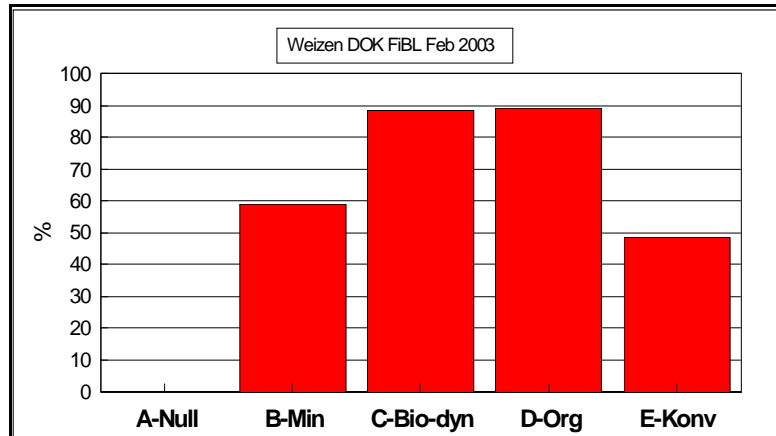


Abbildung 85: Versuchsweise gebildeter „Index der samentypischen Ausprägung“.

Er zeigt für die biologischen Weizenproben C u. D höhere Werte als für die konventionellen B u. C. Die Nullvariante A ist wegen des Wertes 0 nicht sichtbar. Wieder sind es die Ausreißer-Feldwiederholungen, die das Ergebnis der Nullvariante verzerren.

Die Proben C u. D sind die biologischen Proben, B und E die konventionellen, A die ungedüngte Kontrolle mit der großen Streuung.

Werden die beiden grob vom Gesamtmittel aller Proben abweichenden Feldwiederholungen der Nullvariante nicht berücksichtigt, so ergibt sich folgendes Ergebnis:

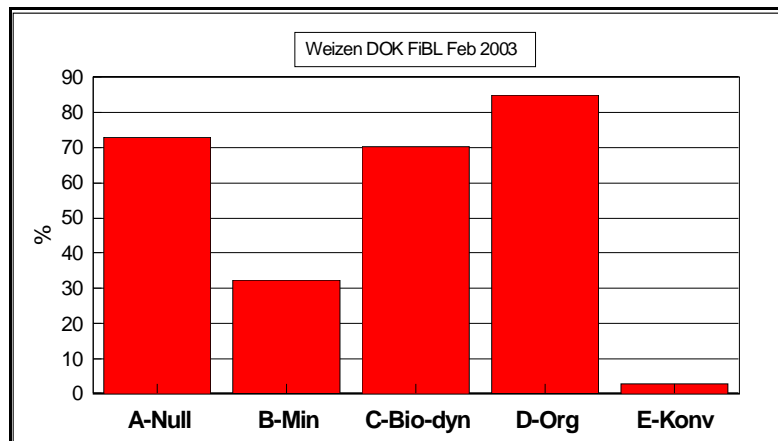


Abbildung 86: "Index der samentypischen Ausprägung" nach Entfernung der Ausreißer aus den Daten der ungedüngten Probe (A-Null). Die ungedüngte Probe erscheint dann vergleichbar samentypisch wie die biologischen Proben C und D. Deutlich von den biologischen Proben abgesetzte Werte zeigen die konventionellen Proben B-Min und E-Konv..

Die Nullparzelle A liegt nun in einer Gruppe mit den biologischen Proben C u. D. Die beiden mineralischen Proben B u. E sind davon deutlich unterschieden.

4.2.8.1.5 Ergebnisse Probenserie A-E (Sept. 2003)

Untersucht wurden:

Serie	Proben	Meßwiederhlg.	Variante
E	E1, E2, E3, E4	n=9	ungedüngte Nullkontrolle
D	D1, D2, D3, D4	n=9	mineralisch
C	C1, C2, C3, C4	n=9	biologisch-dynamisch
B	B1, B2, B3, B4	n=9	organisch-biologisch
A	A1, A2, A3, A4	n=9	mineralisch + Mist

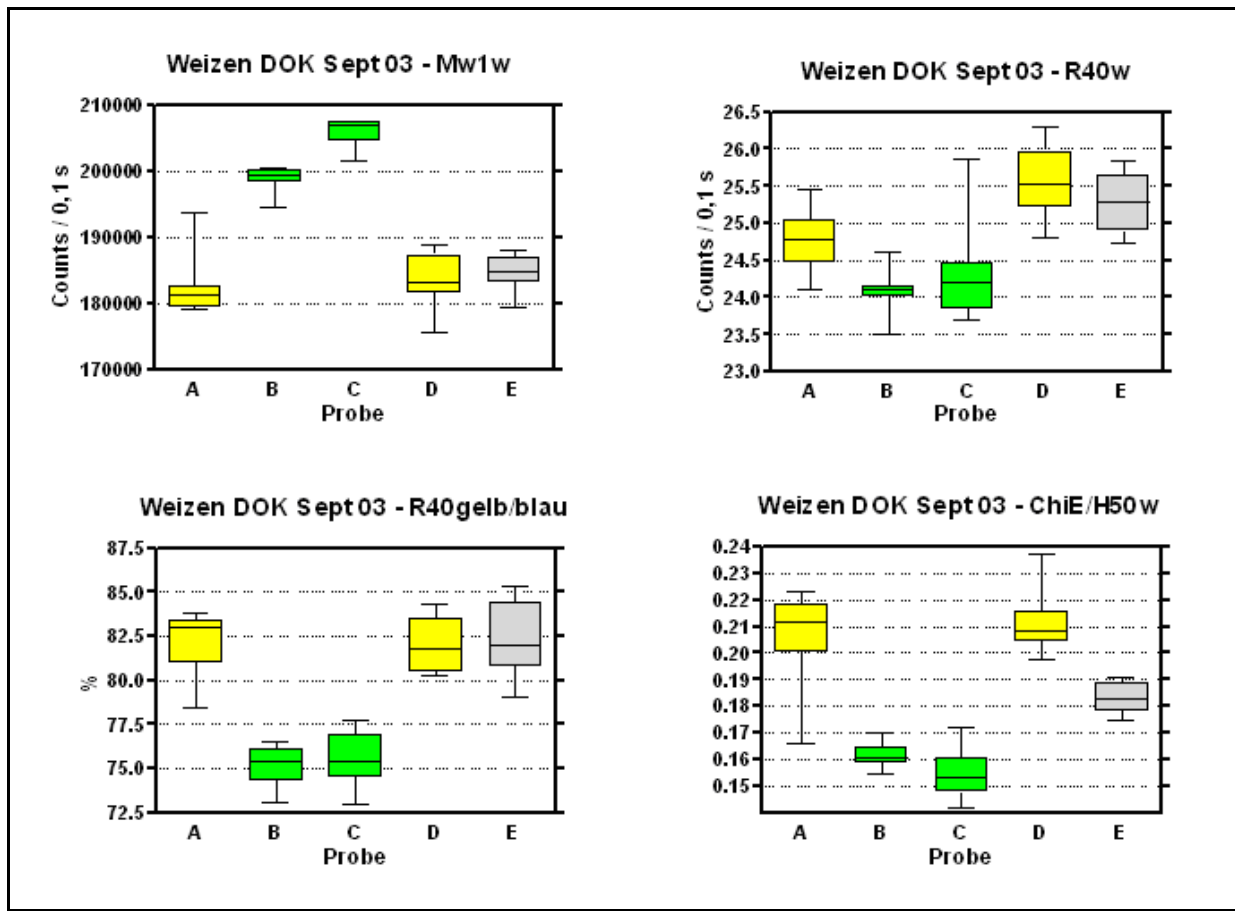


Abbildung 87: Ergebnisse von Weizen (DOK-FIBL, September 2003).

Die Weizenproben B u. C (biologische Varianten) zeigen höhere Meßwerte bei Mw1w sowie niedrigere bei R40w, R40g/b u. ChiE/H50w und damit die typische Datenverteilung für Weizen aus biologischem Anbau. Die Nullvariante E zeigte in diesem Anbaujahr (2003) keine so auffällig große Streuung wie im Anbaujahr 2002.

Varianzanalyse Mw1w: Barletts Test auf gleiche Varianzen zeigt keine signifikant ungleichen Varianzen. Tukeys multipler Vergleich ergibt:

	A	B	C	D
B	p<0,001			
C	p<0,001	p<0,001		
D	p>0,05	p<0,001	p<0,001	
E	p>0,05	p<0,001	p<0,001	p>0,05

Das bedeutet, daß die konventionellen Proben und die Nullvariante sich bezüglich Mw1w nicht unterscheiden. Davon hochsignifikant unterschieden sind jedoch die beiden biologischen Proben. Bezüglich Mw1w unterscheidet sich die biologisch-dynamische Probe von der organisch ebenfalls hochsignifikant.

Varianzanalyse R40w: Barletts Test auf gleiche Varianzen zeigt keine signifikant ungleichen Varianzen. Tukeys multipler Vergleich ergibt:

	A	B	C	D
B	p<0,05			
C	p>0,05	p>0,05		
D	p<0,01	p<0,001	p<0,001	
E	p>0,05	p<0,001	p<0,001	p>0,05

Das bedeutet, daß die konventionelle Probe D und die Nullvariante E sich bezüglich R40w nicht unterscheiden. Signifikant unterschieden von allen konventionellen Proben ist die biologische Probe B.

Varianzanalyse R40g/b: Barletts Test auf gleiche Varianzen zeigt keine signifikant ungleichen Varianzen. Tukeys multipler Vergleich ergibt:

	A	B	C	D
B	p<0,001			
C	p<0,001	p>0,05		
D	p>0,05	p<0,001	p<0,001	
E	p>0,05	p<0,001	p<0,001	p>0,05

Das bedeutet, daß die konventionellen Proben und die Nullvariante sich bezüglich R40g/b nicht unterscheiden. Davon hochsignifikant unterschieden sind jedoch die beiden biologischen Proben.

Varianzanalyse ChiE/H50w: Barletts Test auf gleiche Varianzen zeigt bei Berücksichtigung von Probe A ungleiche Varianz mit p<0,003. Wird Tukeys multipler Vergleich dennoch durchgeführt, so ergibt sich:

	A	B	C	D
B	p<0,001			
C	p<0,001	p>0,05		
D	p>0,05	p<0,001	p<0,001	
E	p<0,001	p<0,01	p<0,001	p<0,001

Der Ausschluß der Probe A (höchste Varianz) führt für die restlichen Proben bei Barletts Test auf gleiche Varianzen. In diesem Fall führt Tukeys multipler Vergleich zu einer gesteigerten

Trennsicherheit zwischen B und E ($p < 0,001$ statt 0,01), sonst ändert sich nichts.

Das bedeutet, daß die konventionellen Proben A u. D und die Nullvariante E sich bezüglich ChiE/H50w nicht unterscheiden. Davon hochsignifikant unterschieden sind jedoch die beiden biologischen Proben B u. C.

Werden sämtliche Unterschiede mit $p < 0,05$ zusammengefaßt, so ergibt sich folgende Übersicht:

Param. \ Probe	A	B	C	D	E
Mw1w	a	b	c	a	a
R40w	a, c	b	a, b	d	c, d
R40gelb/blau	a	b	b	a	a
ChiE/H50w	a	b	b	a	c

Tabelle 29: Zusammenfassung signifikanter Trennungen ($p < 0,05$) bei den DOK-Weizenproben (Sept. 2003). Gleiche Buchstaben markieren nicht unterschiedene Proben.

Faßt man die Mittelwerte wieder zum „Relativ-Index der samentypischen Ausprägung“ zusammen, so ergibt sich folgende Unterscheidung:

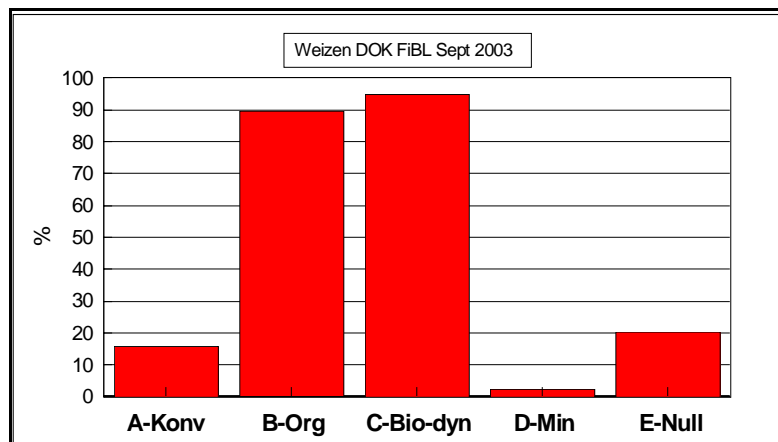


Abbildung 88: Versuchsweise gebildeter „Index der samentypischen Ausprägung“.

Er zeigt für die biologischen Weizenproben B u. C höhere Werte als für die konventionellen A u. D. Die Nullvariante E erscheint bei der konventionellen Gruppe.

Die Proben B u. C aus biologischem Anbau unterscheiden sich deutlich von den konventionellen Proben A u. D und der Nullvariante E.

4.2.8.2 Möhren aus Düngungsversuch Uni Kassel

Für die Untersuchungen standen folgende codierte Proben zur Verfügung:

Ernte und Untersuchungszeitpunkt		Proben-Variante	
		ungedüngt	gedüngt mit 150 kg N / ha
Ernte 2002	Unters. Okt 02	M33	M66
	Unters. Dez. 02	M22	M55
	Unters. Feb. 03	M11	M44
Ernte 2003	Unters. Sept. 03	M88	M77

Einzelheiten des Probenmaterials enthält Kapitel 3 dieses Berichts.

Wie an anderer Stelle dargestellt, genügen die Meßdaten von Möhrenproben üblicherweise nicht der Normalverteilung. Der statistische Paarvergleich von Proben erfolgte deshalb mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-Test.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben ergaben sich beim Meßparameter R40w. Die Meßwerte Mw1w, R40gelb/blau u. ChiE/H50w ließen die gleiche Tendenz der Proben erkennen wie die R40w-Werte, trennten jedoch nicht signifikant. Sie werden deshalb hier nicht dargestellt.

In den Grafiken stellen die Balken die Mittelwerte dar, die Toleranzfelder markieren das 95 % Konfidenzintervall des Mittelwerts (Grafik nächste Seite)

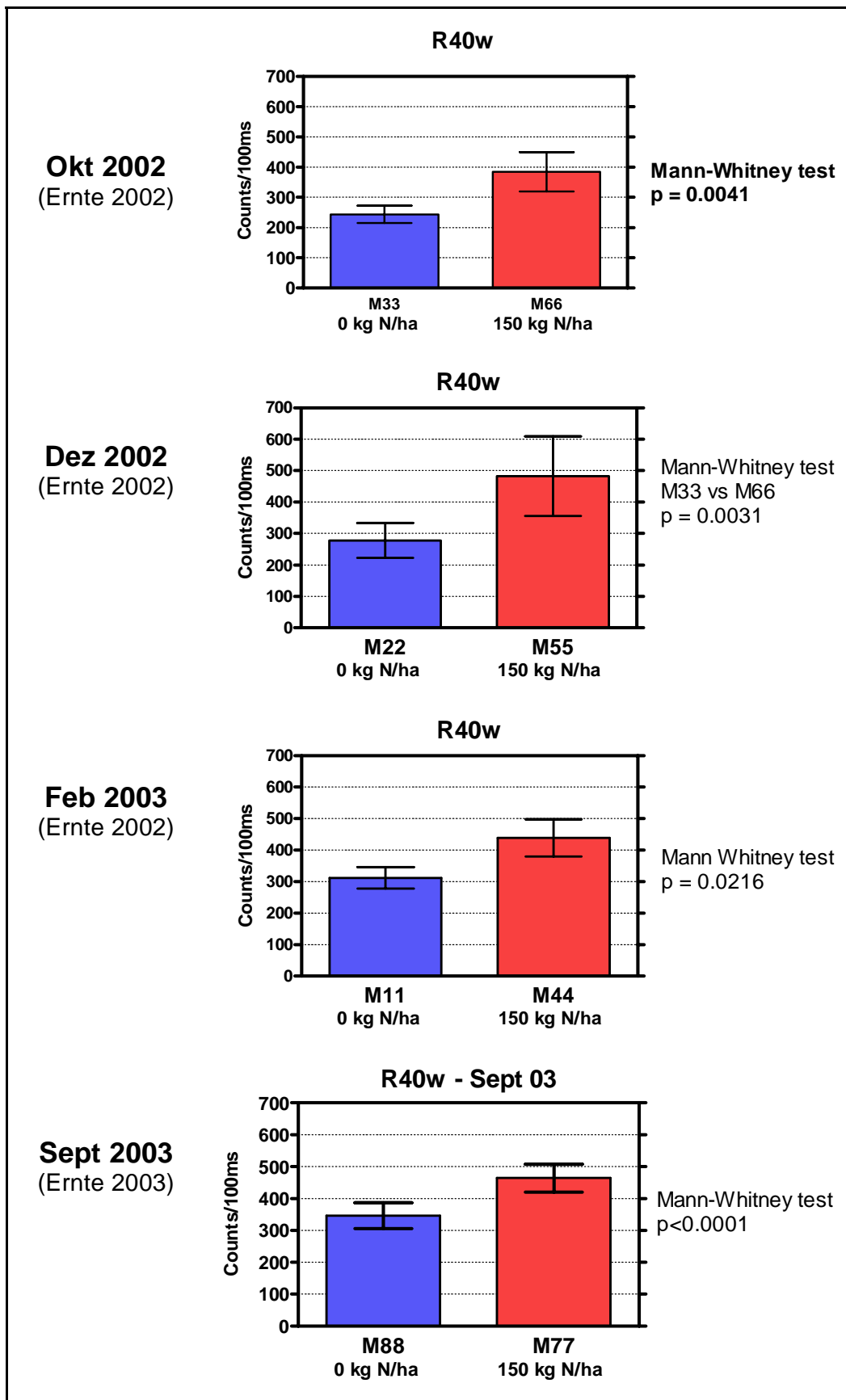


Abbildung 89: Ungedüngte und gedüngte Möhrenvarianten (Anbauversuch Uni Kassel) im Vergleich bezüglich Meßparameter R40w.

4.2.8.3 Möhre

Bei den Proben handelte sich um samenfeste und hybride Möhrenvarianten gemäß folgender Tabelle.

Ernte und Untersuchungszeitpunkt		Möhrenvariante			
		Bolero F1 Hybrid	Nipomo F1 Hybrid	Samson samenfest	Tiptop samenfest
Ernte 2002	Unters. Nov. 2002	E	F	G	-
	Unters. März 2003	K	I	H	L
Ernte 2003	Unters. Okt. 2003	B	C	D	A

Untersuchungen zur Unterscheidung von Hybrid-Möhren von samenfesten Sorten mittels FAS waren noch nicht durchgeführt worden. Die Untersuchung im November 2002 diente der Ermittlung möglicher unterscheidender Meßparameter. In Betracht kamen u. A. R40w, R40grün und Mw1w/R40w. Bei der Wiederholungs-Untersuchung (März 2003) bestätigte sich der Unterschied. Bei folgenden Ernte (Okt. 2003) wurden aufgrund der Untersuchungsdaten die Proben getrennt, richtig gruppiert und korrekt als samenfest bzw. hybrid bezeichnet.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse, wobei wegen der nichtnormalverteilten Daten der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test verwendet wurde, dem ggf. Dunns multipler Vergleich folgte.

In den Grafiken stellen die Balken die Mittelwerte dar, die Toleranzfelder markieren das 95 % Konfidenzintervall des Mittelwerts.

Meßparameter R40w: Es ist ein Trend zu höheren Werten bei den samenfesten Sorten erkennbar, wobei einige Unterschiede statistisch signifikant sind.

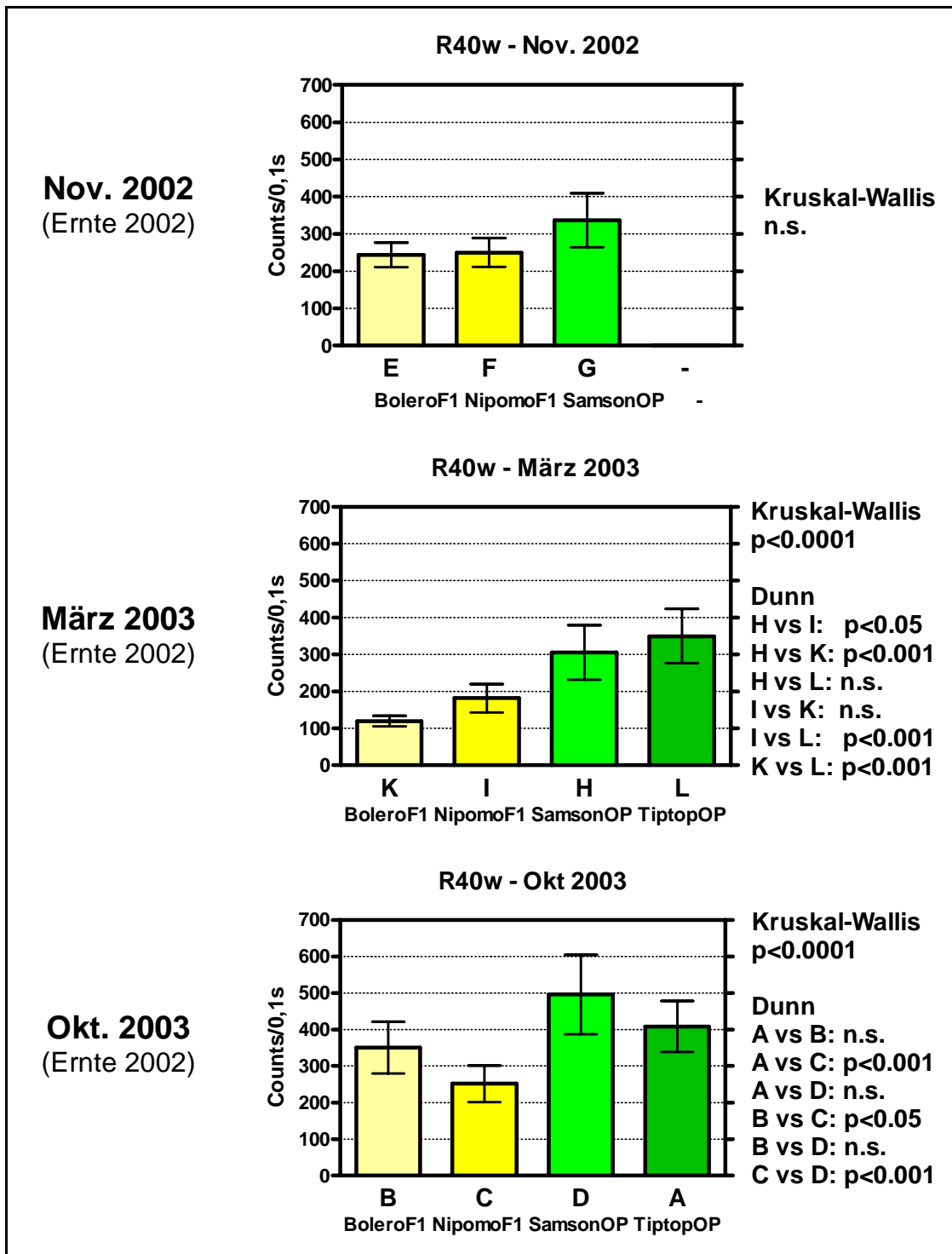


Abbildung 90: Hybride (F1) und samenfeste (OP) Möhrensorten (Anbauversuch FiBL Frick, Ch) im Vergleich bezüglich des Meßparameters R40w.

Meßparameter Mw1bl/R40bl: Es ist ein Trend zu höheren Werten bei den samenfesten Sorten erkennbar, wobei die Trennung zumeist signifikant ist.

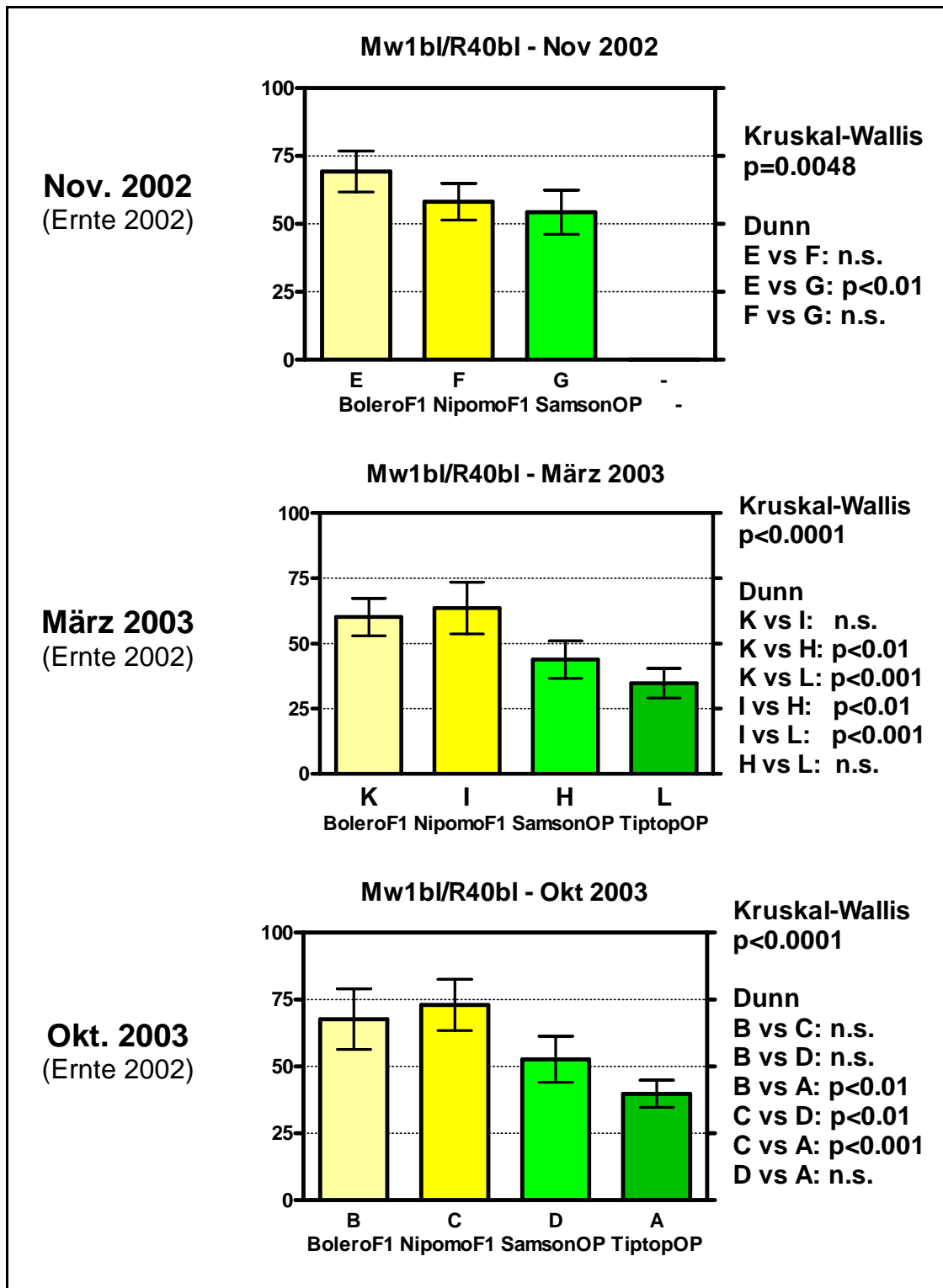


Abbildung 91: Hybride (F1) und samenfeste (OP) Möhrensorten (Anbauversuch FiBL Frick, Ch) im Vergleich bezüglich des Meßparameters Mw1bl/R40bl.

4.2.9 Zusammenfassende Abschätzung der Eignung der Methode für die vorliegende Fragestellung

Die Methode konnte sowohl in ihren Verfahrensschritten als auch im Hinblick auf die Gesamtfrage der Trennung von ökologischen und konventionellen Varianten bei Weizen anhand des vorliegenden Probenmaterials erfolgreich validiert werden. Die Validierungsschritte und Maßnahmen folgten den Vorgaben aus ISO 17025. Sowohl die Wiederholung am gleichen Probenmaterial als auch die Wiederholung mit Weizen eines neuen Erntejahres zeigte, daß die Methode präzise und robust arbeitet. Mit der Methode wurden die Proben des DOK-Versuchs des FIBL (MÄDER et al. 2002) sowohl richtig gruppiert als auch richtig identifiziert, d.h. es wurde am codierten Probenmaterial richtig erkannt, welches die konventionellen und welches die ökologischen Varianten waren. In Bezug auf das vorliegende Probenmaterial war die Methode voll und ganz geeignet.

Im vorliegenden Projekt handelte es sich um Probenmaterial einer Sorte von einem Standort. Beim Übergang auf verschiedene Sorten, gegebenenfalls auch von verschiedenen Standorten, ist das Untersuchungsverfahren zu erweitern. Veränderungen, die durch Sorte und Standort auftreten, müßten erhoben und systematisiert werden. Nach Aufbau einer entsprechenden Datenbasis für Sorten und Standorteigenschaften erscheint es möglich, die Methode auch unter erweiterten Bedingungen einzusetzen.

Die Untersuchungen und Validierungsmaßnahmen wurden für die bislang verwendeten Meßparameter durchgeführt. Zur Demonstration weiterer Entwicklungsmöglichkeiten wurde ein Beurteilungsindex errechnet, der die Güte der Trennung von Proben noch zu steigern erlaubt. Die Weiterentwicklung des Verfahrens war jedoch nicht Ziel des Projektes. Die Möglichkeit wurde deshalb nur angedeutet.

Auch für die Probenmatrix Möhren konnte die Methode sowohl in ihren Schritten als auch als Gesamtmethode anhand des vorliegenden Probenmaterials erfolgreich validiert werden. Die Validierungsschritte und Maßnahmen folgten den Vorgaben aus ISO 17025. Bei Möhren lagen Varianten mit Düngungsstufen und Sortenvarianten vor. Sowohl die Wiederholung am gleichen Probenmaterial als auch die Wiederholung mit Möhren eines neuen Erntejahres zeigte, daß die Methode präzise und robust arbeitet. Mit der Methode wurden die wiederholten Untersuchungen von Düngungsstufen als auch die Sortenvarianten richtig gruppiert als auch richtig identifiziert. In Bezug auf das vorliegende Probenmaterial war die Methode geeignet.

Durch Kombination der Meßparameter erscheint die Weiterentwicklung auch für die Probenmatrix Möhren im Hinblick auf unterschiedliche Standorte und die Fragestellung verschiedener Anbausysteme möglich.

4.2.10 Aussage über den möglichen Einsatz der Methode für andere Fragestellungen

Ob sich die Methode für andere Fragestellungen einsetzen läßt, wurde in diesem Projekt nicht geprüft. Innerhalb des Projektes lagen mehrere Fragestellungen vor. Neben dem Vergleich konventioneller und ökologischer Varianten waren dies bei Möhren Düngungsstufen und Sortenvariation. Alle diese Variationen konnten mit der Methode festgestellt werden. Es erscheint deshalb sehr wahrscheinlich, daß sie auch für andere Variationen empfindlich ist. Dem kommt entgegen, daß noch weitere, bisher nicht ausgeschöpfte Meßparameter zur Verfügung stehen. Durch die Kombination mehrerer Meßparameter ergibt sich die Möglichkeit, auch komplexe Einflüsse zu erfassen.

Die bisherigen Untersuchungen wurden mit weitgehend unverarbeitetem Probenmaterial durchgeführt. Durch Übergang auf verarbeitetes Probenmaterial ergeben sich weitere Möglichkeiten.

4.3 Physiologischer Aminosäurestatus (Dr. P. Stolz)

4.3.1 Beschreibung des Verfahrens

4.3.1.1 Prozessualer Ansatz als Ergänzung zu stoffbezogenen Ansätzen

Neuere Ansätze zum Systemvergleich konventioneller bzw. ökologischer Landwirtschaft enthalten neben stoffbezogenen Betrachtungen zusätzlich prozessbezogene Betrachtungen (Tauscher et al. 2003). In diesem Sinne soll die bisherige Qualitätsbetrachtung der Pflanze aufgrund der Art und Menge der im Pflanzenmaterial nachweisbaren Stoffe um eine Betrachtung der Prozesse ergänzt werden, die das Pflanzenmaterial bis zur Ernte durchlaufen hat.

Dem Verfahren liegt der Gedanke zugrunde, den physiologischen Zustand der Pflanze anhand von präzise bestimmbar Substanzen mit biologischem Bezug zum Kulturverfahren zu charakterisieren.

Bereits 1953 wurde in den im Auftrag des VdLUFA herausgegebenen Methoden zur chemischen und biologischen Qualitätsbestimmung gärtnerischer und pflanzlicher Erzeugnisse (Schmitt/Ott 1953) darauf hingewiesen, dass bei der Bestimmung von Protein und proteinogenen Stickstoffverbindungen zwischen zwei Betrachtungsweisen zu unterscheiden sei, und zwar zwischen der pflanzenphysiologischen und der ernährungsphysiologischen Betrachtungsweise.

Die heute zur Qualitätsbeurteilung übliche Betrachtungsweise ist die ernährungsphysiologische, mittels derer die Qualität landwirtschaftlicher Produkte aufgrund der verschiedenen, in der Pflanze nachgewiesenen Stoffe wie Protein, Fett, Kohlenhydrate, Mineralien, Vitamine und sekundäre Pflanzenstoffe, aber auch unerwünschter Stoffe wie Pestizide oder Mykotoxine im Bezug auf die menschliche Ernährung beurteilt wird.

Das hier zusammenfassend als physiologischer Aminosäurestatus bezeichnete Verfahren knüpft an das von Schmitt und Ott als pflanzenphysiologische Betrachtungsweise bezeichnete Konzept an. Die Stoffe werden zunächst nicht im Hinblick auf Ihre Auswirkung für die menschliche Ernährung beurteilt, sondern im Hinblick auf ihre pflanzenphysiologische Bedeutung.

4.3.1.2 Physiologischer Aminosäurenstatus als Verfahrensbezeichnung

Die proteinogenen Stickstoffverbindungen bzw. Aminosäuren als Stoffgruppe wurden gewählt, weil sie:

- im Pflanzenstoffwechsel eine bedeutsame Rolle spielen,
- als Düngemittel bedeutsam bei der Differenzierung der Kulturverfahren biologisch und konventionell sind,
- sich analytisch relativ gut erfassen lassen und
- auch für die Humanernährung gewisse Relevanz haben.

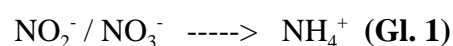
Die Aminosäuren haben für das Stoffwechselgeschehen der Pflanze eine herausragende Bedeutung (Mengel 1993). Obwohl im pflanzlichen Stickstoff-Stoffwechsel noch andere wichtige Verbindungen auftreten wie z.B. Nitrat, Nitrit und Ammonium unterhalb der Ebene der Aminosäuren, sowie die Peptide und Proteine oberhalb der Ebene der Aminosäuren wurde die Stoffgruppe der Aminosäuren zur Bezeichnung des Verfahrens gewählt, da sie in zentraler Position steht.

Das Konzept der vorliegenden Methode zur Bestimmung des physiologischen Aminosäurenstatus verschiedener Kulturpflanzen besteht somit in der Anwendung einer matrixspezifischen Methodenkombination verschiedener aminosäuren- bzw. stickstoffanalytischer Verfahren zur Beurteilung des Stoffwechselstatus der jeweils untersuchten Pflanze in Hinblick auf das zu ihrer Kultivierung angewandte Verfahren.

4.3.1.3 Grundzüge der Physiologie des Stickstoff-Stoffwechsels der Pflanze

Nach der gängigen Darstellung in der Pflanzenphysiologie wird der Stickstoff von der Pflanze in Form von Nitrat (NO_3^-) oder Ammonium (NH_4^+) aufgenommen, über Zwischenstufen zunächst zu Aminosäuren und dann zum fertigen Protein umgesetzt.

Wird der Stickstoff in der mineralisierten Form von Nitrat bzw. Nitrit aufgenommen, so muß er von der Pflanze erst auf die Stufe des Ammoniums reduziert werden:

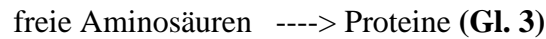


Dazu verfügt die Pflanze über Enzyme wie z.B. die Nitrit/Nitratreduktase.

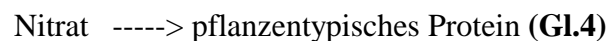
Für die Umsetzung von NH_4^+ zu freien Aminosäuren (zunächst Glutamin/Glutamat) sind die Enzyme Glutamatdehydrogenase, Glutaminsynthetase und Glutamatsynthetase von Bedeutung.



Die weitere Umsetzung in der Pflanze erfolgt bei der Proteinsynthese über verschiedene Enzymsysteme:



Vereinfachend lässt sich so der Proteinaufbau im pflanzlichen Stickstoffstoffwechsel als dreistufiger Prozess formulieren, an dessen Beginn die Nitratassimilation und an dessen Ende die pflanzliche Proteinsynthese steht.



Betrachtet man die Pflanze lediglich vom chemischen Aspekt des Aufbaues organischen Materials als primären Biomasseproduzenten, so ist dieser Prozess um so weiter fortgeschritten, je weitgehender der in der Pflanze vorhandene Stickstoff gemäß Gl. 4 diesen pflanzlichen Stoffwechselprozess durchlaufen hat.

4.3.1.4 Ganzheitliche Aspekte

Gleichung 1 des vorigen Abschnittes beschreibt diejenigen pflanzlichen Stoffwechselprozesse, die den Stickstoff, der im Nitrat in der Oxidationsstufe +V vorliegt, zur Oxidationsstufe –III reduzieren, wie sie im Ammonium, den Aminosäuren und Proteinen vorliegt.

In Gleichung 2 sind zusammenfassend alle Stoffwechselprozesse beschrieben, mit denen die Pflanze den noch strukturell undifferenzierten Ammoniumstickstoff in die Substanzvielfalt der chemischen Substanzklasse der Aminosäuren überführt.

Gleichung 3 beschreibt summarisch die weitere stoffliche Differenzierung und Funktionalisierung im Aufbau pflanzeneigener Proteine, für deren stofflichen Aufbau auf den nach Gl. 2 gespeisten Aminosäurenpool zurückgegriffen wird.

Der ganzheitliche Aspekt der Methode liegt in der Betrachtung der o.a. Stoffwechselprozesse im Hinblick auf den Pflanzenorganismus. Mithilfe von möglichst präziser chemischer Analytik werden Gehalte verschiedener Stickstoffverbindungen ermittelt. Aus diesen Stoffgehalten wird unter Bezugnahme auf die Erkenntnisse der pflanzlichen Stoffwechselphysiologie auf diejenigen Stoffwechselprozesse geschlossen, die in der geprüften Pflanze im Laufe ihrer Entwicklung bis zum Untersuchungszeitpunkt stattgefunden haben.

Je mehr Stickstoff in der Pflanze in möglichst differenzierter Form (als arttypisches

Pflanzenprotein) vorhanden ist, desto weiter ist die Pflanze in ihrer Entwicklung fortgeschritten.

Wenn noch relativ große Mengen Stickstoff in oxidiert Form (z.B. Nitrat) oder undifferenzierter Form (z.B. Ammonium oder Aminosäuren) vorliegen, konnten die Prozesse des Stickstoffstoffwechsels jeweils noch nicht zu Ende kommen. Dementsprechend liegt eine mehr oder weniger vollständige Ausprägung des Pflanzenorganismus in der untersuchten Pflanzenprobe vor. Man könnte dies auch als höhere oder geringere innere Ausreifung der Pflanze bezeichnen.

Nach unserer Erfahrung wird sich bei ökologischer Pflanzenproduktion ohne Einsatz leichtlöslicher mineralischer Stickstoffdüngung, sowie allgemein weniger intensiver Düngung eine solche höhere innere Ausreifung ergeben.

Die o.a. Stoffwechselprozesse in einer konventionell produzierten Möhre mit intensiver Stickstoffdüngung werden eine geringere Menge von dem in der Pflanze vorhandenen Stickstoff in Richtung des Pflanzenprozesses der Differenzierung und Funktionalisierung umgesetzt haben. Der für den Organismus der Möhrenpflanze typische Stoffwechsel konnte sich weniger in der Möhrens substanz einprägen.

Ein Maß für die Umsetzung der in der Pflanze gebundenen Biomasse durch die für den jeweiligen Pflanzenorganismus spezifischen Stoffwechselprozesse kann sein, wie weit freie Aminosäuren (Gl. 3) in Proteine umgewandelt sind.

Diese Aussage, dass der von der Pflanze aufgenommene Stickstoff den Stoffwechselprozess des Pflanzenorganismus mehr oder weniger vollständig durchlaufen hat, ist diejenige ganzheitliche Aussage, die nach dem vorliegenden Verfahren getroffen werden kann.

4.3.1.5 Gesamtverfahren und Methodenkombination

Als Verfahren zur Bestimmung des physiologischen Aminosäurenstatus wird im vorliegenden Projekt die matrixspezifische Kombination verschiedener stickstoff- und aminosäureanalytischer Methoden bezeichnet. Das gesamte zu betrachtende Verfahren ist also als Kombination verschiedener einzelner Prüfmethode aufgebaut. Durch die Kombination läßt sich der Status des pflanzlichen Stickstoff-Stoffwechsels auf verschiedenen Stufen erfassen; der Entwicklungszustand des Proteinaufbaus ist dadurch präziser zu beurteilen.

Die übergeordnete Forschungsfrage lautet entsprechend:

Lassen sich durch Ermittlung des physiologischen Aminosäurenstatus (PA) die vorliegenden Proben von Möhren und Weizen aus unterschiedlichen Kulturverfahren differenzieren?

Für jede dazu verwendete einzelne Prüfmethode lauten die Fragen:

1. Ist das zur Erfassung des jeweiligen Parameters ausgewählte Verfahren zum Nachweis des Unterschiedes der Kulturverfahren geeignet?
2. Ist das ausgewählte Verfahren ausreichend präzise?
3. Liefert das Verfahren ausreichend richtige Werte?

4.3.1.6 Beschreibung der Einzelprüfmethoden

Die einzelnen mit dem Probenmaterial vorgenommenen Arbeitsschritte, sowie die Probenlenkung erfolgten nach Standardarbeitsanweisungen. Die Probenahme war nicht Gegenstand des Teilprojekts. Die Lagerung der Proben nach Ankunft erfolgte kühl und dunkel.

Als Getreidemischprobe wurden 800g aus jeweils 200g der jeweiligen Feldwiederholung nach Reinigung gemischt und gemahlen. Von den Karotten wurden nur die zum Verzehr geeigneten Teile untersucht, zusätzlich wurde ca. 1 cm vom oberen und unteren Ende entfernt. Bei Probenmengen bis 50 Karotten wurde jeweils die Gesamtmenge der angelieferten Probe zu einer Mischprobe vereinigt, bei darüberliegenden Probenmengen wurde eine repräsentative Auswahl von 50 Karotten untersucht.

Das Labor verfügt über ein Qualitätsmanagementsystem nach ISO 17025.

4.3.1.6.1 Gesamtproteinbestimmung in Weizen und Möhren

Die Bestimmung erfolgt nach Kjeldahl nach der Methode aus §35 LMBG. Die homogenisierte und feinerkleinerte Probe (ca. 1 g Weizen; ca. 6 g Möhren) wird mit Schwefelsäure/Katalysator bei 400 °C aufgeschlossen, dadurch wird der organisch gebundene Stickstoff in Ammoniumsulfat überführt. Nach Versetzen mit Natronlauge im Überschuss wird durch Wasserdampfdestillation das Ammoniak übergetrieben, in Borsäurelösung aufgefangen und anschließend titrimetrisch bestimmt.

4.3.1.6.2 Nitratbestimmung in Möhren

Die Bestimmung erfolgt mittels HPLC nach der Methode aus §35 LMBG. Die homogenisierte und feinerkleinerte Probe (ca. 25 g) wird mit (95 °C) heißem Wasser (250 ml) extrahiert. Störende Begleitstoffe werden durch Klärung nach Carrez oder durch Reinigung über Festphasenextraktion

und nachfolgende Filtration entfernt. Die Bestimmung erfolgt mit Umkehrphasen-HPLC (LiChrospher 100 NH₂) und Detektion im UV-Bereich (205 nm).

4.3.1.6.3 Bestimmung freier Aminosäuren in Möhren

Die Bestimmung erfolgt mittels Aminosäurenanalysator nach der VDLUFA-Methodensammlung. Die homogenisierte und feinzerkleinerte Probe (15 g) wird mit Trichloressigsäure (12 %) extrahiert. Störende Begleitstoffe werden dabei durch Fällung mit Trichloressigsäure (48 % und anschließende Filtration) entfernt. Die Bestimmung erfolgt ionenchromatographisch (Pharmacia LKB) mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung und UV-Detektion (570 nm bzw. 440 nm).

4.3.1.6.4 Bestimmung proteinogener Aminosäuren in Weizen nach Hydrolyse

- a) Die Bestimmung der proteinogenen Aminosäuren mit Ausnahme von Cystein, Methionin und Tryptophan erfolgt nach saurer Hydrolyse mittels HPLC bzw. Aminosäurenanalysator nach der VDLUFA-Methodensammlung. Die homogenisierte und feinzerkleinerte Probe (ca. 0,8 g) wird mit 6 N HCl für 24 h bei 110 °C unter Stickstoff im geschlossenen Gefäß hydrolysiert. Die Bestimmung erfolgt mittels Umkehrphasen-HPLC (HP-Aminoquant; Hypersil AA ODS; 338 nm) mit Vorsäulenderivatisierung (OPA/FMOC) bzw. ionenchromatographisch (Pharmacia LKB) mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung und UV-Detektion (570 nm bzw. 440 nm).
- b) Die Bestimmung der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein erfolgt separat nach saurer Hydrolyse mit vorheriger Oxidation mittels HPLC und Aminosäurenanalysator nach der VDLUFA-Methodensammlung. Dazu wird die homogenisierte und feinzerkleinerte Probe (0,8 g) unter Eis-Kühlung für 24h mit Ameisensäure/Wasserstoffperoxid oxidiert. Nach Abbruch der Oxidation mit Natriumsulfit wird mit 6 N HCl für 24 h bei 110 °C unter Stickstoff im geschlossenen Gefäß hydrolysiert. Die Bestimmung erfolgt mittels Umkehrphasen-HPLC (HP-Aminoquant; Hypersil AA ODS; 338 nm) mit Vorsäulenderivatisierung (OPA/FMOC) bzw. ionenchromatographisch (Pharmacia LKB) mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung und UV-Detektion (570 nm bzw. 440 nm).
- c) Die Bestimmung von Tryptophan erfolgt separat nach basischer Hydrolyse mittels HPLC nach der VDLUFA-Methodensammlung. Dazu wird die homogenisierte und feinzerkleinerte Probe (ca. 0,8 g) mit 4 N LiOH für 24h bei 110°C unter Stickstoff im

geschlossenen Gefäß hydrolysiert. Die Bestimmung erfolgt mittels Umkehrphasen-HPLC (HP-Aminoquant; Hypersil AA ODS; 338) mit Vorsäulenderivatisierung (OPA/FMOC) bzw. ionenchromatographisch (Pharmacia LKB) mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung und UV-Detektion (570 nm bzw. 440 nm)

4.3.2 Stand der Methoden zu Projektbeginn

Zur Frage der Unterscheidung von Lebensmitteln aus ökologischer und konventioneller Produktion (WOESE et al. 1995, ALFÖLDI et al. 1998) sind protein- bzw. aminosäureanalytische Methoden sowohl einzeln als auch verschiedentlich in Kombination eingesetzt worden (z.B. KLETT 1968, PETTERSSON 1970, SCHUPHAN 1974, Vetter et al. 1983, Abele 1987, Kerpen 1988, Stöppler et al. 1989, Reinken et al. 1990, Matthies 1991, Kjer 1993, Schulz et al. 1997). In den hier beispielhaft aufgeführten Arbeiten wurde der Rohproteingehalt (Gesamtproteingehalt) zur Qualitätsbeurteilung ermittelt. Der größte Teil dieser Arbeiten enthält auch die Bestimmung des Reinproteins und des relativen Eiweißgehaltes (z.B. Klett 1968, Schuphan 1974). Die Untersuchung der proteinogenen Aminosäuren zur chemischen Bestimmung der ernährungsphysiologischen Proteinqualität (Pettersson 1982) oder ausgewählter, einzelner Aminosäuren (z.B. Schuphan 1974, Vetter et al. 1983) erfolgte in einigen Fällen. Untersuchungen freier Aminosäuren wurden auf den Gesamtgehalt (als Leucin) bezogen durchgeführt, eine Differenzierung der einzelnen Aminosäuren jedoch nicht vorgenommen (Schuphan 1974). Hinsichtlich der Differenzierung zwischen ökologischem und konventionellem Anbau ergaben sich teilweise Unterschiede. Bei Getreide aus konventionellem Anbau wurden höhere Gesamtproteingehalte (z.B. Stöppler et al. 1989) gefunden, bei Kopfsalat konventionellen Anbaus geringere relative Eiweißgehalte (Reinken et al. 1990). Die gefundenen Unterschiede wurden jedoch nicht als geschlossenes Konzept weiterverfolgt.

Protein wird allgemein als wertgebender Inhaltsstoff eingestuft. Ein hoher Gesamtproteingehalt, Reinproteingehalt oder relativer Eiweißgehalt wird als qualitätssteigernd bewertet. Die Beurteilung eines hohen Proteingehaltes als wertbestimmende Eigenschaft kann als klassische Bewertungsgrundlage angesehen werden. Der relative Eiweißgehalt (Schuphan 1976) bezieht sich darüber hinaus auf die physiologische Organisationsleistung der Pflanze und kann damit zusätzlich im Sinne einer ganzheitlichen Beurteilung (Meier-Ploeger et al. 1991) interpretiert werden. Die Organisationsleistung der Pflanze wurde bislang als Kriterium zur Unterscheidung der Qualität ökologischer Produkte von konventionellen noch nicht explizit diskutiert, obwohl sie zum Beispiel im Parameter „Relativer Eiweißgehalt“ bereits der Sache nach enthalten ist.

Die oben beispielhaft angeführten Untersuchungen nutzen zur Beurteilung der Produktqualität auf Grundlage der Aminosäuren/Proteingehalte Teilaspekte des vorkommenden analysierbaren Stoffspektrums N-haltiger Substanzen. Insbesondere in älteren Arbeiten sind z.T. Methoden angewendet worden, die bezüglich Präzision und Dokumentation heutigen Standards (DIN ISO 17025) nicht entsprechen. Eine aktuelle systematische Beurteilung zur qualitativen Bewertung von Lebensmitteln aus ökologischer und konventioneller Produktion auf Grundlage von Protein/Aminosäuren-Untersuchungen mit validierter Datenbasis ist damit auf Grundlage bisheriger Arbeiten nicht möglich. Insbesondere fehlen im Sinne eines holistischen Anspruchs validierte Verfahren zur Datenerhebung, die statistischen Kriterien genügen und biologisch plausible Bezüge zum Pflanzenorganismus ermöglichen.

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass für eine sichere Differenzierung von Proben nach Anbauweisen mehrere Prüfparameter erforderlich sind. Zusammenfassung mehrerer Parameter zu einem „physiologischen Index“ (Huber et al. 1988) für Möhren, „Qualitätsindex“ (Schulz et al. 1997) für Kartoffeln oder „technischen Index bzw. Vitalindex“ (Weibel et al. 2001) für Äpfel zeigen jeweils gute Korrelationen zum Anbauverfahren. Die Anwendung eines mehrparametrischen Verfahrens erscheint auch im vorliegenden Fall erfolgversprechend.

4.3.3 Vorversuche

Um auch geringe Unterschiede sicher differenzieren zu können, sollen die eingesetzten Methoden möglichst präzise sein. Die eingesetzte Methodenkombination soll möglichst Bezug zu dem geprüften Anbauverfahren haben. Die Methode bzw. das Labor soll dokumentiert auf Referenzstandards rückführbar arbeiten, außerdem soll die Laboreignung dokumentiert verifiziert sein.

In Vorversuchen wurde die Methodeneignung überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass das zur Nitratuntersuchung ursprünglich ausgewählte Verfahren relativ hohe Verfahrensschwankungen aufweist. Es wurde daher ein weiteres Nachweisverfahren mittels HPLC in die Untersuchungen miteinbezogen.

Für die ausgewählten Verfahren wurden Vorversuche zur Bestimmung der Eignung durch Bestimmung der Messpräzision durchgeführt.

Nach umfassender Literaturrecherche wurden die jeweils in Frage kommenden Verfahren für die Vorprüfung ausgewählt. Vor Beginn wurden die Standardarbeitsanweisungen erstellt.

Danach wurden jeweils Prüfungen zur Methodeneignung vorgenommen. Aufgrund von Voruntersuchungen wurde für die beiden Matrices die Untersuchung mittels folgender Einzelprüfmethoden festgelegt:

Für das vorliegende Vorhaben wurden die Matrices Möhren und Weizen ausgewählt. Für die Matrix Möhren wurden nach Voruntersuchungen als Prüfverfahren Rohproteinstickstoff nach Kjeldahl, extrahierbare freie Aminosäuren und Nitratstickstoff ausgewählt.

Für die Matrix Weizen wurden die Prüfverfahren Rohproteinstickstoff nach Kjeldahl und Bestimmung der Aminosäuren nach Hydrolyse ausgewählt.

4.3.4 Validierung

4.3.4.1 Validierung des Gesamtverfahrens

Die dem Teilprojekt Physiologischer Aminosäurenstatus zugrundeliegende Validierungsfrage lautet:

Lassen sich durch Ermittlung des physiologischen Aminosäurenstatus (PA) die vorliegenden Proben von Möhren und Weizen aus unterschiedlichen Kulturverfahren differenzieren?

Als Physiologischer Aminosäurenstatus wird hier die probenspezifische Kombination verschiedener aminosäuren- bzw. stickstoffanalytischer Untersuchungsmethoden bezeichnet.

Das Projekt dient der Validierung des Gesamtverfahrens d.h. der Anwendung einer probenspezifischen Kombination verschiedener aminosäuren- bzw. stickstoffanalytischer Untersuchungsmethoden auf die ausgewählten Matrices Weizen und Möhren. Für jedes dazu verwendete Untersuchungsverfahren lauten die Validierungsfragen:

1. Ist das zur Erfassung des jeweiligen Parameters ausgewählte Verfahren zum Nachweis des Unterschiedes der Kulturverfahren geeignet?
2. Ist das ausgewählte Verfahren ausreichend präzise?
3. Liefert das Verfahren ausreichend richtige Werte?

Die Validierung gliedert sich also in zwei Teilschritte: Bestimmung der Methodenpräzision und Richtigkeit der Einzelprüfmethoden, sowie dem Nachweis, dass das Gesamtverfahren ausreichend differenziert.

Zur Bestimmung der einzelnen Untersuchungsparameter werden normierte, anerkannte Prüfmethoden herangezogen, deren Eignung im vorliegenden Labor für die vorliegende Fragestellung jedoch nochmals verifiziert wird. Dieser Schritt wird als dringend erforderlich angesehen, da die Anwendung einer validierten Methode alleine, ohne Verifizierung im durchführenden Labor für die erforderliche analytische Qualität nicht ausreicht.

Die Validität des Gesamtverfahrens ergibt sich jeweils nach Decodierung der codierten Vergleichsproben durch sachgerechte Beantwortung der Frage nach der Eignung zur Differenzierung und richtigen Zuordnung der Proben zu den Kulturverfahren.

4.3.4.2 Matrixspezifische Einzelprüfmethoden

Für das vorliegende Vorhaben wurden die Matrices Möhren und Weizen ausgewählt. Für die Matrix Möhren wurden nach Voruntersuchungen als Prüfverfahren Rohproteinstickstoff nach Kjeldahl, extrahierbare freie Aminosäuren und Nitratstickstoff ausgewählt.

Für die Matrix Weizen wurden die Prüfverfahren Rohproteinstickstoff nach Kjeldahl und Bestimmung der Aminosäuren nach Hydrolyse ausgewählt.

4.3.4.3 Verifizierung der Einzelprüfmethoden

Als Einzelprüfverfahren werden, soweit möglich, validierte Methoden gemäß § 35 LMBG, VDLUFA, DIN, DFG, AOAC etc. eingesetzt. Bei der Anwendung solcher Standardmethoden wird der Nachweis der Eignung für die jeweilige Methode durch Bestimmung der im Labor erzielten Präzision durch Mehrfachbestimmung unter Wiederholbedingungen (bzw. interne Vergleichsbedingungen zur Bestimmung der Laborpräzision) sowie der Richtigkeit durch Bestimmung der Wiederfindung erbracht. Falls möglich, wird die Untersuchung von zertifizierten Referenzmaterialien durchgeführt. Liegen die ermittelten Werte im geforderten Bereich, so ist die Laboreignung nachgewiesen.

Wenn mithilfe der so charakterisierten Methode definierte Proben aus Anbauversuchen ausreichend differenziert werden können, so ist das Einzelverfahren im Rahmen der Bestimmung des physiologischen Aminosäurenstatus zur Differenzierung von Kulturverfahren geeignet.

4.3.4.3.1 Probenvorbereitung

Zunächst ist der Zweck des Verifizierungsverfahrens, die Präzision und Richtigkeit des eingesetzten Einzelprüfverfahrens nachzuweisen. Es wird vermutet, dass Schwankungen der einzelnen Möhren untereinander, sowie in der einzelnen Möhre in unterschiedlichen Pflanzenteilen (oberer Teil oder unterer Teil) vorliegen. Daher wird zunächst eine möglichst homogene Mischprobe erzeugt, um Schwankungen im Prüfverfahren von schwankenden Gehalten im Probengut differenzieren zu können.

Würden die Prüfungen zur Verifizierung der Präzision und Richtigkeit des eingesetzten Einzelprüfverfahrens an verschiedenen einzelnen Prüflingen (z. B. verschiedenen Einzelmöhren) oder verschiedenen Pflanzenteilen (z.B. oberer Teil oder unterer Teil) vorgenommen, so würden sich mögliche Inhomogenitäten des Analytgehaltes mit den zu ermittelnden Messwertschwankungen überlagern, deren exakte Bestimmung würde dadurch verhindert.

4.3.4.4 Präzision (Betrachtung zufälliger Fehler)

Zur Verifizierung der Methoden- und Laboreignung erfolgt eine Prüfung auf Präzision. Als Maß der Präzision wird die absolute und relative Standardabweichung aus den Daten einer Mehrfachbestimmung ermittelt.

Eine detaillierte Betrachtung unterscheidet zwischen Meßpräzision und Methodenpräzision.

Die Meßpräzision als Variationskoeffizient (VK), bzw. rel. Standardabweichung bezieht sich nur auf den instrumentellen Meßvorgang und liegt in der Regel in einem Bereich zwischen <0,05 % für Titrationen, 1 % für HPLC, GC, oder Photometrie und bis 2% für Feuchtemessung oder Kappillarelektrophorese (Kromidas 1999).

Die erreichbare Methodenpräzision ist von der Konzentration des Analyten in der Matrix abhängig. Die Richtwerte für den Pharmabereich liegen für Analytgehalte von 10% und mehr bei max. 3%, für 1-10 % Analytgehalt bei einem VK von 5 % und für Analytgehalte von 0,1 bis 1 % bei einem VK von 10 % (Kromidas 1999).

Nach der Auswertung von Laborvergleichsuntersuchungen, die von Horwitz (1982) vorgenommen wurde, gelten in Abhängigkeit vom Analytgehalt in der Matrix als maximal akzeptierter bzw. erwarteter Wiederhol-VK (bzw. Vergleichs-VK) bei 10 % Analytgehalt 1,90 (2,83), bei 1 % = 2,68 (4,00), bei 0,1 % = 3,79 (5,66), bei 0,01 % = 5,30 (7,91) bei 0,001% (10 ppm) = 7,30 (10,90) bei 0,0001 % (1 ppm) = 11 (16,42) (Kromidas 1999).

Für die vorliegenden Analyten bzw. Matrices sind im folgenden die der Planung zugrundeliegenden Erwartungswerte für den Analytgehalt, die Meßpräzision, die Methodenpräzision und die als Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen ermittelten tatsächlichen Werte angegeben:

	erwarteter Analytgehalt (%)	Meßpräzision (VK; %)	Methoden- präzision/ Pharma (VK; %)	Methodenprä- zision / Horwitz (VK; %)	Ist (VK; %)
Kjeldahl-N in Weizen	1-3	0,005 für Titr. 1 gesamt	5	2,68 (4,00)	< 2
Kjeldahl-N in Karotten	0,1-0,2	0,005 für Titr. 1 gesamt	10	3,79 (5,66)	< 2
Nitrat in Karotten	0,0001-0,2	1	> 10	11 (16,42) 3,79 (5,66)	< 3
freie AS in Karotten	0,001-0,1	1	> 10	11 (16,42) 3,79 (5,66)	< 4,4
AS nach Hydrolyse in Weizen	0,1-3	1	5-10	2,68 (4,00) 3,79 (5,66)	< 4,6

Tabelle 30: Daten zur Präzision der für die Untersuchung angewandten Verfahren

4.3.4.5 Richtigkeit (Betrachtung systematischer Fehler)

Zur Verifizierung der Methoden- und Laboreignung erfolgt eine Prüfung auf Richtigkeit. Diese kann durch systematische Beurteilung der Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen, eine Vergleichsprüfung durch andere Prüflaboratorien, einen Vergleich mit Ergebnissen anderer Verfahren oder eine Kalibrierung mit Bezugssubstanzen oder Referenzmaterial erfolgen.

Im Folgenden seien die Verifizierungs- und Validierungsmaßnahmen vereinfacht als Validierungsmaßnahmen bezeichnet.

	erwarteter Analytgehalt (%)	Vorgabe zur Wiederfindung ¹ (%)	Ermittelte Wiederfindung (%)
Kjeldahl-N in Weizen	1-3	97,0-103,0	100,01-100,05
Kjeldahl-N in Karotten	0,1-0,2	95,0-105,0	n.b.
Nitrat in Karotten	0,0001-0,2	95,0-105,0 ² (70-120)	101,22-106,07
freie AS in Karotten	0,001-0,1	95,0-105,0 ² (70-120)	91,08-105,69
AS nach Hydrolyse in Weizen	0,1-3	97,0-103,0 (95,0-105,0) (70-120)	87,92-106,10

Tabelle 31: Daten zur Wiederfindung der für die Untersuchung angewandten Verfahren

1 Die EPA (zit. nach Kromidas 1999) akzeptiert bei Wirkstoffgehalten > 10% WFR von 98,0-102%; bei Wirkstoffgehalten von 1-10% WFR von 97,0-103%; bei Wirkstoffgehalten < 1% WFR von 95,0-105%; Die DFG fordert für Rückstandsuntersuchungen (im ppm-Bereich) eine WFR von mindestens 70%..

2 je nach Gehalt auch weiterer Bereich; der Nitratgehalt ohne Standardaddition betrug 0,02%; eine Wiederfindung von 106 % scheint daher noch akzeptabel.

4.3.4.5.1 Präzision und Richtigkeit der Bestimmung des Rohprotein-N

Verfahrensbedingt ist lediglich der Probenaufschluß mit konz. Schwefelsäure/Katalysator als matrixspezifisch anzusehen. Danach liegt der Proteinstickstoff der beiden in Frage kommenden Matrices als Ammoniumsulfat vor, welches entsprechend dem Verfahren quantifiziert wird.

Neben der Dichtigkeit der Wasserdampfdestillationsanlage ist ein wesentliches Kriterium die Vollständigkeit des Aufschlusses, diese wird dadurch sichergestellt, dass noch 90 Minuten auf 400°C erhitzt wird, nachdem die Aufschlußlösung klar ist.

Die Richtigkeit der Gerätequalifizierung wurde mit Referenzsubstanz nachgewiesen. Es wurden zwei verschiedene Qualitäten der Referenzsubstanz geprüft. Die erste Qualität war Acetanilid p.a., welches im Trockenschrank sowie im Exsikkator nachgetrocknet worden war, die zweite Qualität war zertifizierte Referenzsubstanz für die Elementaranalyse, von der für die Untersuchung eigens eine frische Packung geöffnet wurde.

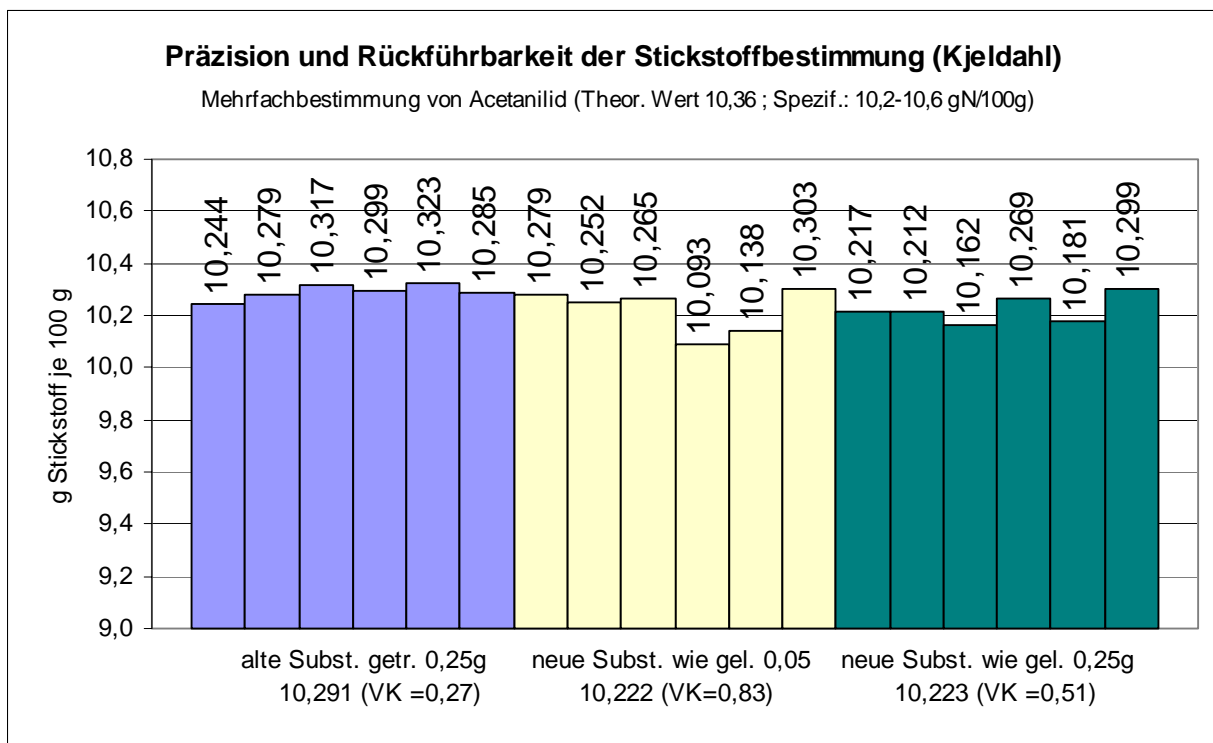


Abbildung 92: Präzision und Rückführbarkeit der Stickstoffbestimmung (Kjeldahl)

Für die alte Substanz (Acetanilid p.a., getr.) wurde bei einer Einwaage von 0,25 g mit 10,291 (VK 0,27) 99,33 % des theoretischen Wertes gefunden. Für die neue Substanz (Acetanilid, zertifiziert für die Elementaranalyse) aus der direkt vor der Bestimmung frisch geöffneten Packung wurde bei einer Einwaage von 0,25 g mit 10,223 (VK 0,51) 98,68 % des theoretischen Wertes gefunden. Bei einer Einwaage von 0,05 g wurden mit 10,222 (VK 0,83) 98,67 % des theoretischen Wertes gefunden.

Im Bereich von ca. 0,005 g N bis 0,025 g N je Aufschluß liegen die Werte sowohl für die Wiederfindung als auch für die Präzision innerhalb des geforderten Bereiches.

Außerdem wurde eine Standardadditionsuntersuchung durch Zugabe verschiedener Mengen von Acetanilid als Referenzsubstanz zur Probenmatrix Weizen durchgeführt. Die Probenmengen bzw. Menge der Referenzsubstanz wurde so gewählt, dass die zugegebene Menge Acetanilid im ersten Additionsniveau etwa der halben in der Matrix ohne Standardaddition vorhandenen Stickstoffmenge entspricht. Im zweiten Additionsniveau entspricht die zugegebene Menge Referenzsubstanz etwa der gesamten in der Matrix vorhandenen Stickstoffmenge.

Außerdem waren die Einwaagen und Reagenzkonzentrationen so gewählt, dass die entstehenden Ammoniakmengen im Bereich einer üblichen Versuchsdurchführung liegen, um bestmögliche Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

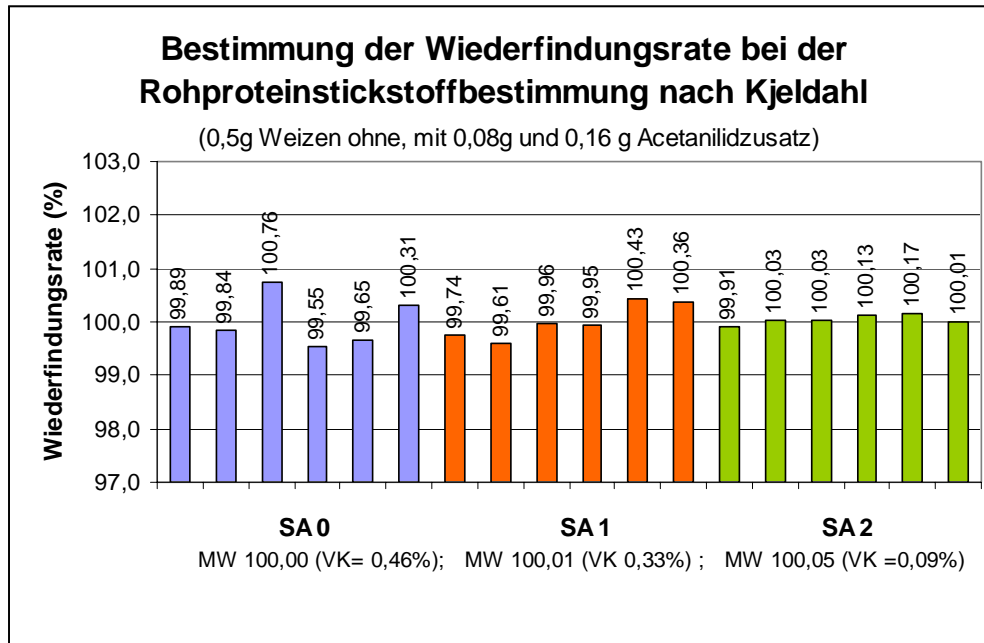


Abbildung 93: Wiederfindungsrate Rohproteinbestimmung nach Kjeldahl

Ohne Standardaddition wurde bei einer Probeneinwaage von ca. 0,5 g Weizen ein VK von 0,46 % erreicht, die Wiederfindungsrate wurde bei diesem Versuch auf 100 % normiert angegeben. Die Wiederfindung bei jeweils 0,08 g Acetanilidzusatz betrug im Mittel 100,01 % bei einem VK von 0,33 %. Die Wiederfindung bei jeweils 0,16 g Acetanilidzusatz betrug im Mittel 100,05 % bei einem VK von 0,09 %.

Außerdem erfolgte die Teilnahme an einem Laborvergleichsversuch „Rohprotein einer Backware“ der Firma LVU Herbolzheim. Der von KWALIS bestimmte Mittelwert lag bei 6,76 g/100g und wich nur um 0,03 g/100g vom Mittelwert aller teilnehmenden Labore ab.

Zusätzlich erfolgte die Bestimmung von Rohprotein-N in Weizenmehl, welches als Referenzmaterial CRM 382 von dem Bureau of Reference der EU-Kommission mit einem Gehalt von 2,12 +/- 0,02 g Protein-N je 100g TS zertifiziert ist. Der von KWALIS ermittelte Wert wies mit 2,117 lediglich eine Abweichung von 0,003 g/100g vom zertifizierten Wert auf.

Mit diesen Daten zeigte sich die Rohproteinbestimmung nach Kjeldahl als außerordentlich präzises Verfahren mit hoher Richtigkeit, dem im Rahmen der Validierung des Gesamtverfahrens somit eine hohe Trennschärfe zukommen sollte.

4.3.4.5.2 Präzision und Richtigkeit der Bestimmung von Nitrat in Möhren

Die Messpräzision der Nitratbestimmung wurde geprüft und liegt im geforderten Bereich unter 1 %.

Zur Bestimmung der Richtigkeit wurde ein Standardadditionsversuch mit zwei Additionsniveaus mit jeweils vierfacher Wiederholung durchgeführt. Von einer aus statistischen Gründen wünschenswerten sechsfachen Wiederholung wurde abgesehen, da die Zahl der Parallelwiederholungen bei der Probenaufarbeitung der limitierende Faktor ist. Mit dem hier durchgeführten Verfahren schien es zweifelhaft, eine sechsfache Wiederholung (18-fache Parallelaufarbeitung) mit der gewünschten Präzision durchführen zu können.

Ein bei der Nitratanalytik kritischer Punkt ist die mögliche Reduktion von Nitrat zu Nitrit. Ältere Verfahren arbeiten daher z.B. mit einer Totalreduktion des Nitrat zu Nitrit (Cadmiumreduktor) und nachfolgender Derivatisierung und photometrischer Bestimmung.

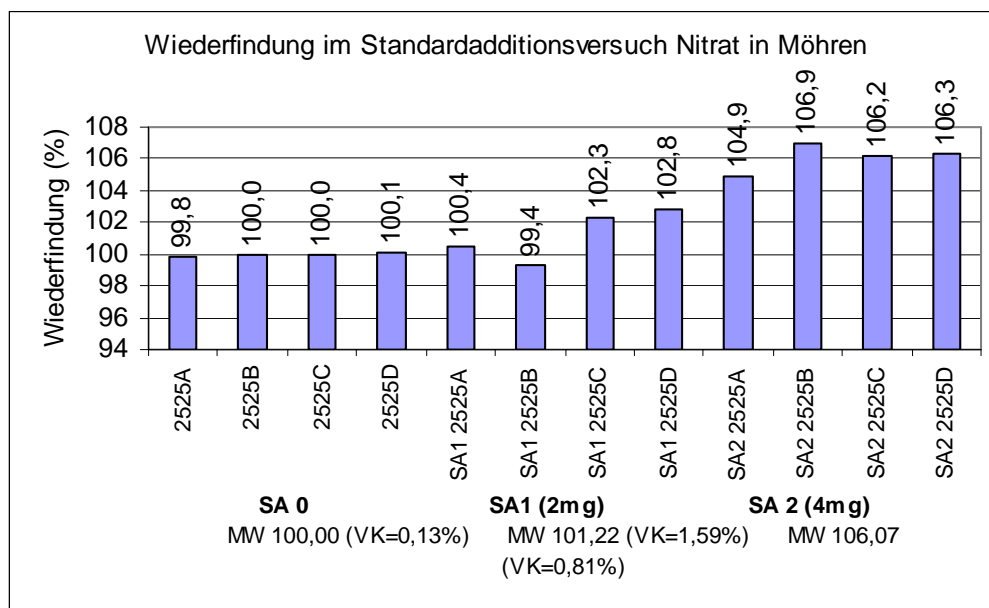


Abbildung 94: Wiederfindung Standardadditionsversuch Nitrat in Möhren

Die Abbildung 94 zeigt die Wiederfindungsraten im Standardadditionsversuch Nitrat. Die Probenmengen bzw. Menge der Referenzsubstanz wurde so gewählt, dass die zugegebene Menge Nitrat im ersten Additionsniveau etwa der halben in der Matrix ohne Standardaddition vorhandenen Nitratmenge entspricht. Im zweiten Additionsniveau entspricht die zugegebene Menge Referenzsubstanz etwa der gesamten in der Matrix vorhandenen Nitratmenge.

Außerdem waren die Einwaagen und Reagenzkonzentrationen so gewählt, dass die zu bestimmenden Nitratmengen im Bereich einer üblichen Versuchsdurchführung liegen, um bestmögliche Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Die Wiederfindung oberhalb von 100% ist vermutlich durch chromatografisch nicht abgetrennte Matrixbestandteile verursacht. Die Variationskoeffizienten von bis zu 1,6% sind vermutlich auf die umfangreiche Probenvorbereitung mit Proteinfällung und mehrfacher Filtration zurückzuführen. Der VK liegt mit maximal 1,6 % deutlich unter dem von Horwitz ermittelten Wert von 3,79%, das Verfahren ist somit ausreichend präzise.

Bis zu einem Analytgehalt von 0,2 % sind nach Kromidas Wiederfindungen von bis zu 105 % akzeptabel. Der in der untersuchten Probe vorliegende Gehalt lag ohne Standardaddition mit ca. 0,02% deutlich darunter und läßt daher die Wiederfindung von ca. 106 % akzeptabel erscheinen. Damit ist das Ergebnis als zufriedenstellend zu bezeichnen.

4.3.4.5.3 Präzision und Richtigkeit der Bestimmung extrahierbarer Aminosäuren

Durch Voruntersuchungen waren Asparginsäure (Asp), Threonin (Thr), Serin (Ser), Aspargin (Asn), Glutaminsäure (Glu), Glutamin (Gln), Glycin (Gly), Alanin (Ala), Valin (Val), Methionin (Met), Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Tyrosin (Tyr), Phenylalanin (Phe), Gamma-Aminobuttersäure (Gaba), Lysin (Lys), Histidin (His), Tryptophan (Trp), Arginin (Arg), und Prolin (Pro) als in relevanten Mengen vorkommende, physiologische Substanzen des Stickstoff-Stoffwechsels der Möhre nachgewiesen worden.

Die Konzentrationen der einzelnen Stoffe liegen zwischen ca. 0,1 und 10 $\mu\text{mol/g}$ FS. In prozentualer Angabe entspricht dies etwa 0,001- 0,1 %.

Die Messpräzision der Aminosäurenbestimmung wurde geprüft und liegt im geforderten Bereich unter 1 %. Zur Bestimmung der Richtigkeit wurde ein Standardadditionsversuch mit einem Grundniveau und zwei Additionsniveaus mit jeweils vierfacher Wiederholung durchgeführt. Von

einer aus statistischen Gründen wünschenswerten sechsfachen Wiederholung wurde abgesehen, da die Zahl der Parallelwiederholungen bei der Probenaufarbeitung der limitierende Faktor ist. Mit dem hier durchgeführten Verfahren schien es zweifelhaft, eine sechsfache Wiederholung (18-fache Parallelaufarbeitung) mit der gewünschten Präzision durchführen zu können.

	Niveau 1 (SA 0)			Niveau 2 (SA1)			Niveau 3 (SA 2)			MW	WF	MW	V _K
	Gehalt % in FS	SA0 WF	V _K V _K	Zugabe μmol/g FS	SA1 WF	V _K	Zugabe μmol/g FS	SA2 WF	V _K				
Asp	0,025	100,00	1,06	3,76	97,43	0,50	7,513	99,67	0,44	98,55	0,67		
Thr	0,007	100,00	2,52	0,839	105,39	1,05	1,679	106,69	0,73	106,04	1,43		
Ser	0,016	100,00	1,70	1,903	96,86	0,60	3,806	97,34	0,29	97,10	0,86		
Asn	0,052	100,00	1,20	3,784	101,05	0,73	7,569	102,77	0,22	101,91	0,72		
Glu	0,003	100,00	4,17	2,245	102,92	1,47	4,491	93,78	0,49	98,35	2,04		
Gln	0,090	100,00	1,86	5,953	95,38	0,85	11,905	92,82	0,58	94,10	1,10		
Gly	0,001	100,00	4,40	0,133	99,37	3,45	0,266	93,10	0,81	96,24	2,89		
Ala	0,039	100,00	1,33	5,051	95,06	0,59	10,102	96,33	0,80	95,70	0,91		
Val	0,008	100,00	2,54	0,683	94,39	0,68	1,366	94,81	1,67	94,60	1,63		
Met	0,002	100,00	2,92	0,134	100,00	1,04	0,268	98,97	1,46	99,48	1,81		
Ile	0,006	100,00	2,06	0,762	101,49	0,62	1,525	98,67	1,74	100,08	1,47		
Leu	0,004	100,00	2,08	0,762	102,50	0,15	1,525	97,30	1,38	99,90	1,20		
Tyr	0,004	100,00	4,09	0,221	100,45	0,27	0,442	101,23	1,02	100,84	1,79		
Phe	0,009	100,00	2,00	0,605	100,89	0,18	1,211	100,30	1,82	100,60	1,33		
Gaba	0,038	100,00	1,24	1,939	100,92	2,35	3,879	104,10	1,32	102,51	1,64		
Lys	0,002	100,00	2,97	0,137	103,22	0,43	0,274	104,50	1,05	103,86	1,48		
His	0,003	100,00	2,56	0,322	100,80	0,15	0,644	101,22	1,10	101,01	1,27		
Trp	0,002	100,00	3,06	0,098	99,37	1,16	0,196	91,08	1,40	95,23	1,87		
Arg	0,014	100,00	1,24	0,574	99,74	0,36	1,148	99,38	1,22	99,56	0,94		
Pro	0,010	100,00	2,16	4,343	96,04	0,83	8,686	99,30	0,88	97,67	1,29		
MW WF		100,00			99,66			98,67		99,17			
MW V _K			2,36			0,87			1,02		1,42		
Min			1,06		94,39	0,15		91,08	0,22				
Max			4,4		105,39	3,45		106,69	1,74				

Tabelle 32: Daten zur Präzision und Richtigkeit der Bestimmung freier Aminosäuren (n=4)

Es wurden drei Konzentrationsniveaus untersucht. Das erste Niveau entspricht dem natürlichen Gehalt der Probe an freien Aminosäuren. Das zweite Niveau wurde durch Standardaddition in etwa der Höhe des natürlichen Gehaltes erhalten, das dritte Niveau durch Zugabe etwa des doppelten natürlichen Gehaltes. Die jeweils ermittelten bzw. zugegebenen Gehalte und Mengen sind in der Tabelle 32 aufgeführt.

Der Versuch wurde unter Wiederhol-Bedingungen durchgeführt und dient daher auch zur Bestimmung der Wiederholpräzision. Die Präzision der Bestimmung nimmt wie zu erwarten, mit abnehmender Analytkonzentration ebenfalls ab. Analyten wie Glutamin oder Asparagin, die mit 0,09 % bzw. 0,05 % relativ hohe Konzentrationen aufweisen, haben relativ niedrige Variationskoeffizienten von 1,86 bzw. 1,20 %. Analyten, die in relativ geringer Konzentration vorhanden sind wie Glutaminsäure (0,003 %) oder Glycin (0,001 %) wiesen mit 4,17 bzw. 4,40 %

deutlich höhere Variationskoeffizienten auf.

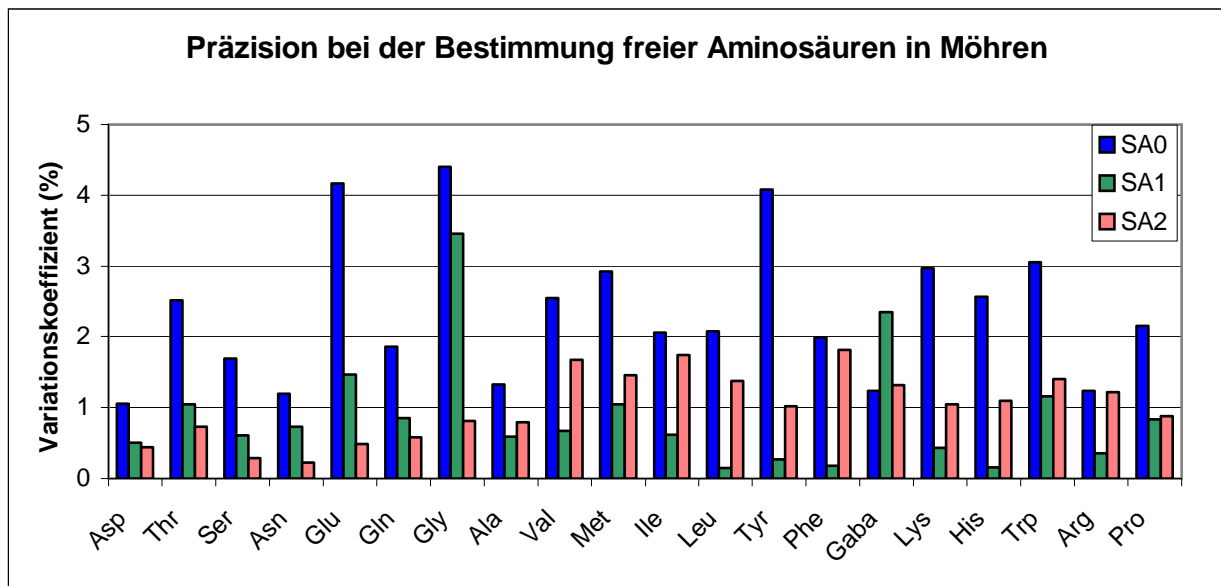


Abbildung 95: Präzision bei der Bestimmung freier Aminosäuren in Möhren

Für Analyten mit Gehalten von 0,1 % sind nach Kromidas Werte von unter 10% akzeptabel, Horwitz ermittelte Werte von 3,79 % für die Wiederholpräzision. Wendet man diese Werte auf Analyten wie Asn (0,09 %) oder Gln (0,05 %) an so ergibt sich eine ausreichende Präzision für die untersuchten Parameter.

Für Analyten mit Gehalten von 0,001 % ermittelte Horwitz Werte von 7,3 % für die Wiederholpräzision. Die für Glu (0,003 %) oder Gly (0,001 %) ermittelten Werte liegen mit 4,17 bzw. 4,4 % ebenfalls unter diesen Werten, dies zeigt auch für diese Parameter mit geringeren Gehalten eine ausreichende Präzision des Verfahrens auf.

Der durchschnittliche V_K lag bei der Untersuchung der nichtdotierten Probe (Niveau 1) bei 2,36 %, bei der Standardaddition 1 (Niveau 2) bei 0,87 %, und bei der Standardaddition 2 (Niveau 3) bei 1,02 %. Der bei der undotierten Probe leicht erhöhte V_K könnte auf Restinhomogenitäten der Matrix zurückzuführen sein. Insgesamt liegen die Werte jedoch deutlich innerhalb der geforderten Bereiche, die Präzision der Untersuchung ist damit als verifiziert anzusehen.

Die Wiederfindungsraten der Standardaddition 1 (Niveau 2) lagen bei 94,39 bis 105,39 %, im Mittel bei 99,66 % und bei der Standardaddition 2 (Niveau 3) bei 91,08 bis 106,69 %, im Mittel bei 98,67 %. Threonin weist mit einem Wert von 106,68 % die höchste Wiederfindungsrate, Tryptophan mit einem Wert von 91,08 % die niedrigste Wiederfindungsrate auf. Die Gehalte von

Thr (0,007 %) und Trp (0,002 %) liegen bereits im ppm- Bereich, für den von der DFG Werte von 70 - 120 % noch als akzeptable Wiederfindungsraten angesehen werden. Die leichte Abnahme der durchschnittlichen Wiederfindungsrate von 99,66 % bei SA1 auf 98,67 % bei SA 2 deutet auf mögliche Umwandlungs- oder Adsorptionseffekte bei den zudotierten Aminosäuren hin.

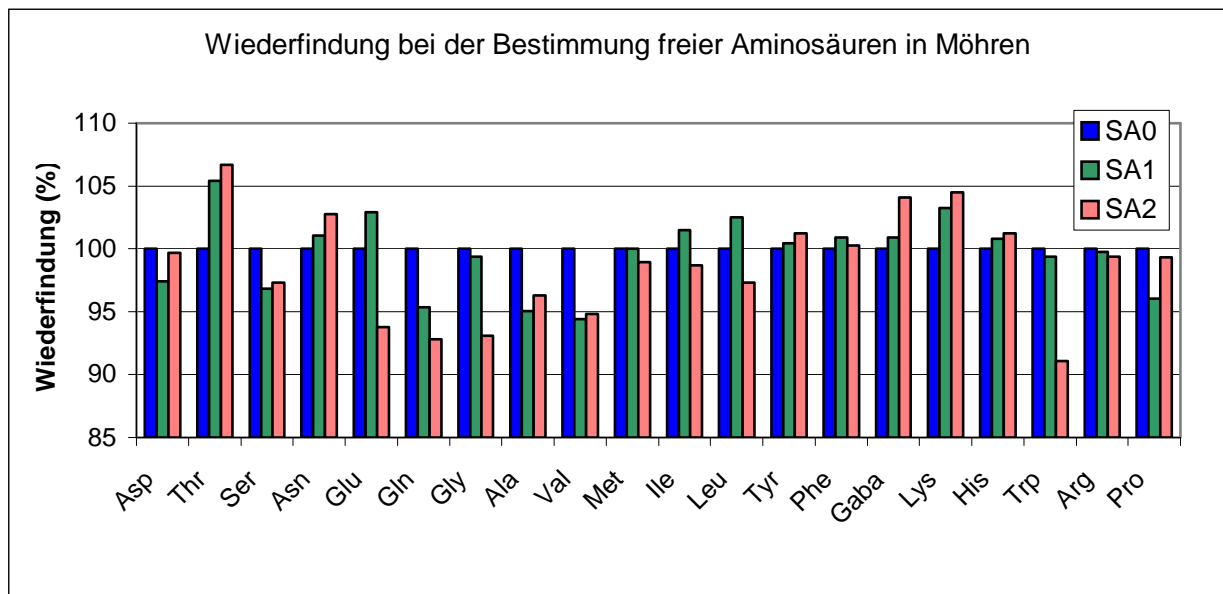


Abbildung 96: Wiederfindung freier Aminosäuren in Möhren

Insgesamt liegen die Werte innerhalb der geforderten Bereiche, die Richtigkeit der Untersuchung ist damit als verifiziert anzusehen.

4.3.4.5.4 Präzision und Richtigkeit der Aminosäurenbestimmung nach Hydrolyse

Durch Voruntersuchungen waren die Konzentrationen der proteinogenen Aminosäuren in der undotierten Probe ermittelt worden. Es handelt sich dabei um die Aminosäuren Asp, Glu, Ser, His, Gly, Thr, Ala, Arg, Tyr, Val, Phe, Ile, Leu, Lys, Pro, Trp, Met und Cys, welche als proteinogene Aminosäuren im Weizen vorkommen. Verfahrensbedingt erfolgt bei der Hydrolyse der Proteine auch eine Hydrolyse der Amide Asparagin und Glutamin. Diese werden daher in Form der entsprechenden Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure erfasst.

Die Konzentrationen der einzelnen Stoffe liegen zwischen ca. 0,2 und 5 %.

Die Messpräzision der Aminosäurenbestimmung wurde geprüft und liegt im geforderten Bereich unter 1 %. Zur Bestimmung der Richtigkeit wurde ein Standardadditionsversuch mit einem Grundniveau und zwei Additionsniveaus mit jeweils sechsfacher Wiederholung durchgeführt.

	Niveau 1 (SA 0)			Niveau 2 (SA1)			Niveau 3 (SA 2)			MW WF	MW V _K
	Gehalt % in FS	SA0 WF	V _K V _K	Zugabe μmol/g FS	SA1 WF	V _K	Zugabe μmol/g FS	SA2 WF	V _K		
Asp	0,80	100,00	1,30	23,48	101,08	0,49	46,95	101,15	0,78	101,12	0,86
Glu	4,88	100,00	0,32	127,44	98,58	0,67	254,88	98,10	0,70	98,34	0,56
Ser	0,75	100,00	1,93	29,74	99,84	1,31	59,47	98,32	0,55	99,08	1,26
His	0,35	100,00	1,50	12,08	101,74	0,91	24,17	99,90	0,55	100,82	0,99
Gly	0,58	100,00	3,98	26,01	105,13	1,60	52,01	101,75	0,62	103,44	2,07
Thr	0,43	100,00	2,13	26,23	100,71	1,13	52,47	99,74	1,45	100,22	1,57
Ala	0,50	100,00	1,18	28,06	99,59	0,71	56,12	101,31	0,52	100,45	0,80
Arg	0,75	100,00	1,31	17,96	98,98	1,02	35,92	97,12	0,45	98,05	0,93
Tyr	0,48	100,00	1,63	13,80	99,97	1,45	27,60	97,29	1,39	98,63	1,49
Val	0,64	100,00	0,36	10,67	100,04	0,78	21,34	100,37	0,38	100,21	0,51
Phe	0,75	100,00	0,47	18,92	98,27	0,31	37,84	98,64	0,43	98,45	0,40
Ile	0,55	100,00	0,87	23,82	99,19	0,56	47,64	99,29	0,46	99,24	0,63
Leu	1,04	100,00	0,56	23,82	99,80	0,85	47,64	101,08	0,52	100,44	0,64
Lys	0,39	100,00	4,62	13,68	106,10	2,52	27,35	98,99	1,09	102,55	2,74
Pro	1,54	100,00	1,91	54,29	99,12	0,82	108,57	98,33	1,18	98,72	1,31
Trp	0,16	100,00	2,26	10,00	91,84	1,50	20,00	87,92	0,77	89,88	1,51
Met	0,21	100,00	2,05	14,99	99,79	1,71	29,99	99,01	2,24	99,40	2,00
Cys	0,29	100,00	1,22	14,37	94,86	3,05	28,73	92,25	2,74	93,56	2,34
MW WF		100,00			99,70			98,36		99,03	
MW VK			1,64			1,19			0,93		1,26
Min			0,32		98,58	0,31		87,92	0,38		
Max			4,62		106,10	3,05		101,75	2,74		

Tabelle 33: Daten zur Präzision und Richtigkeit der Aminosäurenbestimmung nach Hydrolyse (n=6)

Es wurden drei Konzentrationsniveaus untersucht. Das erste Niveau entspricht dem natürlichen Gehalt der Probe an proteinogenen Aminosäuren. Das zweite Niveau wurde durch Standardaddition in etwa der Höhe des natürlichen Gehaltes erhalten, das dritte Niveau durch Zugabe etwa des doppelten natürlichen Gehaltes. Die jeweils ermittelten bzw. zugegebenen Gehalte und Mengen sind in der Tabelle 33 aufgeführt.

Die Präzision der Bestimmung nimmt, wie zu erwarten, mit abnehmender Analytkonzentration ebenfalls ab. Analyten wie Glutaminsäure, Prolin und Leucin liegen mit Gehalten über 1 % im geforderten Präzisionsbereich unter 5 % (Pharma) bzw. 2,68 % (Horwitz).

Für die übrigen Analyten mit Gehalten 0,16 - 0,8 % liegen die Wiederholpräzisionskoeffizienten bei den Standardadditionsuntersuchungen mit Werten von 0,31 bis 3,05 % ebenfalls unter den geforderten Werten von 10 % (Pharma) bzw. im Bereich der von Horwitz genannten Werte 3,79 %.

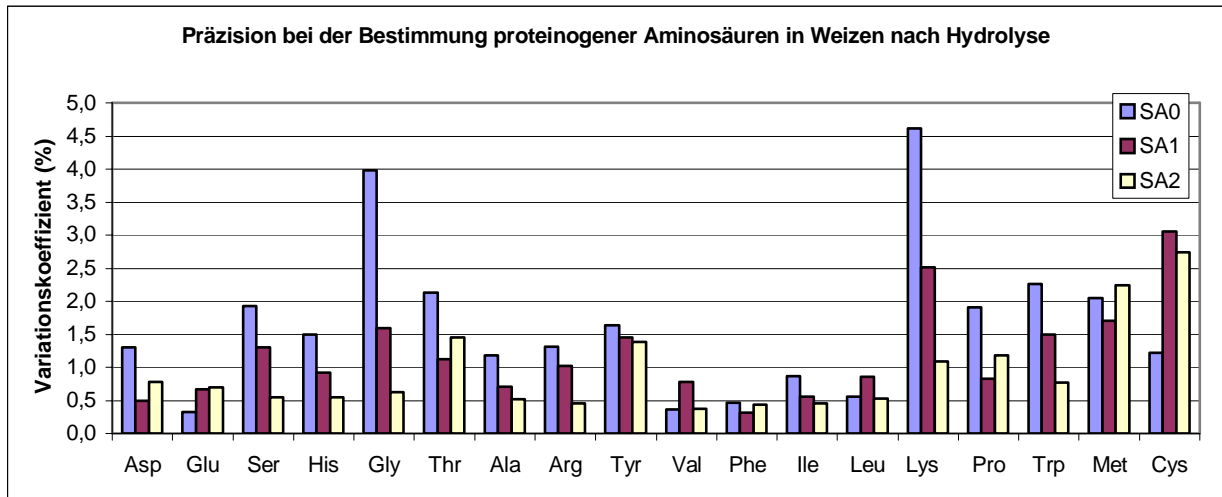


Abbildung 97: Präzision bei der Bestimmung proteinogener Aminosäuren in Weizen nach Hydrolyse

Wie auch bei der Untersuchung auf physiologische Aminosäuren weist die undotierte Probe gegenüber den aufdotierten Proben leicht erhöhte Variationskoeffizienten der Wiederholpräzision auf. Für Glycin wurden 3,98 % gegenüber 1,60 % und 2,07 % und für Lysin 4,62 % gegenüber 2,52 % und 1,09 % gefunden. Dieser Befund wäre durch mögliche leichte Probeninhomogenitäten zu erklären.

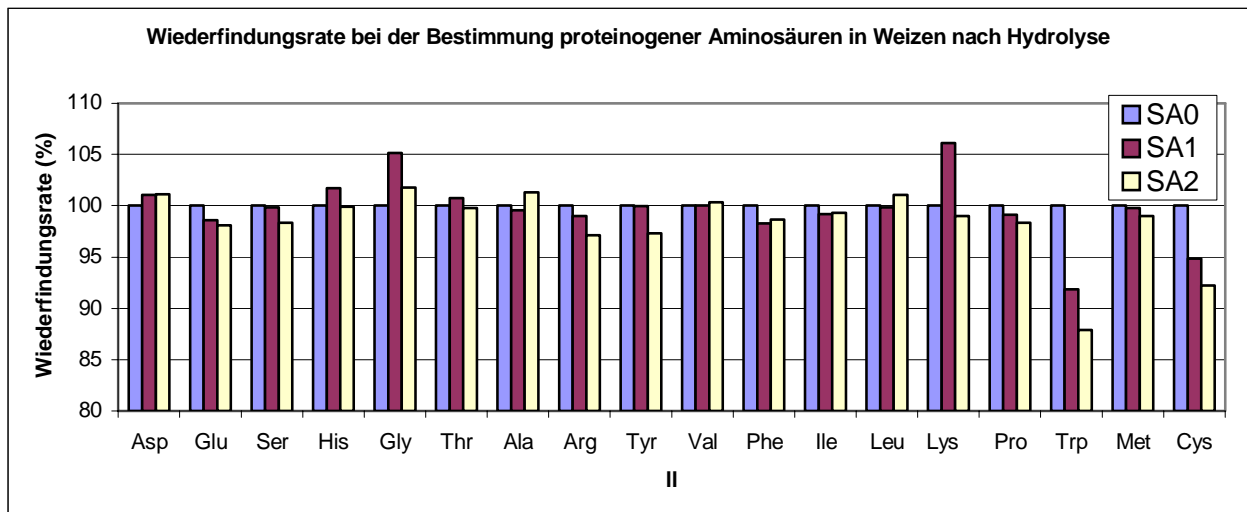
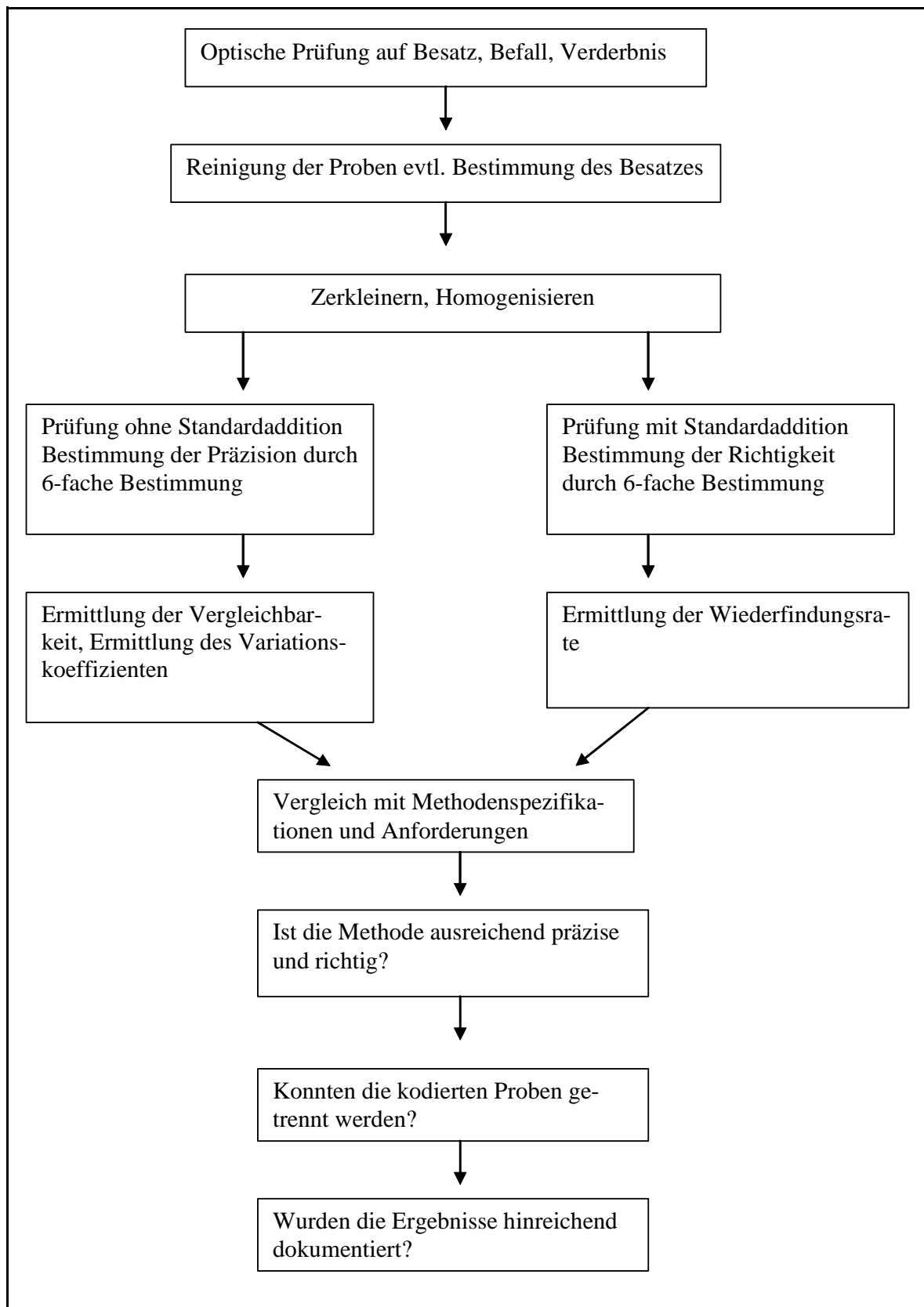


Abbildung 98: Wiederfindungsrate bei der Bestimmung proteinogener Aminosäuren in Weizen nach Hydrolyse

Die Abbildung 98 zeigt eine graphische Darstellung der Ermittlung der Richtigkeit des Verfahrens durch Bestimmung der Wiederfindungsraten für die proteinogenen Aminosäuren nach Hydrolyse. Tryptophan und Cystein zeigen mit Werten von ca. 92 und 88 % bzw. 95 und 92 % aufgrund ihrer chemischen Instabilität deutlich erkennbar Werte unter 100 %. Glycin und Lysin zeigen im ersten Additionsniveau leicht erhöhte Wiederfindungsraten von ca. 105 bzw. 106 %. Möglicherweise liegen hier geringe matrixbedingte chromatografische Störungen vor.

Die zur Überprüfung der Analytik maßgeblichen Standardadditionsuntersuchungen weisen insgesamt Werte unterhalb der geforderten Werte auf: Die Präzision und Richtigkeit der Einzelprüfmethode „Aminosäurenbestimmung in Weizen nach Hydrolyse“ innerhalb des Gesamtverfahrens zur Bestimmung des physiologischen Aminosäurenstatus ist damit als verifiziert anzusehen.

4.3.4.6 Fließschema Validierung des Gesamtverfahrens am Beispiel Weizen

**Abbildung 99:** Fließschema Validierung des Gesamtverfahrens am Beispiel Weizen

4.3.4.7 Übersicht zur Validierung des Gesamtverfahrens

Der Nachweis der Eignung der Einzelprüfmethoden erfolgte durch Verifizierung von Präzision und Richtigkeit. Zum Nachweis der Eignung des Gesamtverfahrens wird nachfolgend die Differenzierung der Zuordnung dargestellt und diskutiert.

Die Eignung der ausgewählten und ermittelten Parameter wurde durch die Untersuchung codierter Proben geprüft. Nachfolgend sind die Prüfparameter angegeben, mithilfe derer die Differenzierung und Zuordnung der Proben erfolgte.

Probenart	Einzelprüfparameter	Differenzierung	Richtigkeit
1. Weizen	Rohprotein-N	geeignet	geeignet
	Prolin-Gehalt	geeignet	geeignet
	Glutaminsäure-Gehalt	geeignet	geeignet
2. Möhren Uni Kassel	Rohprotein-N	geeignet	geeignet
	Nitrat	geeignet	geeignet
	Summe freier Aminosäuren	geeignet	geeignet
	Amidierungsgrad Asparaginsäure	geeignet	geeignet
3. Möhren FIBL	Rohprotein-N	z.T. geeignet	z.T. geeignet
	Nitrat	nicht geeignet	nicht geeignet
	Summe freier Aminosäuren	z.T. geeignet	z.T. geeignet
	Amidierungsgrad Asparaginsäure	z.T. geeignet	z.T. geeignet

Tabelle 34: Daten zur Eignung des Gesamtverfahrens zur Differenzierung und Identifizierung von Proben verschiedener Kulturverfahren (Diese Parameter wurden jeweils für die Ergebnisangabe vor der Probendecodierung zur Differenzierung und Identifizierung angegeben).

4.3.4.7.1 Differenzierung der Weizenproben

Ergebnis der Varianzanalyse mit nachfolgendem Tukey's multiplem Vergleichstest Weizen Herbst 2002 (N=Kontrolle; M=Mineraldüng.; D=Biodyn.; O=Biol.-Org.; K=Konv.)

Rohprotein-N	N (I)	O (II)	K (III)	M (IV)	D (V)
N		***	***	***	***
O			***	***	*
K				*	***
M					***

Prolin	N (I)	O (II)	K (III)	M (IV)	D (V)
N		***	***	***	***
O			**	**	n.s.
K				n.s.	***
M					***

Glutaminsäure	N (I)	O (II)	K (III)	M (IV)	D (V)
N		***	***	***	***
O			***	**	n.s.
K				n.s.	**
M					*

Ergebnis der Varianzanalyse mit nachfolgendem Tukey's multiplem Vergleichstest Weizen Frühjahr 2003

Rohprotein-N	N (A)	M (B)	D (C)	O (D)	K (E)
N		***	***	***	***
M			***	***	*
D				*	***
O					***

Prolin	N (A)	M (B)	D (C)	O (D)	K (E)
N		***	***	***	***
M			***	**	*
D				*	***
O					**

Glutaminsäure	N (A)	M (B)	D (C)	O (D)	K (E)
N		***	***	***	***
M			*	**	n.s.
D				n.s.	**
O					***

Ergebnis der Varianzanalyse mit nachfolgendem Tukey's multiplem Vergleichstest Weizen Herbst 2003

Rohprotein-N	K (A)	O (B)	D (C)	M (D)	N (E)
K		***	***	*	***
O			n.s.	***	n.s.
D				***	n.s.
M					***

Prolin	K (A)	O (B)	D (C)	M (D)	N (E)
K		***	***	n.s.	***
O			n.s.	**	n.s.
D				***	n.s.
M					**

Glutaminsäure	K (A)	O (B)	D (C)	M (D)	N (E)
K		***	***	n.s.	***
O			n.s.	***	n.s.
D				***	n.s.
M					**

4.3.4.7.2 Differenzierung der Möhrenproben Uni Kassel

Ergebnis des ungepaarten t-Tests für Möhren Universität Kassel Herbst 2002 (M33/66).

Protein-N	M33	M66 (+N)
M33		***

Nitrat	M33	M66 (+N)
M33		***

Amidierungsgrad	M33	M66 (+N)
Asparaginsäure		
M33		***

Summe freier Aminosäuren	M33	M66 (+N)
M33		***

Ergebnis des ungepaarten t-Tests für Möhren Uni Kassel Winter 2002 (M22/55).

Protein-N	M22	M55 (+N)
M22		***

Nitrat	M22	M55 (+N)
M22		***

Amidierungsgrad	M22	M55 (+N)
Asparaginsäure		
M22		***

Summe freier Aminosäuren	M22	M55 (+N)
M22		***

Ergebnis des ungepaarten t-Tests für Möhren Uni Kassel Frühjahr 2003 (M11/44).

Protein-N	M11	M44 (+N)
M11		***

Nitrat	M11	M44 (+N)
M11		***

Amidierungsgrad	M11	M44 (+N)
Asparaginsäure		
M11		***

Summe freier Aminosäuren	M11	M44 (+N)
M11		***

Ergebnis des ungepaarten t-Tests für Rohprotein-N Uni Kassel Herbst 2003 (M77/88)

Protein-N	M77 (+N)	M88
M77		***

Nitrat	M77 (+N)	M88
M77		***

Amidierungsgrad	M77 (+N)	M88
Asparaginsäure		
M77		***

Summe freier Aminosäuren	M77 (+N)	M88
M77		***

4.3.4.7.3 Differenzierung der Möhrenproben FIBL

Ergebnis der Varianzanalyse mit nachfolgendem Tukey's multiplem Vergleichstest für Möhren FIBL Herbst 2002

Rohprotein-N	E (Bolero F1)	F (Nipomo F1)	G (Samson OP)
E		***	*
F			***

Nitrat	E (Bolero F1)	F (Nipomo F1)	G (Samson OP)
E		**	***
F			***

Summe freier Aminosäuren	E (Bolero F1)	F (Nipomo F1)	G (Samson OP)
E		***	***
F			***

Amidierungsgrad	E (Bolero F1)	F (Nipomo F1)	G (Samson OP)
Asparaginsäure			
E		n.s.	***
F			***

Ergebnis der Varianzanalyse mit nachfolgendem Tukey's multiplem Vergleichstest für Rohprotein-N Möhren FIBL Frühjahr 2003

Rohprotein-N	H (Samson OP)	I (Nipomo F1)	K (Bolero F1)	L (Tiptop OP)
H		***	***	***
I			***	***
K				***

Nitrat	H (Samson OP)	I (Nipomo F1)	K (Bolero F1)	L (Tiptop OP)
H		***	***	***
I			***	***
K				***

Summe freier Aminosäuren	H (Samson OP)	I (Nipomo F1)	K (Bolero F1)	L (Tiptop OP)
H		***	***	***
I			n.s.	***
K				***

Amidierungsgrad	H (Samson OP)	I (Nipomo F1)	K (Bolero F1)	L (Tiptop OP)
Asparaginsäure				
H		***	***	***
I			***	***
K				***

Ergebnis der Varianzanalyse mit nachfolgendem Tukey's multiplen Vergleichstest für Rohprotein-N Möhren FIBL Herbst 2003

Rohprotein-N	A (Tiptop OP)	B (Bolero F1)	C (Nipomo F1)	D (Samson OP)
A		***	***	***
B			***	***
C				n.s.

Nitrat	A (Tiptop OP)	B (Bolero F1)	C (Nipomo F1)	D (Samson OP)
A		***	n.s.	***
B			***	***
C				**

Summe freier Aminosäuren	A (Tiptop OP)	B (Bolero F1)	C (Nipomo F1)	D (Samson OP)
A		***	***	n.s.
B			n.s.	***
C				***

Amidierungsgrad Asparaginsäure	A (Tiptop OP)	B (Bolero F1)	C (Nipomo F1)	D (Samson OP)
A		***	***	***
B			***	***
C				***

Die zur Trennung bei Weizen ausgewählten Parameter Rohproteingehalt, Glutaminsäure und Prolin weisen alle Signifikanz bezüglich der Trennung der ökologischen von den nichtökologischen Verfahren auf. Die Trennung der ökologischen und konventionellen Verfahren untereinander ist teilweise auf einem 5 % Niveau signifikant, teilweise nicht signifikant.

Die höchste Trennschärfe weist jeweils die Bestimmung des Gesamtprotein-N auf, dieses Verfahren hatte sich bereits bei den Validierungsuntersuchungen der Einzelprüfmethoden als das Verfahren mit der höchsten Präzision und Richtigkeit erwiesen.

Die zur Trennung der Möhrenproben des Düngungsversuchs (Uni Kassel) ausgewählten Parameter Rohproteingehalt, Nitrat, Amidierungsgrad der Asparaginsäure und Summe freier Aminosäuren weisen alle bei allen Probenserien hohe Signifikanz auf.

Im FIBL-Sortenversuch hybride/samenfeste Sorten waren zur Trennung der Möhrenproben die

Parameter Rohproteingehalt, Nitrat, Amidierungsgrad der Asparaginsäure und Summe freier Aminosäuren ausgewählt worden. Sie weisen nicht bei allen Probenserien Signifikanz auf.

Die Identifizierung der Proben wird im nächsten Abschnitt bei der Darstellung der Ergebnisse diskutiert.

4.3.5 Ergebnisse der Vergleichsversuche

4.3.5.1 Weizen DOK-Versuch

Es wurde je eine Probenserie der Ernte 2002 im Herbst 2002 und Frühjahr 2003, sowie eine Probenserie der Ernte 2003 im Herbst 2003 untersucht.

4.3.5.1.1 Probenmaterial

Für die im Berichtszeitraum durchgeführte erste Hauptuntersuchungsserie standen folgende codierte Proben zur Verfügung:

Probenserie 2002a: I-V (21.10.02): 5 Varianten mit je 4 Feldwiederholungen,

Probenserie 2002b: A-E (24.2.03): 5 Varianten mit je 4 Feldwiederholungen,

Probenserie 2003: A-E (15.9.03): 5 Varianten mit je 4 Feldwiederholungen.

Jede Probenserie bestand aus jeweils 2 biologischen Varianten (biologisch-dynamisch und biologisch-organisch; D, O), 2 konventionellen Varianten (Stallmist und Mineraldünger sowie reine Mineraldüngung; K, M), sowie 1 Kontrolle (ungedüngt; N). Es wurden Mischproben der 4 Feldwiederholungen untersucht.

4.3.5.1.2 Gesamtprotein

DOK-Weizen

Das Untersuchungsverfahren konnte bei beiden Probenserien DOK-Weizen 2002 im Rohproteinstickstoffgehalt 3 Niveaus differenzieren. Bei der Probenserie 2003 wurden 2 Niveaus differenziert. Das obere Niveau (gelb) wurde zutreffend in allen untersuchten Proben den konventionellen Verfahren (M, K) zugeordnet.

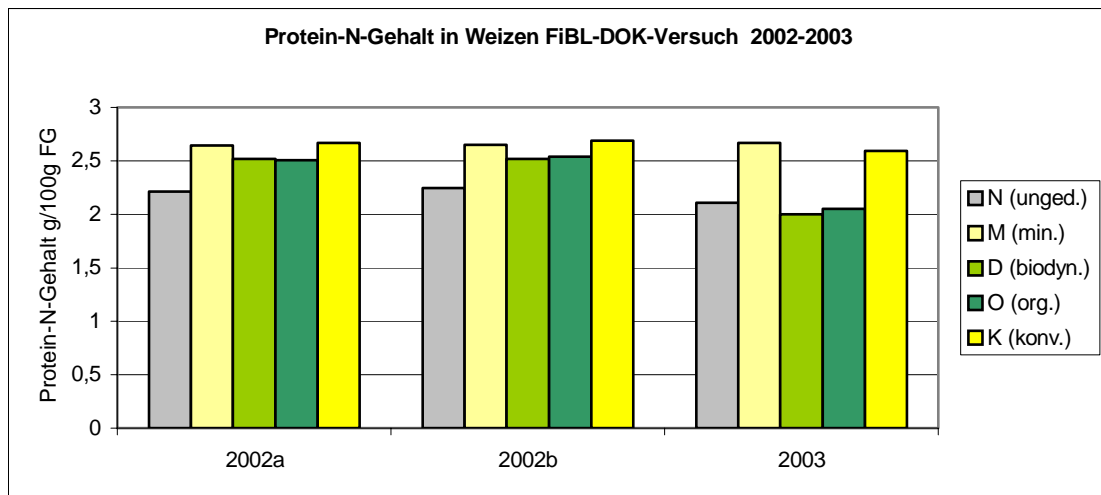


Abbildung 100: Protein-N-Gehalt in Weizen FiBL-DOK-Versuch 2002-2003

In beiden Probenserien 2002 wurden die ökologischen Varianten (grün) auf einem mittleren Niveau gegenüber der Kontrolle (grau) abgetrennt und richtig zugeordnet. In der Probenserie 2003 lagen die ökologischen Varianten (grün) und die Kontrolle (grau) auf einem Niveau. Hier erfolgte eine korrekte Gruppierung der Varianten N, D, O als ökologische bzw. nichtgedüngte Varianten (2002a/2002b: N O, D M, K; $p < 0,001$; 2003: N, O, D M, K; $p < 0,001$). Die Ergebnisse zeigen höhere Proteingehalte der Proben aus konventionellen Verfahren (M, K) gegenüber denjenigen aus ökologischen Verfahren bzw. der ungedüngten Kontrolle. Dies zeigt deutlich signifikante Unterschiede im Stickstoffmetabolismus der in unterschiedlichen Landbausystemen angebauten Weizenpflanzen. Während der Reifung der Weizenkörner verändert sich sowohl deren Proteinzusammensetzung als auch deren absoluter Proteingehalt (Przemeck 1971). Mit zunehmender Reife ergibt sich eine Anreicherung von Stärke im Weizenkorn und damit eine relative Verringerung des Proteingehaltes. Die höheren Proteingehalte der konventionellen Kulturvarianten lassen sich in diesem Sinne somit auch als eine relativ zu den ökologischen Varianten verzögerte Ausreifung interpretieren. Dies steht in plausiblen Bezug zur Projekthypothese.

4.3.5.1.3 Glutamin/-säure und Prolin

Das Untersuchungsverfahren konnte bei beiden Probenserien DOK-Weizen 2002 bei den Massenaminosäuren Glutaminsäure (Glu) und Prolin (Pro) in 3 Niveaus differenzieren. Bei der Probenserie 2003 wurden 2 Niveaus differenziert. Das obere Niveau (gelb) wurde in allen untersuchten Proben zutreffend den konventionellen Verfahren (M,K) zugeordnet. In beiden Probenserien 2002 wurden die ökologischen Varianten (grün) auf einem mittleren Niveau

gegenüber der Kontrolle (grau) abgetrennt und richtig zugeordnet. In der Probenserie 2003 lagen die ökologischen Varianten (grün) und die Kontrolle (grau) auf einem Niveau; sie wurden korrekt der Gruppierung der ökologischen bzw. nichtgedüngten Verfahren zugeordnet.

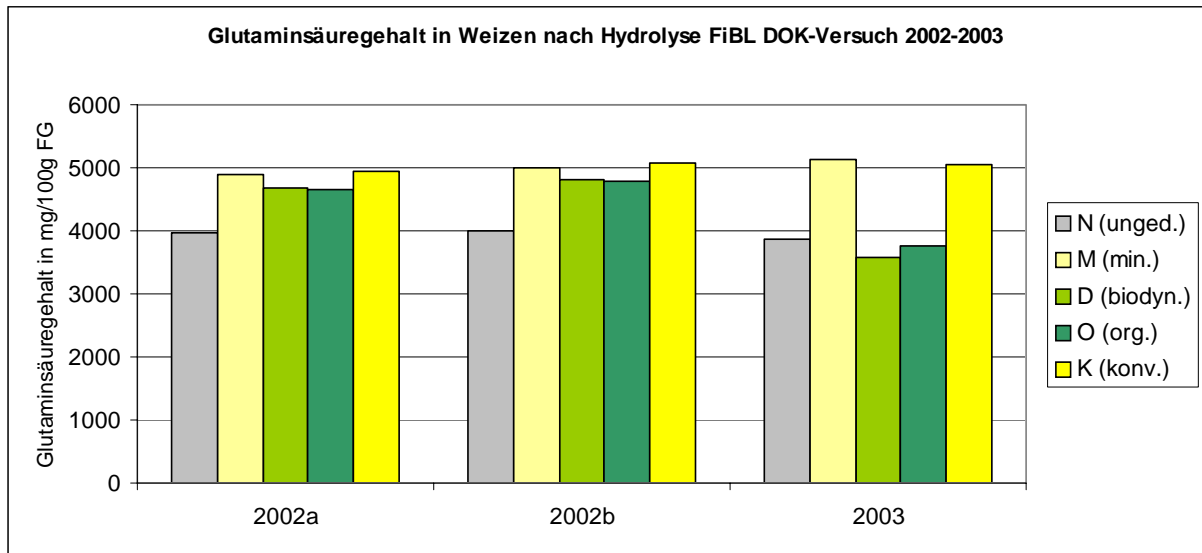


Abbildung 101: Glutaminsäuregehalt in Weizen nach Hydrolyse FiBL-DOK-Versuch 2002-2003

Die nach konventionellen Verfahren (M, K) angebauten Proben weisen gegenüber den nach ökologischen Verfahren angebauten, bzw. der ungedüngten Kontrolle, höhere Gehalte der Massenaminosäuren Glu und Pro auf. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Daten der Gesamtproteinbestimmung und steht in plausiblen Bezug zur Projekthypothese.

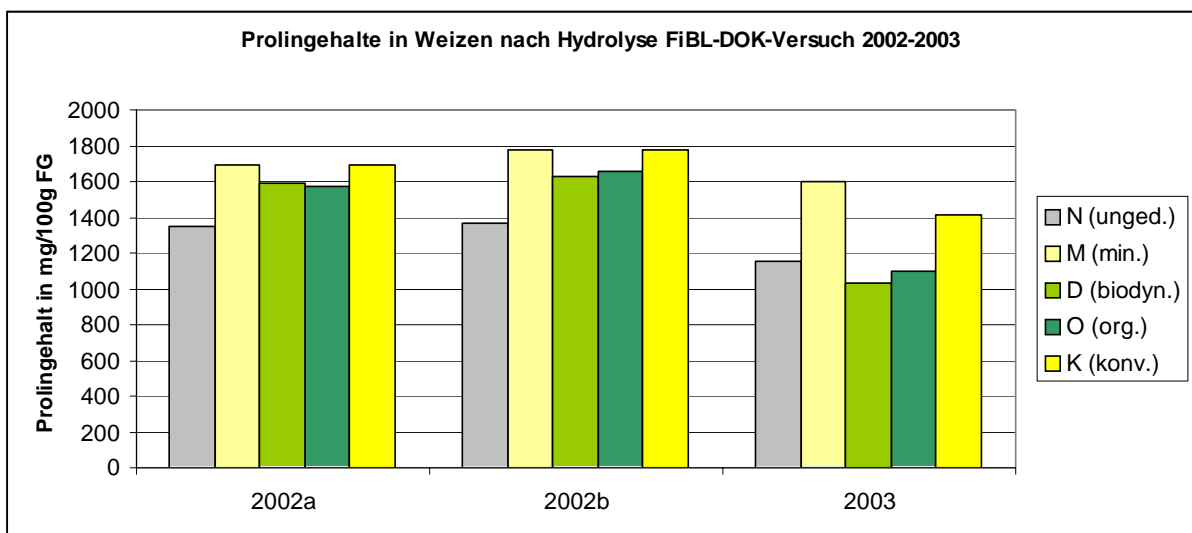


Abbildung 102: Prolingehalte in Weizen nach Hydrolyse FiBL-DOK-Versuch 2002-2003

4.3.5.2 Möhren Universität Kassel

Es wurde je eine Probenserie der Ernte 2002 im Herbst 2002, im Winter 2002, im Frühjahr 2003, sowie eine Probenserie der Ernte 2003 im Herbst 2003 untersucht.

4.3.5.2.1 Probenmaterial

Probenserie 2002a (28.10.02):	2 Varianten als Bulkproben (M33/M66),
Probenserie 2002b (6.12.02):	2 Varianten als Bulkproben (M22/M55),
Probenserie 2002c (24.2.03):	2 Varianten als Bulkproben (M11/M44),
Probenserie 2003 (29.9.03)	2 Varianten als Bulkproben (M77/M88),

Jede Probenserie bestand aus jeweils 2 Varianten, 1 Variante ungedüngt, 1 Variante mit 150 kg N/ha gedüngt.

4.3.5.2.2 Gesamtprotein

Die Probenserien M33/M66, M22/M55, M11/M44 sowie die Probenserie M77/M88 ließen sich jeweils in zwei Niveaus trennen. Das höhere Niveau jeder Probenserie (rot) wurde jeweils korrekt als stickstoffgedüngte Variante identifiziert. Die Trennung in jeder Probenserie war hochsignifikant (***). Es zeigt sich bei mit 150 kgN/ha gedüngten Möhren gegenüber den nicht gedüngten deutlich ein signifikant erhöhter Gesamtproteingehalt. Die Stickstoffdüngung des Bodens führt somit zu einem signifikant veränderten Stickstoffmetabolismus der Pflanze. Das Ergebnis steht in plausiblen Bezug zur Projekthypothese.

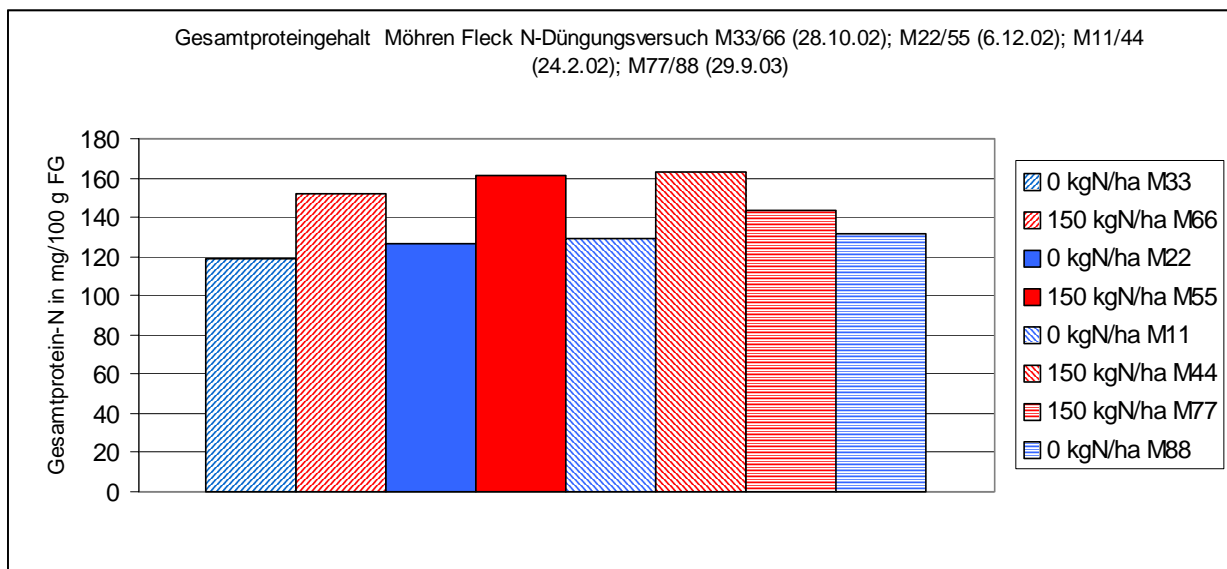


Abbildung 103: Gesamtproteingehalt Möhren Uni Kassel 2002-2003

4.3.5.2.3 Nitrat

Die Probenserien M33/M66, M22/M55, M11/M44 sowie die Probenserie M77/M88 ließen sich jeweils in zwei Niveaus trennen. Das höhere Niveau jeder Probenserie (rot) wurde jeweils korrekt als stickstoffgedüngte Variante identifiziert. Die durch die N-Düngung erhöhte Verfügbarkeit von N für die Pflanze führt auch für den Nitratgehalt in der geernteten Pflanze zu erhöhten Werten.

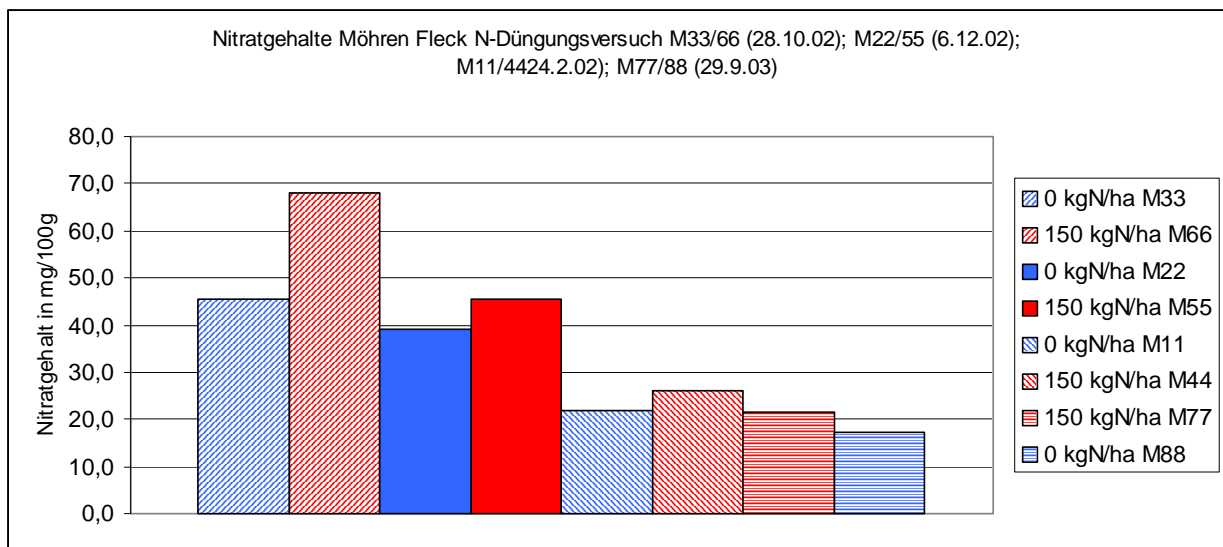


Abbildung 104: Nitratgehalte Möhren Uni Kassel 2002-2003

Zusätzlich zeigt sich deutlich eine Abnahme des Nitratgehaltes mit zunehmender Lagerdauer von der Untersuchung der Proben M33/66 am 28.10.02 über die Proben M22/55 am 6.12.02 bis zu den Proben M11/44 am 24.12.02. Auch nach der Ernte der Möhren laufen die biochemischen Reaktionen der Nitratassimilation im Stoffwechsel der Möhre weiter ab. Der abnehmende Nitratgehalt deutet darauf hin, dass das Nitrat weiterhin mit Hilfe entsprechender Enzyme zu Ammonium bzw. Aminosäuren umgesetzt wird.

Die Stickstoffdüngung ließ sich in einem über die Lagerdauer abnehmenden, zu jedem Untersuchungszeitpunkt innerhalb einer Probenserie signifikant unterschiedlichen Nitratgehalt nachweisen. Im Rahmen des gesamten N-Metabolismus der Pflanze entspricht dies der in Abschnitt 4.3.1.2 in Gleichung 1 angeführten Reduktion des Stickstoffs von Nitrat (Oxidationsstufe N: +V) zu Ammonium bzw. Aminosäuren (Oxidationsstufe N: -III). Sowohl die gefundene Abnahme des Nitratgehaltes mit zunehmender Lagerdauer als auch der signifikante Unterschied der Düngungsvarianten innerhalb jeder Probenserie hat damit einen plausiblen Bezug zum N-Metabolismus der Pflanze.

Nach den Ergebnissen der Nitratuntersuchung wurden die Proben M33, M22, M11 und M88 korrekt dem Kulturverfahren 0 kg N/ha, die Proben M66, M55, M44 und M77 korrekt dem Kulturverfahren 150 kg N /ha zugeordnet. Die Trennung war innerhalb jeder Probenserie hochsignifikant.

4.3.5.2.4 Summe freier Aminosäuren/Amidierungsgrad Asparaginsäure

Die Probenserie M33/22/11 bzw. M66/55/44 wurde in der Summe freier Aminosäuren in zwei Niveaus von ca. 23,8-27,3 $\mu\text{mol/g}$ FG (0kg N/ha) bzw. 35,7-39,1 $\mu\text{mol/g}$ FG (150 kg N/ha) getrennt und korrekt zugeordnet. Bei den Proben der Ernte 2003 (M77/88) war sowohl die Differenz zwischen den Proben als auch das Gesamtniveau niedriger. Alle Proben ließen sich durch Beurteilung nach der Summe der freien Aminosäuren signifikant trennen und korrekt zuordnen.

Auch der Quotient Asparagin / Asparaginsäure (für die Vergleichbarkeit in der Darstellung mit dem Faktor 40 multipliziert) zeigt eine vergleichbare Differenzierung. Hier lag das Gesamtniveau ähnlich der Aminosäurensomme bei den Proben des Jahres 2003 niedriger, die Differenz zwischen den Düngungsvarianten lag jedoch etwa gleich hoch. Somit zeigte sich der Amidierungsgrad der Asparaginsäure als weniger von den von Jahr zu Jahr auftretenden vermutlich klimatischen Schwankungen abhängig als die Gesamtsumme der freien Aminosäuren. Auch mithilfe des Amidierungsgrades der Asparaginsäure konnten die Proben signifikant getrennt und korrekt zugeordnet werden.

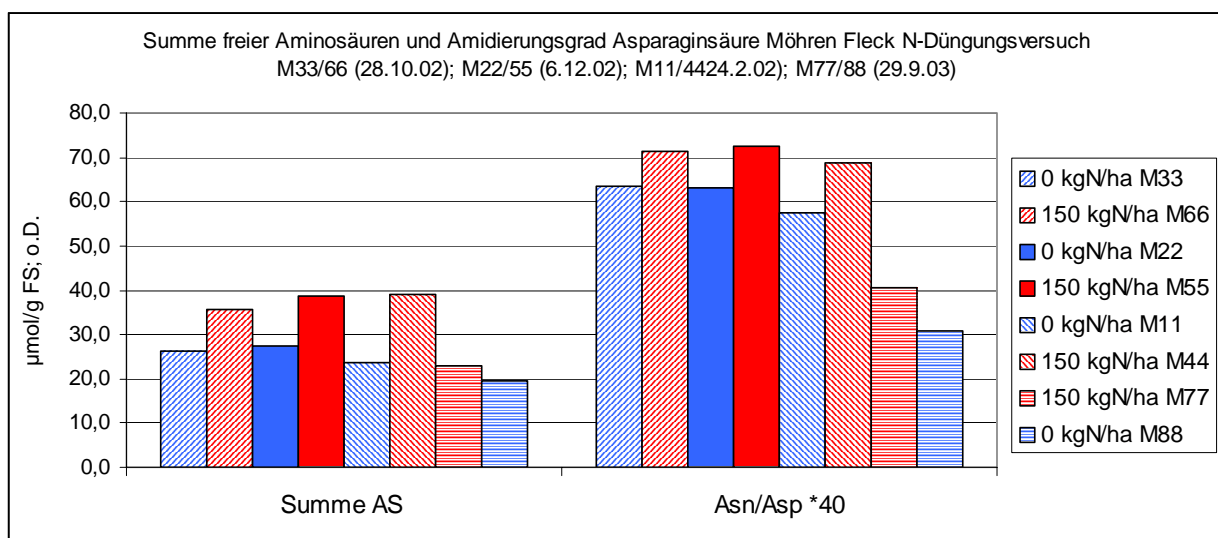


Abbildung 105: Summe freier Aminosäuren und Amidierungsgrad Möhren Uni Kassel 2002-2003

Die Amidierung der Asparaginsäure ist eine biochemische Reaktion der Pflanze zur Umsetzung und

Bindung überschüssigen Ammoniums, welches in zu hohen Konzentrationen für die Pflanze toxisch sein kann. Höhere Gehalte von Asparagin im Verhältnis zu Asparaginsäure (Quotient Asparagin / Asparaginsäure) deuten daher auf häufigere Zustände mit höheren Ammoniumkonzentrationen hin, bei denen die Pflanze diese Amidierungsreaktion aktiviert.

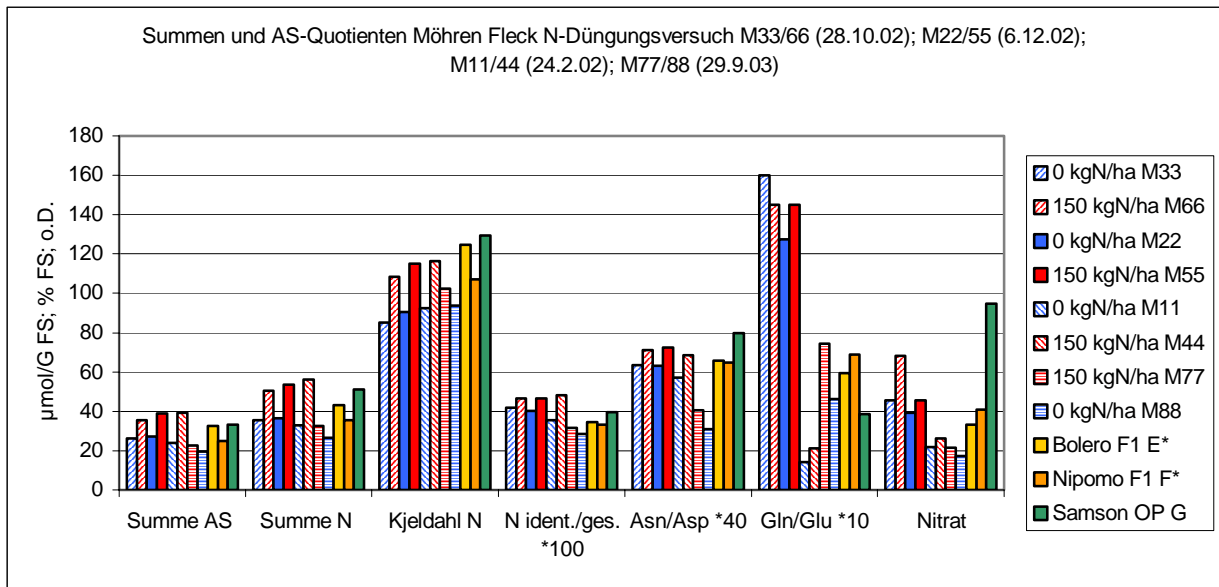


Abbildung 106: Summen und AS_Quotienten Möhren N-Düngungsversuch Uni Kassel 2002-2003

In der Abbildung 106 sind für die Proben des Düngungsversuches Uni Kassel verschiedene Summehalte und Gehalte bzw. Quotienten von Stoffen des N-Metabolismus der Möhre dargestellt. Zusätzlich zu den bereits diskutierten Parametern Gesamtsummengehalt freier Aminosäuren, Gesamtprotein-N-Gehalt (Kjeldahl), Amidierungsgrad Asparaginsäure und Nitratgehalt sind im Überblick der N-Gehalt der Summe freier Aminosäuren (Summe N), der Quotient des in freien Aminosäuren identifizierten N zum Gesamtprotein-N und der Amidierungsgrad Glutaminsäure dargestellt. Der Summengehalt des in den freien Aminosäuren gebundenen N unterscheidet sich vom Summengehalt der freien Aminosäuren dadurch, dass hier der von 1-4 N-Atomen je Molekül Aminosäure variierende N-Gehalt der erfassten Aminosäuren berücksichtigt wird. Durch diese Berücksichtigung des N-Gehaltes der einzelnen Aminosäuren ergibt sich u.a. eine deutlichere Trennung der Proben M55 und M44 gegenüber der reinen Aminosäurensomme.

Der Quotient $N \text{ ident.} / N \text{ ges.}$ gibt den Anteil des in freien Aminosäuren gebunden identifizierten Stickstoffs gegenüber dem mittels Kjeldahl bestimmten, als Gesamtprotein-N gebundenen Stickstoffs an. Es zeigt sich während der Lagerungsdauer der gedüngten Proben M 66/55/44 ein

konstanter Quotient während bei den nichtgedüngten Proben eine Abnahme des in freien Aminosäuren gebundenen N während der Lagerdauer stattfindet.

Im Rahmen der Projekthypothese entspricht dies dem in Abschnitt 4.3.1.2 in Gleichung 3 angeführten Umsetzung freier Aminosäuren zu Protein.

Während durch die Abnahmen des Quotienten $N_{\text{ident.}}/N_{\text{gesamt}}$ bei der ungedüngten Variante eine deutliche Umsetzung im Sinne der Gleichung 3 gezeigt werden kann, ist dies bei der gedüngten Variante nicht der Fall. Es zeigen sich also auch im Lagerversuch deutliche Unterschiede, die auf eine höhere Organisationsleistung der ungedüngten Variante hinweisen.

4.3.5.3 Möhren FIBL

Es wurde je eine Probenserie der Ernte 2002 im Herbst 2002 und Frühjahr 2003, sowie eine Probenserie der Ernte 2003 im Herbst 2003 untersucht.

4.3.5.3.1 Probenmaterial

- Probenserie E, F, G (11.11.02): 3 Varianten als Bulkproben:
2 Varianten Hybride (Nippon, Bolero)
1 Variante Populationssorte (Samson)
- Probenserie H, I, K, L (10.3.03): 4 Varianten als Bulkproben:
2 Varianten Hybride (Nippon, Bolero)
2 Varianten Populationssorte (Samson, Tiptop)
- Probenserie A, B, C, D (27.10.03): 4 Varianten als Bulkproben:
2 Varianten Hybride (Nippon, Bolero)
2 Varianten Populationssorte (Samson, Tiptop)

4.3.5.3.2 Gesamtprotein

Die Probenserie FIBL E, F, G ließ sich im Rohproteinstickstoffgehalt in 2 Niveaus differenzieren. Das untere Niveau weist eine Probe mit ca. 0,15 g/100g FG (F) auf. Das obere Niveau weist zwei Proben mit ca 0,17 g/100g FG bzw. ca. 0,18g/100g FG auf (E, G). Eine Zuordnung konnte bei dieser Probenserie nicht vorgenommen werden, da zum Untersuchungszeitpunkt noch keine

Erfahrung mit hybriden/samenfesten Sorten existierte.

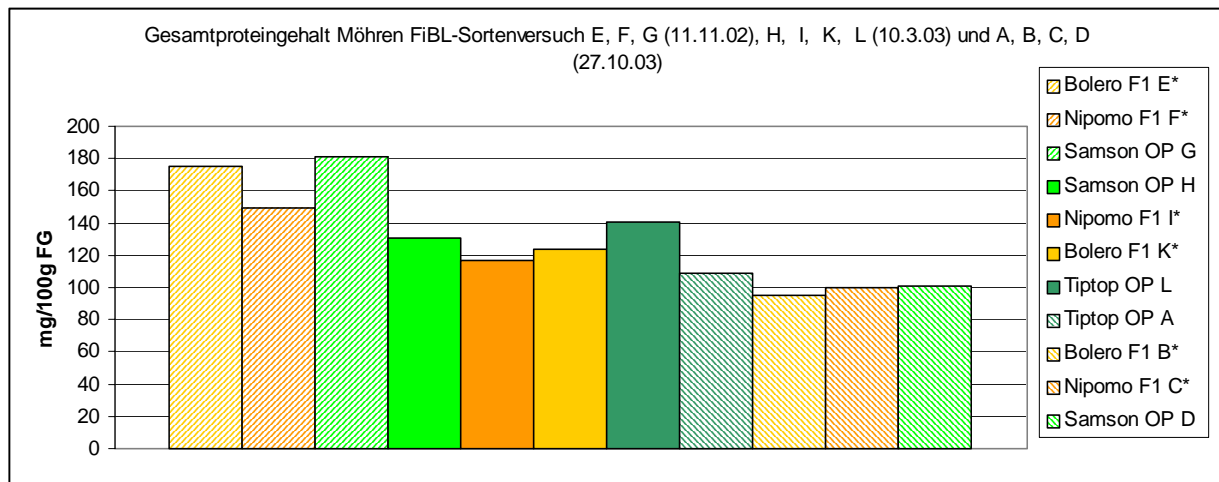


Abbildung 107: Gesamtproteingehalt Möhren FiBL-Sortenversuch 2002-2003

Die Probenserie H, I, K, L zeigte eine deutliche Differenzierung der Proben innerhalb der Probenserie, aufgrund zu geringer Erfahrung mit hybriden/samenfesten Sorten wurde eine Zuordnung nicht vorgenommen. Nach der Decodierung zeigte sich jedoch ein deutlich höherer Gesamtproteingehalt bei den samenfesten Sorten, der in der Probenserie H, I, K, L signifikant war. Aufgrund dieser Tendenz zu höheren Gesamtproteingehalten bei samenfesten Sorten wurden bei der Probenserie A, B, C, D vom 27.10.03 die Proben A und D korrekt den samenfesten Sorten zugeordnet. Die Trennung der Proben war signifikant bis auf die Proben C und D, die nicht signifikant getrennt werden konnten.

4.3.5.3.3 Nitrat

Die Probenserie FiBL E, F, G konnte im Nitratgehalt in 2 Niveaus getrennt werden. Das untere Niveau weist zwei Proben mit ca. 30-40 mg/100g FG (E, F) auf. Das obere Niveau weist eine Probe mit ca. 90 mg/100g FG auf (G). Eine Zuordnung konnte bei dieser Probenserie nicht vorgenommen werden, da zum Untersuchungszeitpunkt noch keine Erfahrung mit hybriden/samenfesten Sorten existierte.

Die Probenserie FiBL H, I, K, L konnte im Nitratgehalt in 3 Niveaus getrennt werden. Das untere Niveau weist eine Probe mit 8,7 mg/100g FG (I) auf. Das mittlere Niveau weist zwei Proben mit 12,2 bis 13,0/100g FG (H, K) auf. Das obere Niveau weist eine Probe mit 17,8 mg/100g FG auf (L). Eine Zuordnung wurde auch bei dieser Probenserie noch nicht vorgenommen, da zum Untersuchungszeitpunkt noch keine ausreichende Erfahrung mit hybriden/samenfesten Sorten

bestand. Nach Decodierung zeigte sich bei beiden Probenserien, dass eine Tendenz der samenfesten Sorten zu höheren Nitratgehalten besteht. Aufgrund der geringen Unterschiede der Proben A, B, C, D schien der Nitratgehalt nicht zur sicheren Differenzierung und Gruppierung der Proben geeignet.

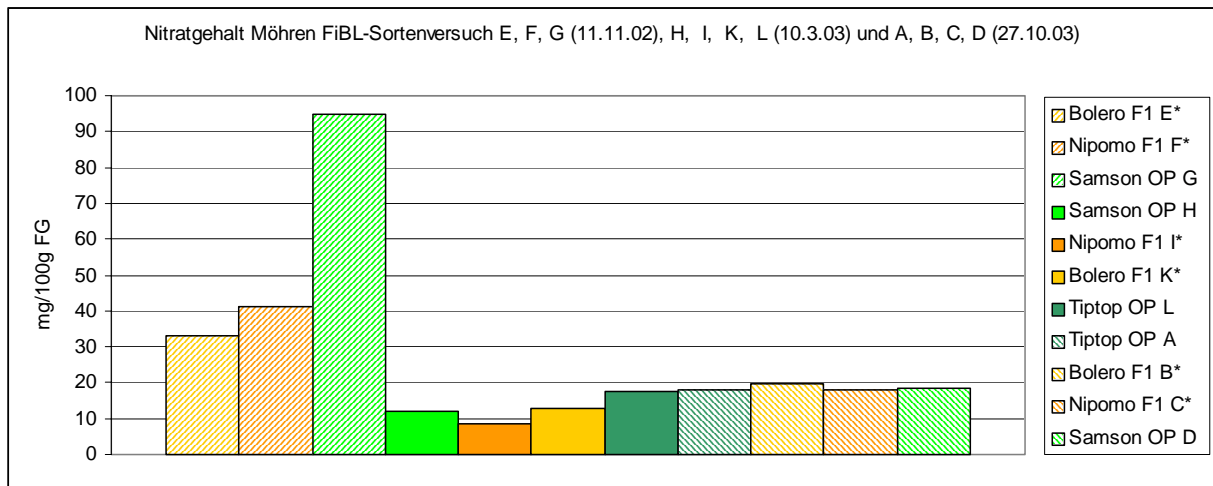


Abbildung 108: Nitratgehalt Möhren FIBL-Sortenversuch 2002-2003

4.3.5.3.4 Summe freier Aminosäuren/Amidierungsgrad Asparaginsäure

Die Probenserien FIBL E, F, G und H, I, K, L zeigten sowohl bei der Summe freier Aminosäuren als auch beim Amidierungsgrad der Asparaginsäure hohe Differenzierung. Eine Zuordnung konnte bei diesen Probenserien nicht vorgenommen werden, da zum Untersuchungszeitpunkt noch keine Erfahrung mit hybriden/samenfesten Sorten existierte.

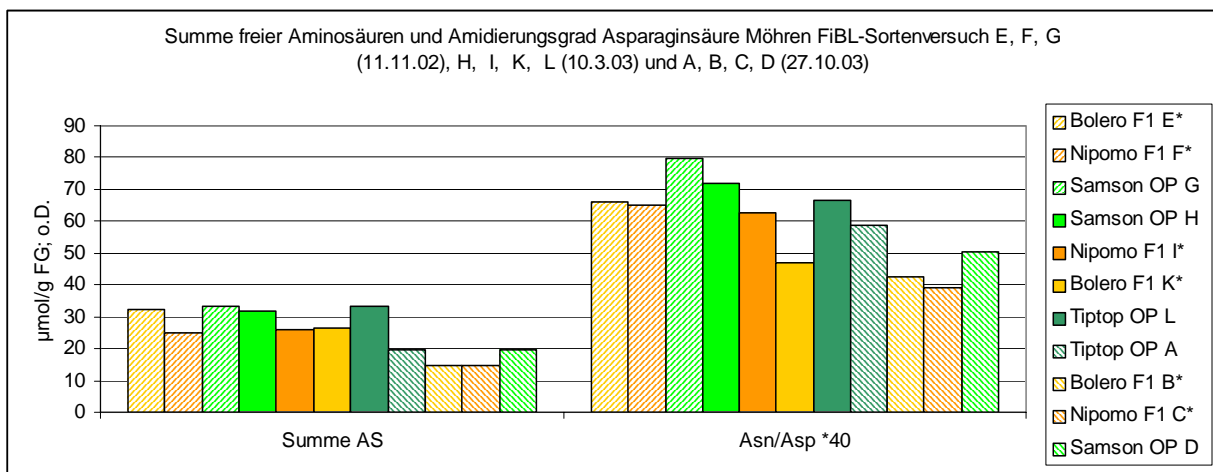


Abbildung 109: Summe freier Aminosäuren und Amidierungsgrad Asparaginsäure Möhren FIBL-Sortenversuch 2002-2003

Nach der Decodierung zeigte sich für die Summe freier Aminosäuren und für den Amidierungsgrad der Asparaginsäure eine deutliche Gruppierung, vergleichbar mit dem Ergebnis der

Gesamtproteinbestimmung. Die Hybridsorten zeigen tendenziell niedrigere Gehalte freier Aminosäuren bzw. niedrigere Amidierungsgrade der Asparaginsäure. Die starke Wüchsigkeit der Hybridsorten drückt sich in einem niedrigeren Level der für das verstärkte Wachstum benötigten N-Metaboliten aus. Auch dieses Ergebnis zeigt wieder einen biologisch plausiblen Bezug der nachgewiesenen Stoffe im Hinblick auf die Projekthypothese.

Bei der Betrachtung der Summen und AS-Quotienten fällt auf, dass der Summengehalt des Stickstoffs (Summe N) eine bessere Trennung der Proben E und G ergibt als die reine Summe der Gehalte der freien Aminosäuren. Auch ist mittels des Quotienten $N_{\text{ident.}} / N_{\text{ges.}}$ eine deutliche Gruppierung und Trennung der hybriden bzw. samenfesten Sorten innerhalb einer Pobenreihe möglich. Deutlich erkennbar ist auch, dass der Amidierungsgrad der Glutaminsäure (Gln/Glu) bei den vorliegenden Proben nicht zur Trennung und Gruppierung der Proben geeignet ist. Die Bestimmung des Nitratgehaltes ist nur teilweise geeignet.

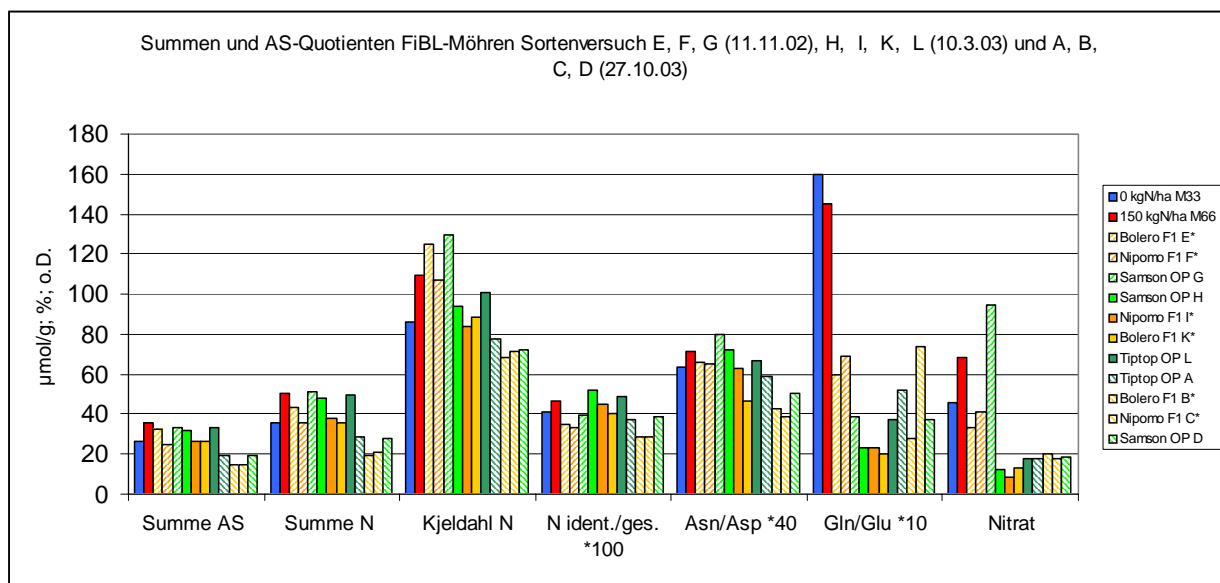


Abbildung 110: Summen und AS-Quotienten Möhren FiBL-Sortenversuch 2002-2003

Während vor Beginn des Projektes zwar Erfahrung zur Differenzierung und Identifizierung ökologischer und konventioneller Proben vorlag, ergaben die Untersuchungen im vorliegenden Projekt, dass auch Hybridsorten Unterschiede gegenüber samenfesten Sorten aufweisen. Bei den untersuchten Proben zeigten sich jeweils bei den Hybridsorten geringere Werte für die Summe der freien Aminosäuren, die Summe des in freien Aminosäuren gebundenen N, den Gesamtprotein-N, das Verhältnis des in freien Aminosäuren identifizierten N zum Gesamtprotein-N und den Amidierungsgrad der Asparaginsäure.

Unter der Voraussetzung vergleichbarer Standort-, Klima- und Düngungsbedingungen deutet dies auf einen physiologischen Aminosäurenstatus hin, wie er im Projekt bei weniger N-gedüngten Möhren gefunden wurde. Die durch die Besonderheit der Hybridsorten erzeugte Wüchsigkeit führt hier möglicherweise zu einer stärkeren Verstoffwechslung des vorhandenen N.

4.3.6 Zusammenfassende Abschätzung

Die Validität der Einzelprüfmethoden innerhalb des Verfahrens zur Bestimmung des physiologischen Aminosäurenstatus gemäß den Anforderungen der ISO 17025 konnte durch die vorliegenden Ergebnisse zur Verifizierung im durchführenden Labor gezeigt werden. Zur Eignung des Gesamtverfahrens war versucht worden, verschiedene Proben codiert zu untersuchen und mittels der Anwendung des Gesamtverfahrens zu identifizieren. Die signifikante Trennung und korrekte Zuordnung der Kulturverfahren gelang an codiert untersuchten Weizenproben aus dem DOK-Versuch vom FIBL. Diese Proben stellen derzeit die bestdokumentierten Proben eines wissenschaftlich begleiteten Langzeitvergleichsversuchs dar (MÄDER et al. 2002).

Bei dem Düngungsversuch an Möhren von der Universität Kassel gelang ebenfalls eine signifikante Trennung und korrekte Identifizierung an codierten Proben.

An Proben aus dem vom FIBL durchgeführten Sortenversuch an Möhren zur Identifizierung hybrider bzw. samenfester Sorten gelang die Trennung und Identifizierung an codierten Proben teilweise. Nach Decodierung dieser Proben zeigten sich plausible Daten zur Gruppierung der Sorten. Danach scheint die Methode auch das Potenzial zur Charakterisierung von Hybridsorten bzw. samenfesten Sorten zu haben.

Insgesamt läßt sich zusammenfassend feststellen, dass das hier bearbeitete Verfahren zur Bestimmung des physiologischen Aminosäurenstatus eindeutig für die vorliegende Fragestellung geeignet ist.

4.3.7 Aussage über den möglichen Einsatz der Methode für andere Fragestellungen

Die Grundidee zur Differenzierung von Kulturverfahren mithilfe der Bestimmung des physiologischen Aminosäurenstatus, nämlich:

1. mehrere Meßgrößen,
2. analytisch präzise erfassbare Meßgrößen,
3. die sowohl einen Bezug zum untersuchten Pflanzenorganismus (dessen Physiologie),
4. als auch einen Bezug zum angewandten Kulturverfahren haben

ist voraussichtlich auch auf andere Pflanzen übertragbar. Insbesondere da im konventionellen Landbau intensiver Einsatz von mineralischem Stickstoffdünger zu Ertragsteigerung erfolgt, sollten sich bei anderen als den hier geprüften Matrices Unterschiede zeigen lassen. Erste dahingehende Erfahrungen liegen für Äpfel und Rote Bete bereits vor.

Inwieweit das Verfahren auch für verarbeitete Lebensmittel geeignet ist, wird vermutlich vom Verarbeitungsgrad abhängen und ist im jeweiligen Fall zu prüfen.

4.4 Elektrochemische Messungen (Dipl. Phys. B. Staller)

4.4.1 Beschreibung des Verfahrens

Je mehr Inhaltsstoffe ein Produkt besitzt, um so häufiger finden in ihm Elektronentransferprozesse statt, die sich mit elektrochemischen Verfahren messen lassen.

Ausgehend von der Physik der Thermodynamik hat bereits SCHRÖDINGER (1944) auf die Bedeutung des Redoxpotenzials hingewiesen, wenn er sagt: „Der Mensch ernährt sich von negativer Entropie“.

Während die konventionellen Lebensmitteluntersuchungen nur eine isolierte Aussage über Inhaltsstoffe oder dem kalorischen Gehalt liefern, erfasst die elektrochemische Messung auch den Anteil, der strukturelle Aufbauarbeit (Entropieanteil) liefern kann.

Die Bestimmung der elektrochemischen Parameter nach dieser Methode wurde als Screening-Test entwickelt, welcher in seiner zukünftigen Anwendung eine Differenzierung zwischen verschiedenen Proben liefern soll, ohne dass dazu große naturwissenschaftliche Vorbildung oder chemische Verfahren nötig sind.

Eine Bestimmung des pH- Wertes oder der Leitfähigkeit bis auf zwei Dezimalstellen nach dem Komma sind mit der entsprechenden Ausstattung (Spezialelektroden) zwar möglich, jedoch erhöht sich für den zukünftigen Anwender damit nur der Zeitaufwand für die Kalibrierung um ein Vielfaches ohne Erhöhung der Aussagekraft. Da biologische Proben per se nicht homogen sein können, ist diese Präzision für eine verwertbare Messung auch nicht nötig. Der Aufbau der Messapparatur siehe Anhang 8.2.

4.4.1.1 Messprinzip

Elektrochemische Messungen sind nur im wässrigen Milieu durchführbar, weshalb alle Proben in flüssiger Form oder als Eluat vorliegen müssen. In dem Messgefäß, welches auf einem Magnetrührer steht, befinden sich eine pH-Elektrode, die Redoxelektrode sowie der Leitfähigkeitssensor mit integriertem Thermofühler. Der angeschlossene Datenlogger speichert nach einem frei wählbaren Zeitintervall (5 s – 24 h) jeweils einen Datensatz (pH-Wert, Redox, Leitfähigkeit, Temperatur), welcher gleichzeitig zur Kontrolle des Messverlaufs auf einen angeschlossenen PC übertragen werden kann. Ein Software-Programm im PC berechnet aus den Messdaten den temperaturkorrigierten und auf die Wasserstoffelektrode bezogenen Eh - Wert des Redoxpotenzials.

Um die biologischen Schwankungen in den Teilproben ausgleichen zu können, wird mit einer 3-fach-Wiederholung der Messung gearbeitet. Der Mittelwert des Redoxpotenzials wird graphisch dargestellt und ermöglicht eine visuelle Auswertung der Messung.

4.4.1.2 Interpretation der Messparameter

Ausgehend von der Definition, dass mit dem pH-Wert, dem Redoxpotenzial und der elektrischen Leitfähigkeit (= elektr. Widerstand $^{-1}$) alle Parameter des Lebens erfasst sind (Kenedy 1952), werden diese Parameter gemessen und dokumentiert.

4.4.1.2.1 pH

Der pH ist der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität. Wasserstoffionen beeinflussen Lebensvorgänge in doppelter Hinsicht: zum einen sind sie - falls sie Reaktionspartner von Stoffwechselvorgängen sind - von Einfluss auf deren Gleichgewichtslage (thermodynamischer Effekt) und zum anderen beeinflussen sie die Geschwindigkeit von Stoffwechselreaktionen (kinetischer Effekt).

In einem gesunden Organismus wird der pH-Wert in den verschiedenen intra- und extrazellulären Kompartimenten jeweils auf einem Wert stabilisiert, bei dem die dort wirksamen Enzyme ihr Aktivitätsmaximum haben. Größere Abweichungen von einem arttypischen pH-Wert geben somit Rückschluss auf eine artfremde Produktions- oder Verarbeitungsweise. Der Wert wird angegeben als Zahl und ist ohne Benennung.

4.4.1.2.2 Leitfähigkeit

Die elektrische Leitfähigkeit einer Probe gibt Aufschluss über die Anzahl der beweglichen elektrischen Ladungsträger. In wässrigen Lösungen, d.h. in allen lebenden Systemen, kommen hierfür nur Ionen in Frage, da freie Elektronen nur in Festkörpern existieren.

Außer den bereits beim pH erwähnten Wasserstoff- und Hydroxylionen kommen aber noch zahlreiche andere Ionensorten vor, z. B. Hydrogenkarbonat-, Phosphat-, Kalium- und Natriumionen, die in den einzelnen Lebensprozessen wichtige Funktionen erfüllen.

Alle in der Probe vorliegenden Ionenkonzentrationen bestimmen zusammen die Leitfähigkeit bzw. den spezifischen Widerstand der Probe. Die Leitfähigkeit wird angegeben in Millisiemens/Zentimeter (mS/cm).

4.4.1.2.3 Redoxpotenzial

Der theoretische Ansatz der Redoxmessung beruht auf den Fundamentalsätzen (1. und 2. Hauptsatz) der Thermodynamik. Aus ihnen lässt sich auch die Aussage ableiten, dass Lebensmittel mit niedrigerem Redoxpotenzial besser zum Aufbau von struktureller Ordnung im Körper und zur Neutralisation von freien Radikalen geeignet sind.

Mit der Aufnahme von Nahrungsmitteln hoher struktureller Ordnung (= niedriges Redoxpotenzial) erfolgt durch Stoffwechselprozesse einerseits ein Abbau zu Produkten geringerer Ordnung. Die dabei freiwerdende Energie nutzt der Körper einerseits zum Aufbau von Zellsubstanz und andererseits zur Beseitigung von Unordnung (Wärme).

Da das Redoxpotenzial auch ein Maß für die Neigung einer Substanz ist, Elektronen abzugeben, erhält man damit auch einen Parameter für die antioxidative Wirkung. Die Maßeinheit für das Redoxpotenzial ist Millivolt (mV).

4.4.2 Stand der Methoden zu Projektbeginn

Elektrochemische Messungen (pH-Wert, Redoxpotenzial und elektr. Leitfähigkeit) sind in vielen Bereichen der Technik (Abwasserwirtschaft, Mikrobiologie, physikalischen Chemie) Standardmethoden zur Milieubeurteilung. In der Lebensmittelbeurteilung sind die Redoxpotenzial- und Leitfähigkeitsbestimmung bislang unüblich. Der Antragsteller hat jedoch in den letzten Jahren ein umfangreiches know-how entwickelt, um auf der Basis der Messung speziell des Redoxpotenzials Qualitätsdifferenzierungen von Lebensmitteln vornehmen zu können. Gegenstand waren vor allem flüssige (Obstsäfte, Wein, Bier) oder leicht zu verflüssigende Proben (Gemüse und Obst).

Die Besonderheit dieses Ansatzes gegenüber gebräuchlichen Bewertungsverfahren, die auf Einzelkomponenten von Nahrungsmitteln fokussieren, besteht darin, dass das Redoxpotenzial ein elektrochemischer Summenparameter (Mischpotenzial) ist, der eine ganzheitliche Bewertung im Rahmen von Screening-Test-Verfahren zulässt. Unter dem Elektrochemischen Qualitätstest versteht man die systematische Bestimmung der Parameter pH-Wert, Redoxpotenzial und elektrische Leitfähigkeit in einer flüssigen oder verflüssigten Probe nach einer produktspezifischen standardisierten Meßmethode zum Zwecke einer physiologisch und thermodynamisch orientierten und determinierten Qualitätsbeurteilung.

Auf der allgemeinen Grundlage der "Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren" (§ 35

LMBG) werden für die Messung von pH-Wert, Redoxpotenzial und Leitfähigkeit produktspezifische standardisierbare Proben-Aufbereitungen und Messvorschriften für die Vermessung von Lebensmitteln unter möglichst geringer mechanischer und thermischer Belastung entwickelt. Die gewonnenen Messwerte werden dokumentiert, um auf der Basis einer umfangreichen Datenbank eine Aussage sowohl über die aktuelle physiologisch orientierte Produktqualität als auch über die elektronenenergetisch begründete Reduktionskapazität bzw. das thermodynamisch abgeleitete Ordnungsniveau abzugeben.

Nach mehr als 9.000 repräsentativen und reproduzierbaren Messungen - vor allem an gärtnerischen und weinbaulichen Produkten - lässt sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der jeweiligen "Vorgeschichte" und der messbaren Produktprobe herstellen, so dass sich aus dieser Sicht "Qualität als das Endprodukt aller Produktionseinflüsse und deren gesundheitliche Relevanz für den Konsumenten" definiert. Herausragende Bedeutung hat aus gesundheitlicher Sicht dabei das Redoxpotenzial, das die Reduktionsfähigkeit eines Lebensmittels charakterisiert und sich für die Beurteilung der elektrochemisch interpretierbaren Gesundheitsrelevanz für den Konsumentenorganismus vorwiegend am Synergismus reduktionsfähiger Verbindungen (Vitamine und sekundäre Pflanzenwirkstoffe) orientiert.

Auf der Grundlage der vorliegenden Messergebnisse lässt sich feststellen: Je "stressärmer" sich die Produktentwicklung gestalten konnte, desto reduzierter (= elektronenreicher) ist das Produkt. Dieser Erkenntnis liegt die Hypothese zugrunde, dass die Organismen reduzierte Verbindungen vorwiegend zur eigenen Fortpflanzung, Gesundheits- und Überlebenssicherung anlegen. Je mehr diese reduzierten Verbindungen während der physiologischen oder technologischen Weiterentwicklung oxidiert werden, desto weniger stehen sie innerhalb der Nahrungskette dem Endverbraucher gesundheitsförderlich zur Verfügung. Deshalb müssen alle Produktions- und Verarbeitungsschritte auf eine mögliche Schonung dieser elektronenreichen 'Verbindungs-Vorräte' ausgerichtet sein. Die Redoxmessung liefert dabei bei 'lebendigen Proben' einen summarischen Überblick über den aktuellen Stand der Fließgleichgewichte der Redoxprozesse und einen rechnerischen Einblick in die jeweiligen Reduktionskapazitäten und den thermodynamischen Ordnungsgrad.

Wegen der produktabhängigen mehr oder weniger großen Überlappungen bei den beiden Gauß'schen Normalverteilungen von ökologisch und konventionell erzeugten Vergleichsproben ergaben sich in der Praxis in ca. 85% bis 95% aller Fälle signifikante Differenzierungen. Von

großem Vorteil ist heute die Tatsache, dass durch jahrelange geräte- und elektrodentechnische Entwicklungsarbeit eine reproduzierbare und sehr sensible Messgüte im Bereich der Redoxmessungen erreicht werden konnte, was in Verbindung mit einem sehr preisgünstigen Equipment zu einer unmittelbaren Praxiseinführung führen könnte.

Die theoretische Interpretation des Zusammenhangs zwischen Qualität und Redoxpotenzial ist mit den Gesetzen der Thermodynamik fundiert und von Erwin SCHRÖDINGER bereits 1943 als ergänzungsbedürftiger Diskussionsbeitrag in der traditionellen Lebensmittelbeurteilung angemahnt worden (SCHRÖDINGER 1944). Zunächst sei aufgrund einer Vielzahl von Messungen postuliert (HOFFMANN 1997): "Ein arttypisches niedriges Redoxpotenzial korreliert mit einer hohen Produktqualität und besitzt gesundheitliche Relevanz in dem Sinne, dass eine höhere antioxidative Wirkung im Konsumentenorganismus erzielt werden kann".

Die bekannten physikalischen Prinzipien (Quantentheorie der Atome und Moleküle und die Gesetze der Thermodynamik) gelten nachweislich auch in der Biologie und der Chemie, sind also auch bei lebenden Organismen anwendbar. Die aus dem Licht aufgenommene Energie lässt sich als Enthalpieänderung berechnen und beträgt 2.870 kJ/mol (CAMPBELL 1997, HOPPE 1977). Da biologische Prozesse nahezu ohne Volumenänderung (isochor) und Druckänderung (isobar) ablaufen, entspricht die Enthalpieänderung der Änderung der inneren Energie eines Systems. Dabei wird nach dem Energieerhaltungssatz ein gleich großer Energiebetrag in Form von Arbeit und Wärme mit der Umgebung ausgetauscht.

Bei der analytischen Bewertung von Lebensmitteln wird nun angegeben, welcher Betrag an Energie bei vollständiger Verbrennung im Körper mit Sauerstoff gewonnen werden kann. Durch die ausschließliche Angabe der Inneren Energie wird ein wesentliches Merkmal der Lebensmittel jedoch nicht berücksichtigt. Es ist dies der Anteil der dem Körper zugeführten Energie, der für die Aufrechterhaltung der "Ordnung im Körper" verantwortlich ist.

Bei Redoxmessungen in Lebensmitteln werden die elektrischen Potenziale gemessen. Je geringer der Redoxwert, desto qualitativ hochwertiger ist aus elektrochemischer und ernährungswissenschaftlicher Sicht der stoffliche Inhalt der untersuchten Substanz. Dabei sind die reduzierten Anteile in den Verbindungen jeweils die elektronenenergiereicheren, die gleichzeitig auch thermodynamisch einen höheren inneren Ordnungszustand repräsentieren und für die Neutralisation von freien Radikalen im Körper ebenfalls gesundheitliche Relevanz besitzen. Diese

Zusammenhänge werden bereits wissenschaftlich kommuniziert. Hingewiesen sei auf die Dissertation von SCHIMMÖLLER (1990). Er konnte in Blutuntersuchungen nachweisen, dass die Probanden einen um so höheren Blut-Redoxwert aufwiesen, je schlechter sich der Gesundheitsstatus als eingesetztes Vergleichsmuster darstellte.

4.4.3 Vorversuche

4.4.3.1 Weizen

Da Weizen in seiner Ausgangsform biologisch eine Trockenkonserve darstellt, ist der direkte Zugang für elektrochemische Untersuchungen nicht möglich und wurde bisher auch nicht untersucht.

Primär stellte sich also die Frage, ob sich Getreide elektrochemisch differenzieren lässt. Dazu wurden verschiedene Mehle (Weizen, Roggen, Dinkel) einheitlich mit Wasser angesetzt und elektrochemisch vermessen.

Wie aus der Abbildung 111 hervorgeht, verfügen verschiedene Getreidesorten über unterschiedliche Redoxpotenziale, die sich elektrochemisch differenzieren lassen.

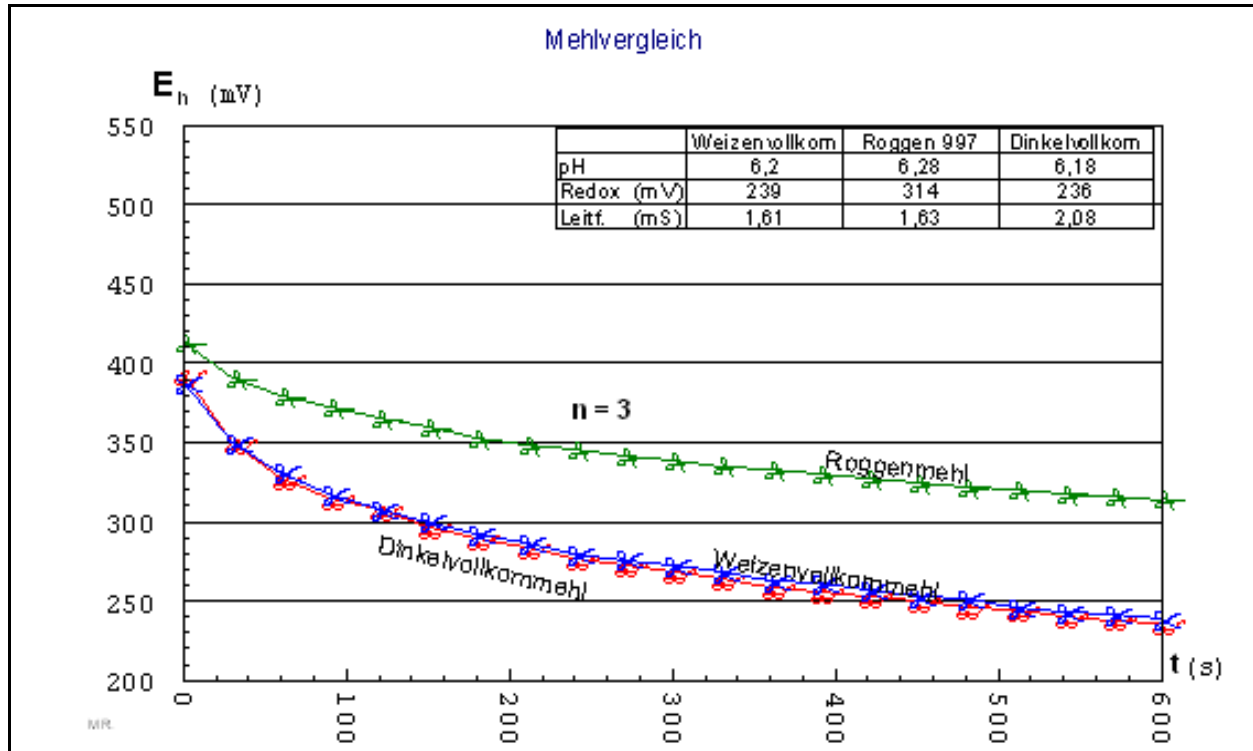


Abbildung 111: Elektrochemische Parameter verschiedener Getreidegattungen

Zur Festlegung eines idealen Mischungsverhältnisses zwischen Getreideeinwaage und Wasser

wurden zahlreiche Versuche durchgeführt (Abbildung 112). Deutlich zeigte sich dabei, dass mit höherer Getreideeinwaage das Redoxpotenzial niedriger wird, die Leitfähigkeit ansteigt und der pH-Wert innerhalb der normalen Schwankungsbreite konstant bleibt. Mit zunehmender Konzentration trat bei manchen Weizenproben eine Verklumpung des Messguts während des Messens auf, was zu einer größeren Streuung beim Redoxwert und bei der Leitfähigkeit führte

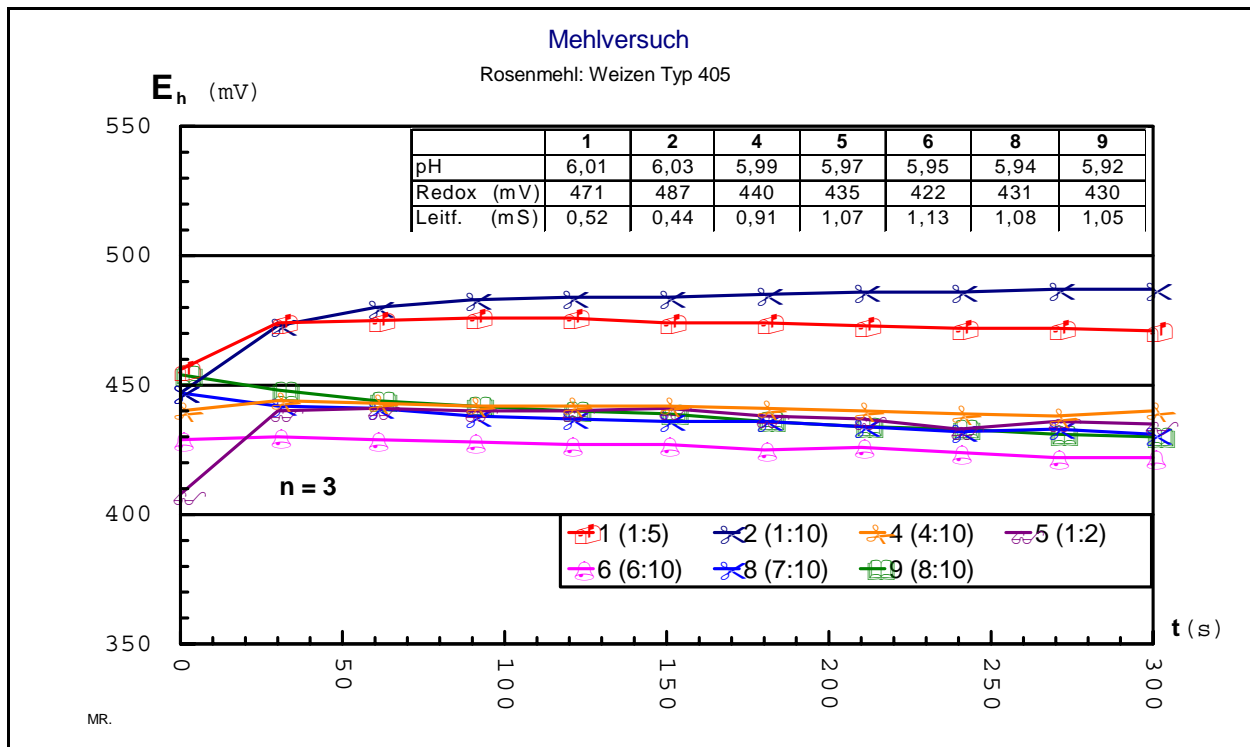


Abbildung 112: Elektrochemische Parameter in Korrelation zur Konzentration

Um festzustellen, ob der Ausmahlgrad (= Zusammensetzung des Mehls) einen Einfluss auf die elektrochemischen Parameter besitzt, wurde ein Vergleich zwischen Weizenvollkornmehl und der Type 405 angestellt (Abbildung 113). Das ballaststoffreichere Vollkornmehl verfügt sowohl über das niedrigere Redoxpotenzial als auch über eine wesentlich höhere Leitfähigkeit. Für die weiteren Messungen wurde deshalb Vollkornmehl (Schrot) verwendet.

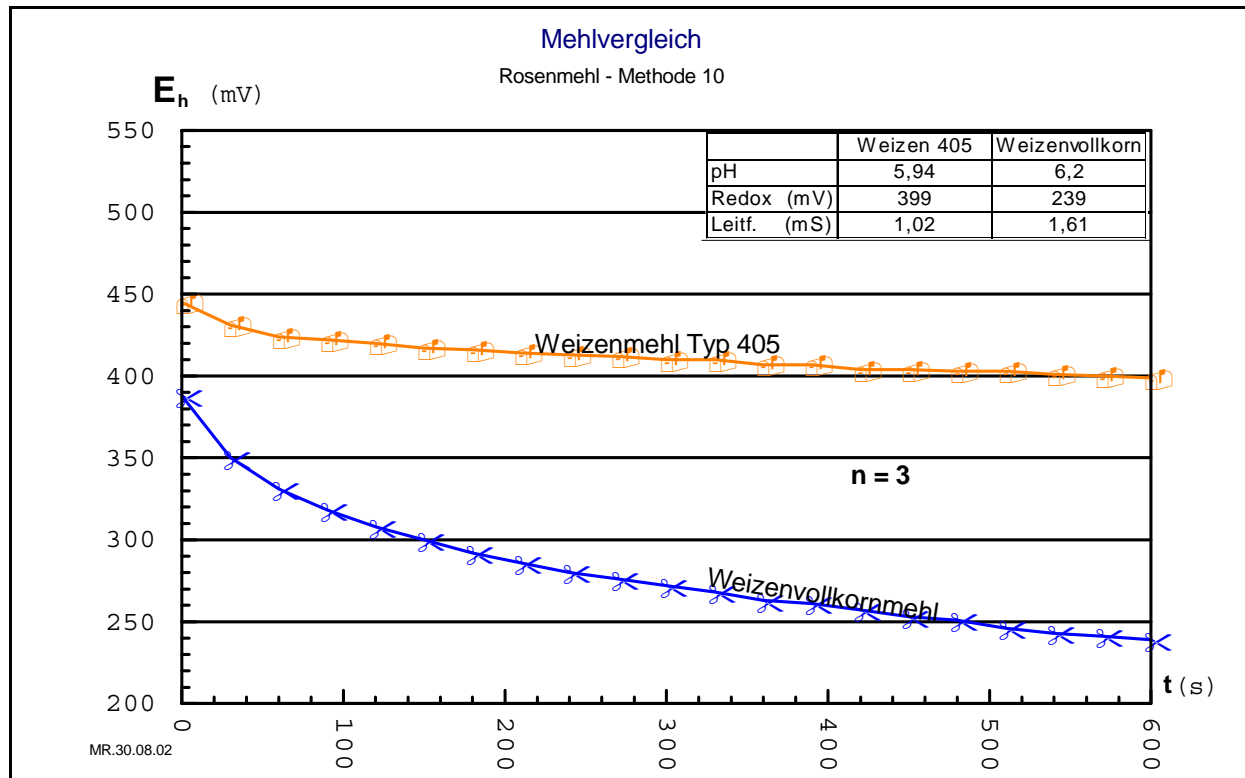


Abbildung 113: Einfluss des Ausmahlgrades bei Weizenmehl

Um eine bessere Trennschärfe bei Weizen zu erzielen, wurden bereits vorher vermessene Weizenproben vermälzt und nach VZ 20 (Hartong-Kretschmer –Verfahren) aufbereitet und vermessen. Die Malzmessungen lieferten andere Ergebnisse als die angeführten Getreidemessungen. Zur Korrelation von Malz und Getreide wären weitere Messungen notwendig.

4.4.3.2 Karotten

Karotten wurden im Auftrag von Privatkunden bereits seit mehreren Jahren vermessen, so dass hier bereits Erfahrung bestand. Auf Grund der unterschiedlichen elektrochemischen Beschaffenheit der Karotte zwischen Wurzel, Mittelstück und Blätteransatz wurden diese kritischen Bereiche bei der Probenvorbereitung nicht mit einbezogen und nur der Mittelteil entsaftet. Wesentlichen Einfluss auf die elektrochemischen Parameter haben die Zusammensetzung (Homogenität) und die Beschaffenheit (Faulstellen, Nematodenbefall) der Teilprobe sowie der Entsafter.

Bedingt durch die Menge und Qualität der für die Vorversuche zur Verfügung gestellten Karotten musste ein neues Messverfahren entwickelt werden. Von der bisher verwendeten Frischentsaftung jeder Teilprobe wurde auf eine Mischprobe umgestellt. Das Alterungsverhalten des Saftes zeigt, dass eine 3-fach-Wiederholung bei 900 s Messzeit durchführbar ist.

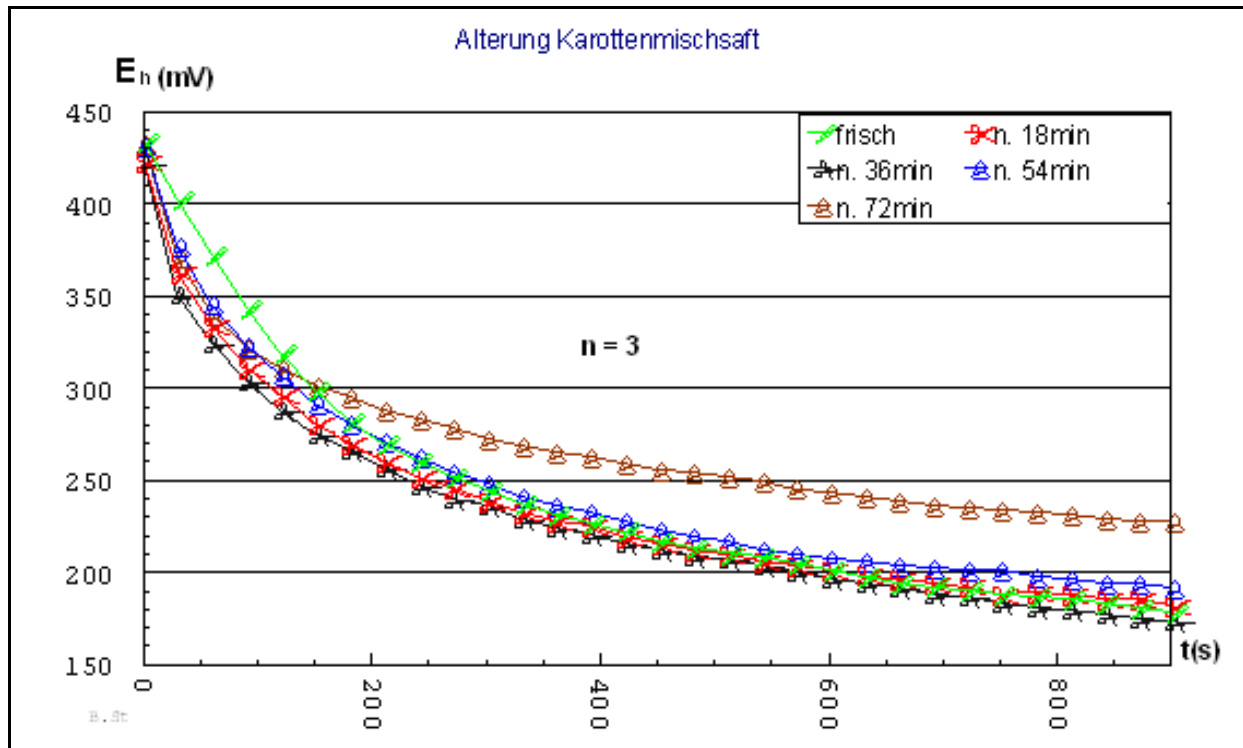


Abbildung 114: Alterungsverhalten von Karottenmischsaft, Messzeit 900 s

Im Rahmen der Optimierungsversuche wurde die zeitliche Entwicklung des Redoxpotenzials bei Karottensaft untersucht. Aus den Graphiken ist zu erkennen, dass sich keine signifikanten Veränderungen beim Redoxpotenzial im Mischsaft ergeben, solange die Messzeit von 900 s, wie sie in der EQC-Standard-Arbeitsvorschrift vermerkt ist, eingehalten werden kann. Für längere Messzeiten, was möglicherweise bei Karotten jahreszeitlich und sortenbedingt ist, führen Mischsaftproben zu stark streuenden Ergebnissen, da der Karottensaft altert und über diesen Zeitraum nicht stabil bleibt. In diesem Fall ist es notwendig, jede Teilprobe einzeln zu entsaften oder den Saft 90 min absetzen zu lassen. Letzteres führt zu stark veränderten Werten, da nach dieser Zeit bereits eine Oxidation des Saftes erfolgt ist und somit eine gewisse Stabilisierung erreicht wird.

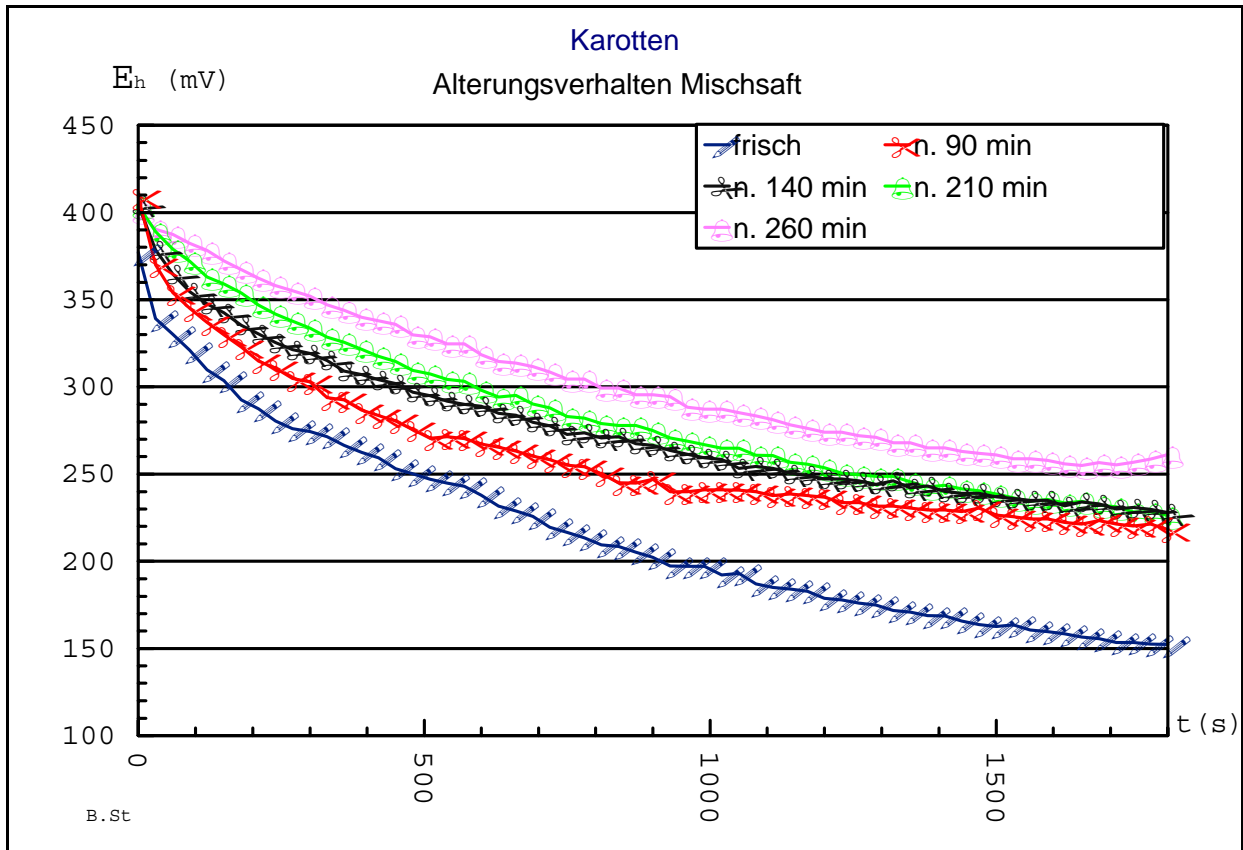


Abbildung 115: Alterungsverhalten Karottenmischsaft, Messzeit 1800 s

4.4.3.3 Redoxpuffer

Zur Validierung einer Methode sollen nach Möglichkeit Standardlösungen eingesetzt werden, mit denen eine Kalibrierung der Messapparatur erfolgt. Bei den über den Laborfachhandel frisch bezogenen Redoxpuffern, die von verschiedenen Herstellern stammten, traten jedoch teilweise größere Abweichungen vom Sollwert auf, obwohl die Herstellung nach DIN – Norm und nach internationalen Standards (SRM, NIST) erfolgt ist.

	Sollwert	Istwert (Mittelwert n=3)	Standardabw.
Redoxpuffer 1	437	440	0,7
Redoxpuffer 2	427	444	0,72
Redoxpuffer 3	427	435	0,58
Redoxpuffer 4	427	428	1,0
Redoxpuffer 5	675	683	2,0

Tabelle 35: Vergleich Soll/Istwert von Redoxpuffern verschiedener Hersteller

Diese möglicherweise in der Elektrochemie akzeptierten Toleranzen der Standards erwiesen sich für unseren Zweck als zu groß, sodass wieder auf Wein als homogene und stabile Labor-Standard-Lösung zurückgegriffen wurde.

4.4.3.4 Wein

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Messapparatur hat sich Wein als ideales Testmedium herauskristallisiert und wird seit längerer Zeit auch als solches im Labor verwendet. Um sicherzustellen, dass die Messapparatur nicht selektiv (es wurde immer der gleiche Wein von einem Weingut verwendet) arbeitet, wurden Weine von unterschiedlichen Produzenten und verschiedenen Anbaugebieten vermessen (siehe Tabelle 15).

Die geringen Standardabweichungen belegen die Eignung von Wein als Referenzmedium zur Überprüfung der Messapparatur, unabhängig von der Sorte und des Anbaugebietes.

Weinsorte	Mittelwert (n=3)	Standardabw.	V _K
Coteaux Varoix	267 mV	1,09	0,48
Riesling	330 mV	1,89	0,57
Gr. Veltliner	314 mV	0,81	0,25
Zinfandel	258 mV	1,22	0,47
Bouvier	357 mV	1,33	0,37
Riesling	283 mV	0,96	0,34

Tabelle 36: Redoxpotenzial von verschiedenen Weinen

4.4.4 Validierung

Die der Validierung zugrunde liegende Fragestellung ist, ob sich mit der elektrochemischen Methode unterschiedliche Kulturverfahren an Karotten und Weizen messtechnisch differenzieren lassen. Dabei umfasst dieses Problem 3 Fragestellungen, die getrennt zu untersuchen sind.

1. Sind die eingesetzten Geräte geeignet, diese Unterschiede messtechnisch zu erfassen?
2. Ist die Methode (Probenvorbereitung und –aufbereitung, Messzeiten...) geeignet, diese Unterschiede herauszuarbeiten?
3. Liefern unterschiedliche Kulturverfahren überhaupt Differenzierungen in einer messtechnisch erfassbaren Größenordnung, oder sind die anderen Randbedingungen (Inhomogenität des Bodens, Erntezeitpunkt) so groß, dass diese Effekte überdeckt werden und die unterschiedlichen Randbedingungen gemessen werden?

4.4.4.1 Charakterisierung der Methode

4.4.4.1.1 Systematische Beurteilung der Faktoren

Üblicherweise werden die zu untersuchenden Proben im Labor angeliefert, sodass auf die Zusammenstellung, Lagerung und Transport der Proben kein Einfluss genommen werden konnte. Obwohl eine unterschiedliche Vorgeschichte der Proben - vor allem bei Karotten - das Messergebnis ganz wesentlich beeinflussen kann, muss aber im Rahmen dieser Messungen diese als inhärente Eigenschaft der Probe gewertet werden.

Elektrochemische Messungen sind nur im aquatischen Milieu möglich. Alle Proben, sofern sie nicht bereits in flüssiger Form vorliegen, benötigen eine Vorbehandlung in Form von Entsaften (Karotten) oder eines Auszuges (Weizen), bei dem eine definierte Menge der zu untersuchenden Probe in Wasser eingerührt und eluiert wird.

Bereits die Vorselektion (Anzahl und Beschaffenheit des Messgutes) entscheidet über die Streuung der Messwerte der zu verarbeitenden Proben, da diese möglichst homogen sein müssen. Fusarien, Schrumpfkornanteil und Mutterkorn im Getreide beeinträchtigen das Messergebnis ebenso wie Faulstellen, Schimmelbefall und Nematoden bei Karotten.

4.4.4.1.1.1 Mischungsverhältnis

Um Weizenproben miteinander vergleichen zu können, ist es wichtig, gleiche Mischungsverhältnisse (Weizen : Wasser) für die Proben zu nehmen. Eine höhere Getreideeinwaage bewirkt eine Senkung des Redoxpotenzials und eine Erhöhung der Leitfähigkeit, allerdings auch eine größere Streuung der Messwerte (siehe Tabelle 16), da damit eine Verklumpung der festen Bestandteile der Teilprobe einhergeht.

Mischungsverh.	1 : 7			6 : 10		
	6,01	469	0,52	5,93	419	1,09
	5,99	474	0,51	5,96	416	1,12
	6	469	0,52	5,97	431	1,13
Mittelwert	6	471	0,52	5,95	422	1,11
STABW	0,01	2,89	0,006	0,02	7,94	0,02
Konfidenz	0,01	3,27	0,01	0,02	8,98	0,02

Tabelle 37: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen auf die elektrochemischen Parameter

4.4.4.1.1.2 Rührgeschwindigkeit

Ein Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf das Messgut ist erst dann festzustellen, wenn Oberflächenwirbel einen Sauerstoffeintrag in das Messmedium verursachen. Das Rühren der Proben (150 –200 U/min) ist notwendig um eine kontinuierliche Anströmung der Elektroden zu gewährleisten und um ein Absetzen und Verklumpen des Getreides im Messglas zu verhindern.

4.4.4.1.1.3 Entsafter

Karotten werden über einen Zeitraum von 6 Monaten geerntet, was große physiologische Unterschiede zur Folge hat. Ein Vergleich zwischen Frühkarotten und den Industriekarotten im Herbst ist somit generell nicht möglich. Ebenso hat sich gezeigt, dass Karotten über ihre Länge nicht homogen sind. Dies führte dazu, von den Karotten nur den Mittelteil zu verwenden, um eine möglichst homogene Teilprobe zu erhalten.

Da elektrochemische Messungen nur im wässrigen Medium durchgeführt werden können, müssen die Karotten entsaftet werden. Der Eintrag von Sauerstoff in das Messgut ist vom Entsaftertyp abhängig und lässt sich nur durch größeren technischen Aufwand unterbinden. Die Verwendung des

gleichen Entsafters ist deshalb für die Vergleichbarkeit von Karottenmessungen Bedingung.

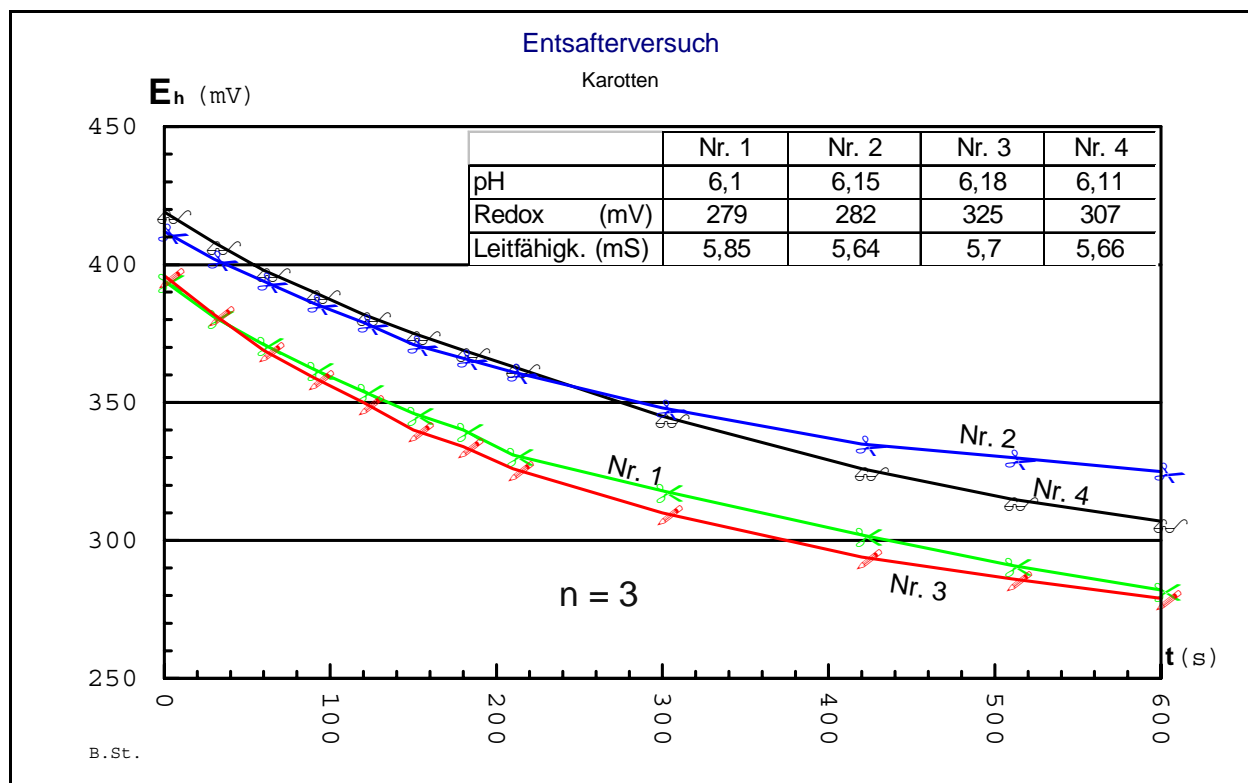


Abbildung 116: Einfluss des Entsafters auf die Messwerte von Karottenmischsäften

4.4.4.1.1.4 Kalibrierung

Redoxpuffer besitzen die Eigenschaft, sehr hohe Austauschstromdichten zu besitzen, was dazu führt, dass auch zum Teil stark verschmutzte und beschädigte Elektroden nach genügend langer Einstellzeit den Sollwert der Lösung wiedergeben. Eine Überprüfung der Messapparatur mit der für Lebensmittel notwendigen Sensibilität ist mit handelsüblichen Redoxpuffern nicht gewährleistet.

Sehr gut eignet sich jedoch Wein als Kontrollmedium (siehe Weinmessung). Dabei ist darauf zu achten, dass der verwendete Wein aus einem Fass stammt, am gleichen Tag abgefüllt und mit einem Kronenkorken oder Plastiksraubverschluss versehen wird. Die Lagerung sollte bei relativ stabiler Temperatur erfolgen. Bei der Entnahme des Weines und dem Umfüllen in das Messgefäß ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen in den Wein gelangen.

4.4.4.1.2 Schätzung der Ergebnisunsicherheit

Betrachtet man die Messungen, bei denen stabile Lösungen (Puffer und Wein) verwendet wurden, so liegt das größte Konfidenzintervall bei 3 mV. Wesentlich größer wird dieser Bereich, wenn biologische Proben gemessen werden, die vor der Messung noch aufbereitet werden müssen.

Die Auswertungen der Messungen zeigen jedoch, dass von methodischer Seite her ein Konfidenzintervall von 5 mV einzuhalten ist. Größere Schwankungen ($> \pm 5$ mV vom Mittelwert für $n > 2$), vor allem bei entsafteten Proben lassen auf inhomogene Proben oder auf Bedienungsfehler schließen.

4.4.4.1.3 Kalibrierung

4.4.4.1.3.1 pH-Elektrode

Bei der 2-Punkt-Kalibrierung der pH-Elektrode wird sowohl der Nullpunkt als auch die Steilheit (mV/pH) der Elektrode an den Messumformer angepasst. Die zur Kalibrierung verwendeten Pufferlösungen sind so zu wählen, dass der pH-Wert der zu messenden Probe zwischen den pH-Werten der beiden Puffer liegt. Die verwendeten Puffer sollen NBS- Standard bzw. der DIN 19266 entsprechen.

4.4.4.1.3.2 Redoxelektrode

Die Redoxelektrode besteht aus einem Platindraht mit einem aufgesetzten Plättchen (Hersteller: Sensortechnik Meinsberg GmbH, Typ MC 21). Als Referenzelektrode wird die Bezugslektrode der pH-Messkette verwendet. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit wird Wein verwendet, dessen elektrochemische Parameter bekannt sind. Im jährlichen Turnus erfolgt eine Überprüfung der Redoxwerte durch den Gerätehersteller. Eine 2-Punkt-Kalibrierung der Redoxelektrode wie bei der pH-Elektrode würde auf Grund der großen Schwankungen der Puffer zu wesentlich ungenaueren Messwerten führen.

4.4.4.1.3.3 Leitfähigkeitssensor

Die Leitfähigkeitskalibrierung sollte in regelmäßigen Abständen, speziell jedoch nach der Reinigung von starker Verschmutzung, vorgenommen werden. Verwendet wird dazu eine 0,01 mol KCl- Lösung, deren Leitfähigkeit 1,41 mS/cm (bei 25 °C) beträgt.

4.4.4.2 Dokumentation

4.4.4.2.1 Allgemeine Dokumentation

- Laborbuch
- PC-gestützte Dokumentation von Messdaten
- Prozedurbeschreibung Probenaufbereitung (§ 35 LMBG, VZ 20 Hartong-Kretschmer)
- Kalibrieranweisungen

4.4.4.2.2 Standard Arbeitsanweisungen

Standard-Arbeitsanweisung Karotten (BLE)

1. Auswahl

- 2 kg ohne Sortierung
- Dokumentation des Anlieferungszustandes

2. Lagerung

- ungewaschen, const. Temperatur, kühl, dunkel

3. Probenvorbereitung

- Karotten über Nacht zur Temperaturadaption im Labor lagern
- Klassifizierung (10 mittlere Karotten)
- waschen, nicht schälen

4. Aufbereitung

- 10 Karotten
- vorderes/ hinteres Viertel abschneiden
- Karotten längs halbieren
- Karotten abdecken (Tuch)

5. Entsaften (3-fach-Wiederholung)

- Karottenmischprobe entsaften mit Green Star GS 3000
- Karottenhäfte einzeln entsaften, sonst Erwärmung des Saftes
- Mischsaft in Becherglas auffangen (Zubehör von Green Star)

6. Messen (3-fache Wiederholung)

- Saft 5 min stehen lassen
- Magnetrührstäbchen in Becherglas (50 ml) geben
- aus Becherglas 40 ml Saft in 50 ml-Messglas füllen
- pH- und Redox-Elektroden sowie Leitfähigkeitssensor in Messglas einführen
- Magnetrührer Heidoph MR 3003 control (150 U/min, T = 25 °C) starten
- Messung starten (SEE 500)
- Endwerte(pH, Redox, Leitfähigkeit) protokollieren

7. Auswertung

- Mittelwertbildung
- Graphik
- Statistische Auswertung

Standard-Arbeitsanweisung Getreide

1. Probenvorbereitung

- Grobreinigung des Getreides in Getreidereinigungsmaschine (3x)
- Getreide sieben (Sieb DIN 4188, Maschenweite 3,15 mm)
- Für Probenaufbereitung nur ganze Körner > 3,15 mm verwenden
- Körner mit Fusarien entfernen

2. Probenaufbereitung

- 50 g Körner (ca. 1500 St.) ausselektieren
- Körner mahlen (Green Star GS 3000)
 - > Körner langsam in den Green Star eingeben sonst Erwärmung des Mehles
- 200 ml deionisiertes Wasser (25 °C) in 250 ml Weithals-Erlenmeyerkolben einfüllen
- 25 g Getreideschrot langsam zugeben und in das Wasser einrühren
- 10 min mit Magnetrührer (300 U/min) rühren

3. Messen

- Elektroden reinigen nach Vorschrift
- nach Ende der Rührzeit Elektroden in den Erlenmeyerkolben einführen
- Messung starten (SEE 500)
- Endwerte (pH, Redox, Leitfähigkeit) protokollieren
- 3-fache Wiederholung (ab Punkt 2. Probenaufbereitung)

4. Auswertung

- Mittelwertbildung
- Graphik
- Statistische Auswertung

4.4.4.3 Verfahrensmerkmale

4.4.4.3.1 Richtigkeit Redoxpuffer

Die Überprüfung der Richtigkeit erfolgte mit einem Redoxpuffer der Fa. Mettler (DIN 19266/NBS). Der Sollwert der Lösung ist mit 437 mV (25 °C) angegeben, der Mittelwert (n = 6) ergab 436 mV.

Redoxpuffer Sollwert 437 mV (25 °C)

	pH	Redox (mV)	Leitfähigkeit (mS)
	6,86	435	14,4
	6,86	436	14,4
	6,85	436	14,4
	6,82	437	14,4
	6,81	437	14,5
	6,82	436	14,4
Mittelwert	6,84	436	14,42
STABW	0,023	0,73	0,041
Konfidenz	0,018	0,58	0,033

Tabelle 38: Überprüfung der Richtigkeit des Standardpuffers

4.4.4.3.2 Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision wurde mit Standardpuffer (als stabile Lösung), Wein (als Kontrollmedium) sowie für Karotten und Getreide durchgeführt.

Vergleicht man die Standardabweichungen der stabilen Lösungen mit denen der realen Proben, so zeigen sich sehr deutlich die Inhomogenität der Probe und der Einfluss der Aufbereitung.

Getreide				Karotten			
	pH	Redox	Leitf.		pH	Red	Leitf.
						ox	
Mess. 1	6,42	431	0,72	Mess. 1	6,02	122	8,56
Mess. 2	6,4	431	0,72	Mess. 2	6,07	120	7,87
Mess. 3	6,37	434	0,52	Mess. 3	6,06	119	8,75
Mess. 4	6,41	436	0,52	Mess. 4	6,07	115	7,79
Mess. 5	6,44	426	0,68	Mess. 5	6,05	120	7,96
Mess. 6	6,33	430	0,67	Mess. 6	6,05	125	8,61
Mittelw.	6,40	431	0,64	Mittelwert	6,05	120	8,26
STABW	0,04	3,14	0,09	STABW	0,02	3,31	0,43
Konfidenz	0,03	2,52	0,07	Konfidenz	0,01	2,65	0,34

Redoxpuffer				Wein			
	pH	Redox	Leitf.		pH	Red	Leitf.
						ox	
Mess. 1	7,44	432	4,16	Mess. 1	3,34	357	1,66
Mess. 2	7,32	438	4,19	Mess. 2	3,34	359	1,76
Mess. 3	7,36	436	4,16	Mess. 3	3,34	356	1,74
Mess. 4	7,34	438	4,25	Mess. 4	3,34	356	1,79
Mess. 5	7,32	437	4,10	Mess. 5	3,34	359	1,81
Mess. 6	7,37	435	4,16	Mess. 6	3,35	359	1,77
Mittelwert	7,36	436	4,17	Mittelw.	3,34	358	1,76
STABW	0,04	2,28	0,05	STABW	0,004	1,51	0,05
Konfidenz	0,04	1,82	0,04	Konfidenz	0,003	1,20	0,04

Tabelle 39: Elektrochemische Wiederholpräzisionsmessungen für verschiedene Medien

4.4.4.3.3 Laborpräzision

Die Bestimmung der Laborpräzision bzw. der Robustheit erfolgte für Wein, Karotten und Getreide.

4.4.4.3.3.1 Wein

Die Messungen wurden an verschiedenen Tagen mit 2 verschiedenen Gerätekonfigurationen und 3 verschiedenen Personen durchgeführt.

Messtag 1

Gerät 4, Person 4			
	pH	Redox	Leitf.
1. Flasche	3,33	299	1,56
2. Flasche	3,33	296	1,61
3. Flasche	3,36	296	1,62
4. Flasche	3,35	296	1,63
5. Flasche	3,37	298	1,65
6. Flasche	3,40	294	1,64
Mittelw.	3,36	297	1,62
STABW	0,03	1,59	0,03
Konfidenz	0,02	1,27	0,03

Gerät 5, Person 2			
	pH	Redox	Leitf.
1. Flasche	3,37	290	1,70
2. Flasche	3,40	292	1,70
3. Flasche	3,40	298	1,71
4. Flasche	3,40	296	1,73
5. Flasche	3,42	296	1,75
6. Flasche	3,41	299	1,74
Mittelw.	3,40	295	1,72
STABW	0,02	3,25	0,02
Konfidenz	0,01	2,60	0,02

Messtag 2

Gerät 5, Person 3			
	pH	Redox	Leitf.
1. Flasche	3,35	304	1,52
2. Flasche	3,37	302	1,57
3. Flasche	3,39	298	1,6
4. Flasche	3,34	301	1,6
5. Flasche	3,39	298	1,62
6. Flasche	3,39	304	1,66
Mittelw.	3,37	301	1,60
STABW	0,02	2,70	0,05
Konfidenz	0,02	2,16	0,04

Gerät 4, Person 2			
	pH	Redox	Leitf.
1. Flasche	3,35	298	1,51
2. Flasche	3,34	302	1,56
3. Flasche	3,33	302	1,6
4. Flasche	3,34	299	1,6
5. Flasche	3,35	303	1,61
6. Flasche	3,34	304	1,64
Mittelw.	3,34	301	1,59
STABW	0,008	2,23	0,05
Konfidenz	0,006	1,79	0,04

Tabelle 40: Elektrochemische Laborpräzisionsmessungen an Wein

Unabhängig vom Tag oder der Person konnte die Schwankungsbreite von < 10 mV für die Weinmessungen eingehalten werden.

4.4.4.3.3.2 Karotten

Im Handel erhältliche Karotten stammen meistens von Erzeugerverbänden. Sie vermarkten Ware aus verschiedenen Anbaugebieten mit verschiedenen Böden und Sorten. Jede Teilprobe, auch wenn sie aus einer 10 kg-Charge stammt, ist somit Schwankungen unterworfen, was sich auch in den Messungen widerspiegelt.

Jede Messung in der folgenden Tabelle ist eine separate Probenaufbereitung nach EQC-Standard-Arbeitsanweisung. Auch hier zeigte sich, dass die Schwankungsbreite von < 10 mV

eingehalten werden kann, wenn sich die Probe homogen zusammensetzt.

Messtag 1, Gerät 2, Person 1				Messtag 2, Gerät 3, Person 2			
	pH	Redox	Leitf.		pH	Redox	Leitf.
Mess. 1	6,34	147	7,90	Mess. 1	6,33	145	6,55
Mess. 2	6,23	148	6,65	Mess. 2	6,40	140	7,11
Mess. 3	6,33	152	6,92	Mess. 3	6,24	144	8,32
Mess. 4	6,29	151	7,37	Mess. 4	6,29	137	8,23
Mess. 5	6,27	149	7,00	Mess. 5	6,31	145	7,05
Mess. 6	6,41	151	6,98	Mess. 6	6,30	140	7,77
Mittelw.	6,31	150	7,14	Mittelw.	6,31	142	7,51
STABW	0,06	1,86	0,44	STABW	0,05	3,4	0,71
Konfidenz	0,05	1,49	0,35	Konfidenz	0,04	2,7	0,57

Tabelle 41: Elektrochemische Laborpräzisionsmessungen an Karotten

4.4.4.3.3 Weizen

Die Messungen wurden an verschiedenen Tagen mit 2 verschiedenen Gerätekonfigurationen und von 2 Personen durchgeführt.

Jede Messung in der folgenden Tabelle ist eine separate Probenaufbereitung nach EQC-Standard-Arbeitsanweisung

Messtag 1							
Gerät 4, Person 3				Gerät 5, Person 2			
	pH	Redox	Leitf.		pH	Redox	Leitf.
Mess. 1	6,08	448	0,53	Mess. 1	6,07	442	0,54
Mess. 2	6,17	444	0,52	Mess. 2	6,10	441	0,49
Mess. 3	6,28	445	0,52	Mess. 3	6,08	457	0,50
Mess. 4	6,20	456	0,54	Mess. 4	6,14	454	0,50
Mess. 5	6,22	456	0,57	Mess. 5	6,13	451	0,53
Mess. 6	6,20	457	0,53	Mess. 6	6,27	448	0,52
Mittelw.	6,19	451	0,54	Mittelw.	6,13	449	0,51
STABW	0,07	6,03	0,02	STABW	0,07	6,32	0,02
Konfidenz	0,05	4,83	0,01	Konfidenz	0,06	5,06	0,01

Messtag 2

Gerät 4, Person 2				Gerät 5, Person 3			
	pH	Redox	Leitf.		pH	Redox	Leitf.
Mess. 1	5,96	445	0,53	Mess. 1	6,19	443	0,55
Mess. 2	6,00	447	0,53	Mess. 2	5,97	452	0,55
Mess. 3	6,06	450	0,51	Mess. 3	6,11	450	0,55
Mess. 4	6,01	447	0,53	Mess. 4	5,99	455	0,57
Mess. 5	5,96	461	0,52	Mess. 5	6,25	448	0,52
Mess. 6	6,06	453	0,51	Mess. 6	6,27	444	0,54
Mittelw.	6,01	451	0,52	Mittelw.	6,13	449	0,55
STABW	0,05	5,83	0,01	STABW	0,13	4,57	0,02
Konfidenz	0,04	4,66	0,01	Konfidenz	0,10	3,65	0,01

Tabelle 42: Elektrochemische Laborpräzisionsmessungen an Weizen

4.4.4.3.4 Vergleichspräzision

Die Messungen zur Vergleichspräzision wurden mit der TU München durchgeführt, die mit dem gleichen Gerät und nach der gleichen Methode arbeiten. Bei den verwendeten Medien handelt es sich um Puffer nach DIN – Standard. Die große Differenz beim pH-Wert des 675 mV Puffers kommt dadurch zustande, dass dieser Messbereich bei biologischen Proben nicht existiert und somit auch keine Kalibrierung der pH-Elektroden für diesen Messbereich erfolgen konnte. Ebenso konnte die Leitfähigkeit der Puffer nicht mehr gemessen werden, da sie außerhalb des Messbereiches des Gerätes lag.

Puffer 427 mV (25°C)

TUM			EQC		
	pH	Redox		pH	Redox
	7,05	425		7,08	428
	7,05	425		7,08	427
	7,06	427		7,09	429
Mittelw.	7,05	426	Mittelw.	7,08	428
STABW	0,01	1,15	STABW	0,01	1,00
Konfidenz	0,01	1,31	Konfidenz	0,01	1,13

Puffer 675 mV (25°C)

TUM		EQC		
	pH	Redox	pH	Redox
	1,04	679	0,91	681
	1,03	680	0,91	683
	1,03	679	0,90	685
Mittelw.	1,03	679	0,91	683
STABW	0,01	0,58	STABW	0,01
Konfidenz	0,01	0,65	Konfidenz	0,01

Tabelle 43: Elektrochemische Vergleichspräzisionsmessungen TUM und EQC an Redoxpuffern

4.4.4.3.5 Stabilität der eingesetzten Lösungen

Dass Wein als stabile Lösung betrachtet werden kann, zeigen die beiden folgenden Abbildungen:

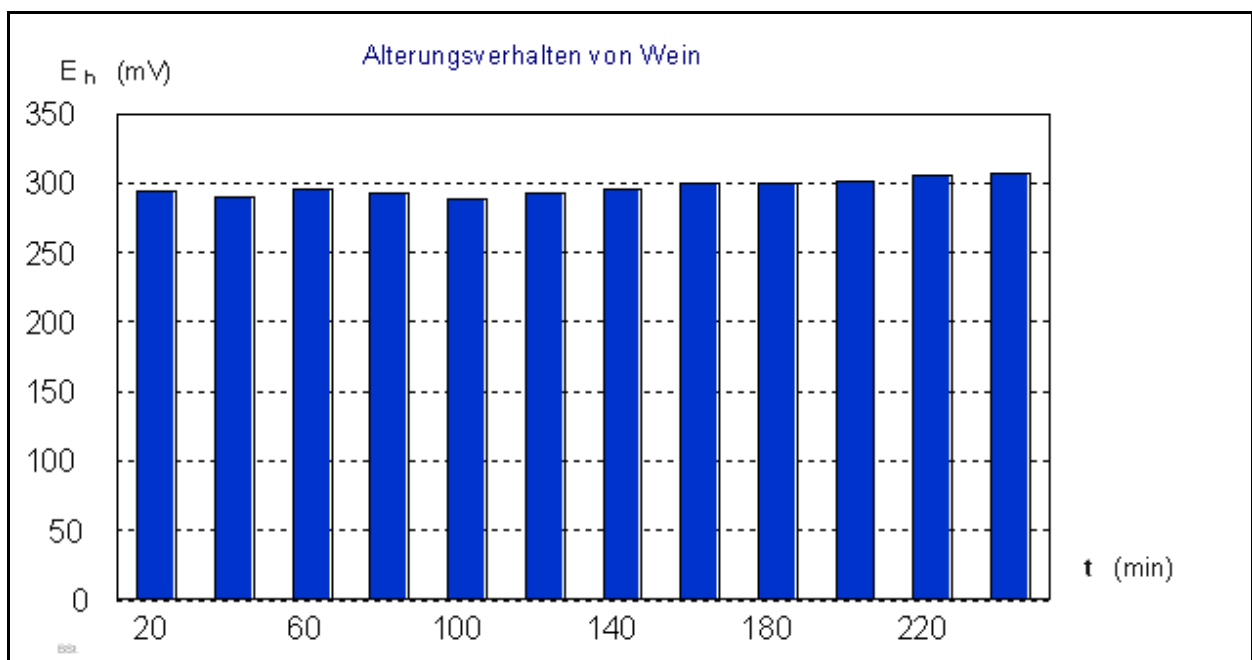


Abbildung 117 Alterungsverhalten von Wein (offene Flasche)

Die Messung des Weins aus 1 Flasche erfolgte über einen Zeitraum von 4 Stunden, wobei alle 20 Minuten eine Messung durchgeführt wurde. Erst nach einem Zeitraum von ca. 2,5 Stunden macht sich eine Oxidation des Weins bemerkbar.

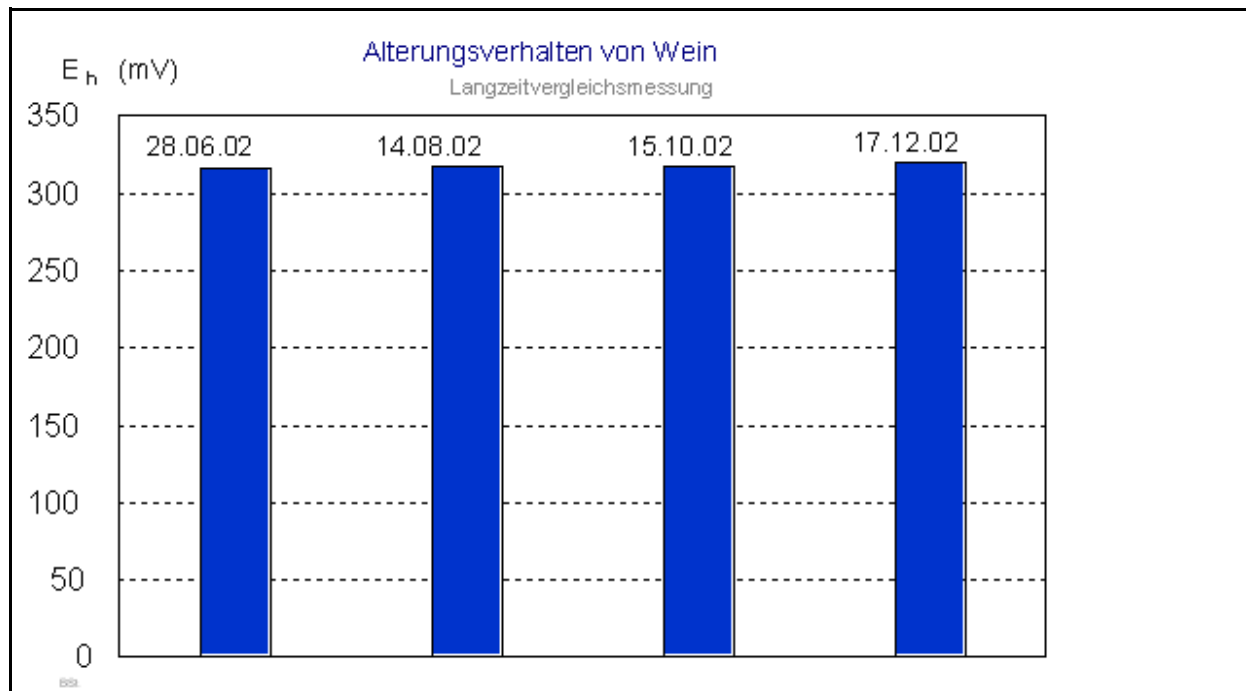


Abbildung 118: Langzeitmessung von Wein (gleiche Charge)

Aus Abbildung 116 ist zu entnehmen, dass Wein über einen Zeitraum von einem halben Jahr keinen elektrochemischen Veränderungen unterliegt, solange er richtig gelagert und mit einem Kronenkorken verschlossen ist.

4.4.4.3.6 Konzentrationsbereiche

Wie bereits bei den Vorversuchen erwähnt, ist das Mischungsverhältnis Mehl : Wasser ein Faktor, der sowohl auf die Höhe des Redoxwertes als auch auf die Streuung der Leitfähigkeit einen Einfluss hat.

Bei den später durchgeführten Weizenmessungen wurde mit einer Konzentration von 1 : 8 gearbeitet (siehe Standard-Arbeitsanweisung Weizen).

Konzentration 1:16

	pH	Redox	Leitf.
	5,96	495	0,28
	6,00	494	0,30
	5,98	499	0,29
	6,02	496	0,29
	6,01	499	0,29
	5,91	500	0,29
Mittelw.	5,98	497	0,29
STABW	0,04	2,53	0,01
Konfidenz	0,03	2,03	0,00

Konzentration 1:8

	pH	Redox	Leitf.
	5,97	478	0,46
	5,97	479	0,48
	6,01	475	0,50
	6,05	481	0,53
	6,04	476	0,53
	5,92	483	0,48
Mittelw.	5,99	479	0,50
STABW	0,05	3,07	0,03
Konfidenz	0,04	2,45	0,02

Konzentration 1 : 5,3

	pH	Redox	Leitf.
	6,04	449	0,67
	6,00	455	0,69
	6,03	461	0,69
	5,87	460	0,65
	5,86	461	0,62
	5,86	462	0,63
Mittelw.	5,94	458	0,66
STABW	0,09	5,23	0,03
Konfidenz	0,07	4,19	0,02

Konzentration 1 : 4

	pH	Redox	Leitf.
	5,96	446	0,79
	6,03	439	0,80
	5,98	443	0,80
	5,96	439	0,79
	5,90	440	0,70
	6,13	439	0,70
Mittelw.	5,99	441	0,76
STABW	0,08	2,90	0,05
Konfidenz	0,06	2,32	0,04

Tabelle 44: Elektrochemische Parameter in Abhängigkeit von der Mehl-Konzentration

4.4.5 Ergebnisse der Vergleichsversuche

4.4.5.1 Weizen DOK Herbst 2002

Zur Verfügung standen 5 codierte Proben, bestehend aus:

- Probe 1 (A 13, A31, A 67, E 301) ungedüngte Nullkontrolle
- Probe 2 (C 211, D 229, D247, D265) organisch-biologisch
- Probe 3 (A 49, E 319 , E 337, E 354) konventionell, Normaldüngung
- Probe 4 (B 85, B 121, B139, C 157) mineralisch
- Probe 5 (B 103, C 175, C 193, D 283) biologisch-dynamisch

Aus den jeweils 4 Einzelproben wurde eine Mischprobe hergestellt und unter der Probennummer (1 – 5) vermessen. Jede Probe wurde mit 3-facher Wiederholung vermessen, die Mittelwerte der Redoxmessung über den ganzen Messzeitraum von 600 s sind in der Abbildung 117 dargestellt. Deutlich sieht man aus den Messkurven, dass sich Probe 1 (Nullvariante) und Probe 4 (mineralische Düngung) von den anderen Proben abheben.

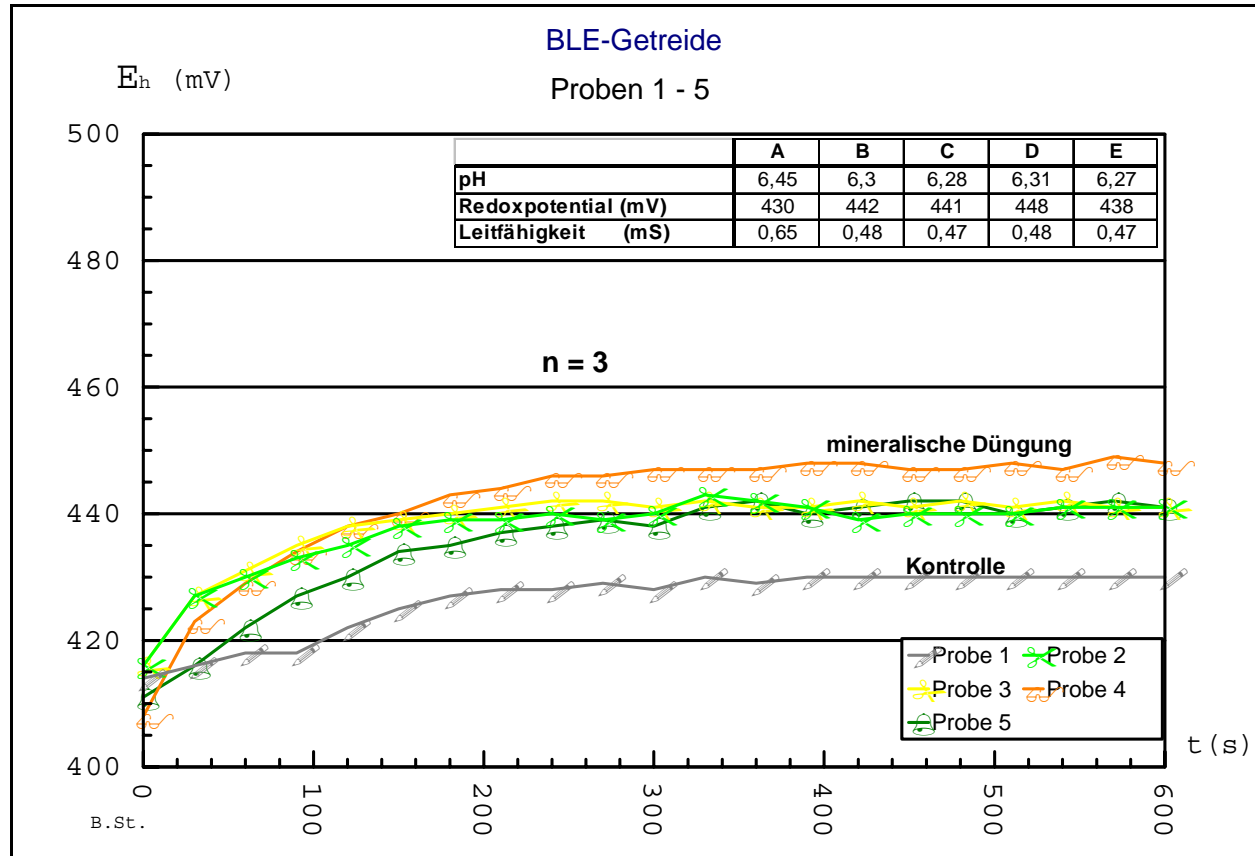


Abbildung 119: Elektrochemische Messungen der Weizenproben 1-5, DOK Versuch, Herbst 2002

ANOVA-Auswertung: P-Wert (Redox) = 0,0001, homogene Gruppen 1 # 4 # 2,3,5

Diskussion: Da alle Düngungsvarianten höhere Redoxwerte besitzen als die Nullvariante, jede Düngung also zu mehr Stress bei den Pflanzen führt, dürfte eine Überdüngung des Bodens vorliegen. Signifikanterweise führt die rein mineralische Düngung zu den höchsten Redoxwerten.

4.4.5.2 Weizen DOK Frühjahr 2003

Wie bereits bei der ersten Weizenprobe waren auch diesmal wieder 5 Proben zu untersuchen:

- Probe A (A 20, A 38, A 56, A 74) ungedüngt
- Probe B (B 92, B 110, B 128, B 146) konventionell mineralisch
- Probe C (C 164, C 182, C 200, C 218) biologisch-dynamisch
- Probe D (D 236, D 254, D 272, D 290) organisch-biologisch
- Probe E (E 308, E 326, E 344, E 361) konventionell, Normaldüngung

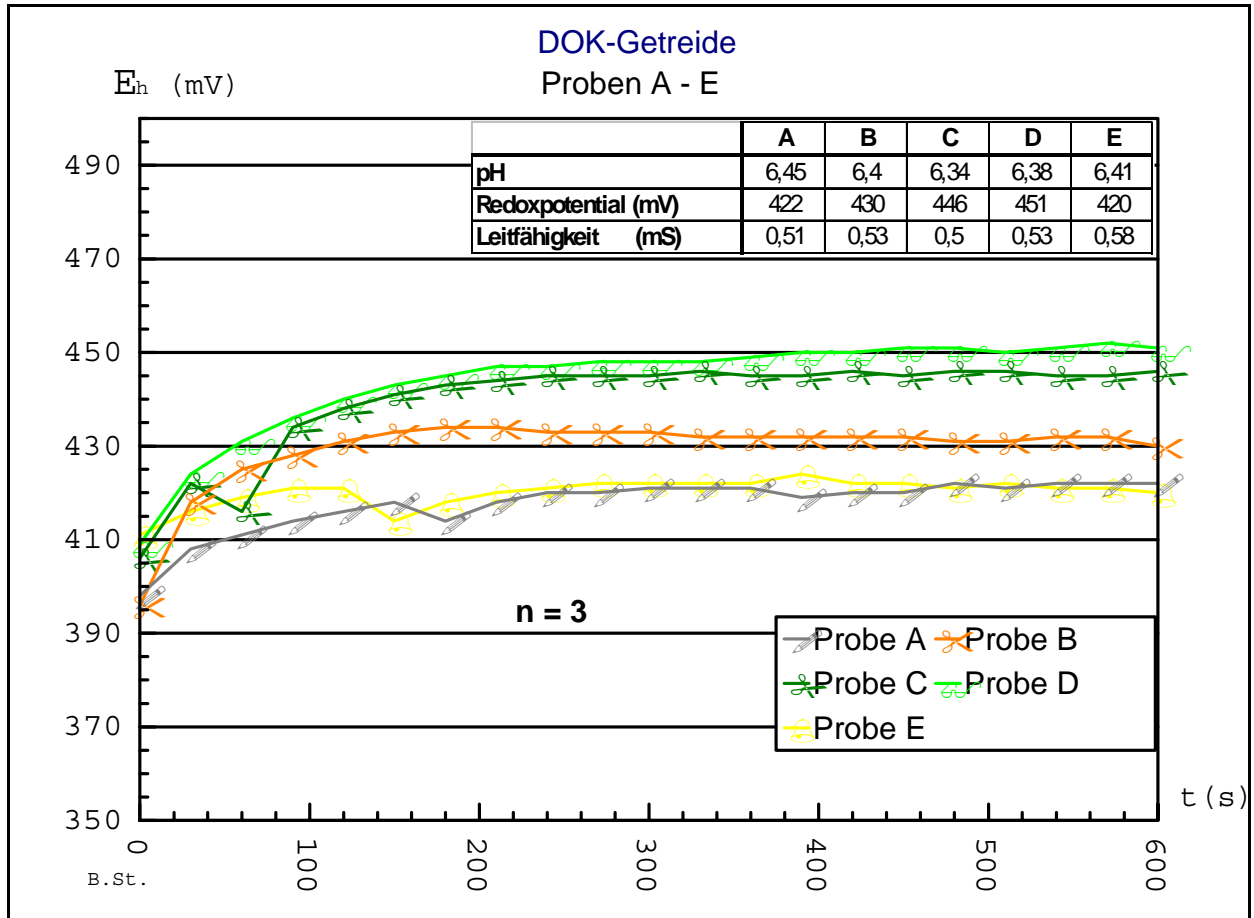


Abbildung 120: Elektrochemische Messungen der Weizenproben A-E, DOK-Versuch, Frühjahr 2003

ANOVA-Auswertung: P-Wert 0,0000, homogene Gruppen A,E # B # C,D

Diskussion: Die beiden biologischen Düngungsvarianten unterscheiden sich von den anderen Proben durch die deutlich höheren Redoxpotenziale. Während die konventionelle Düngung keinen Einfluss auf die Stresssituation der Pflanze gegenüber der Nullvariante zeigt, wirken sich auch hier die anderen Düngungsvarianten negativ auf den Weizen aus.

4.4.5.3 Weizen DOK Herbst 2003

Auch bei dieser Messung standen wieder 5 Proben zur Untersuchung bereit, die jeweils aus 4 Einzelproben bestanden.

- Probe A (A 1, A 2, A 3, A 4) konventionell, Normaldüngung
- Probe B (B 1, B 2, B 3, B 4) organisch-biologisch
- Probe C (C 1, C 2, C 3, C 4) biologisch-dynamisch
- Probe D (D 1, D 2, D 3, D 4) konventionell mineralisch
- Probe E (E 1, E 2, E 3, E 4) ungedüngt

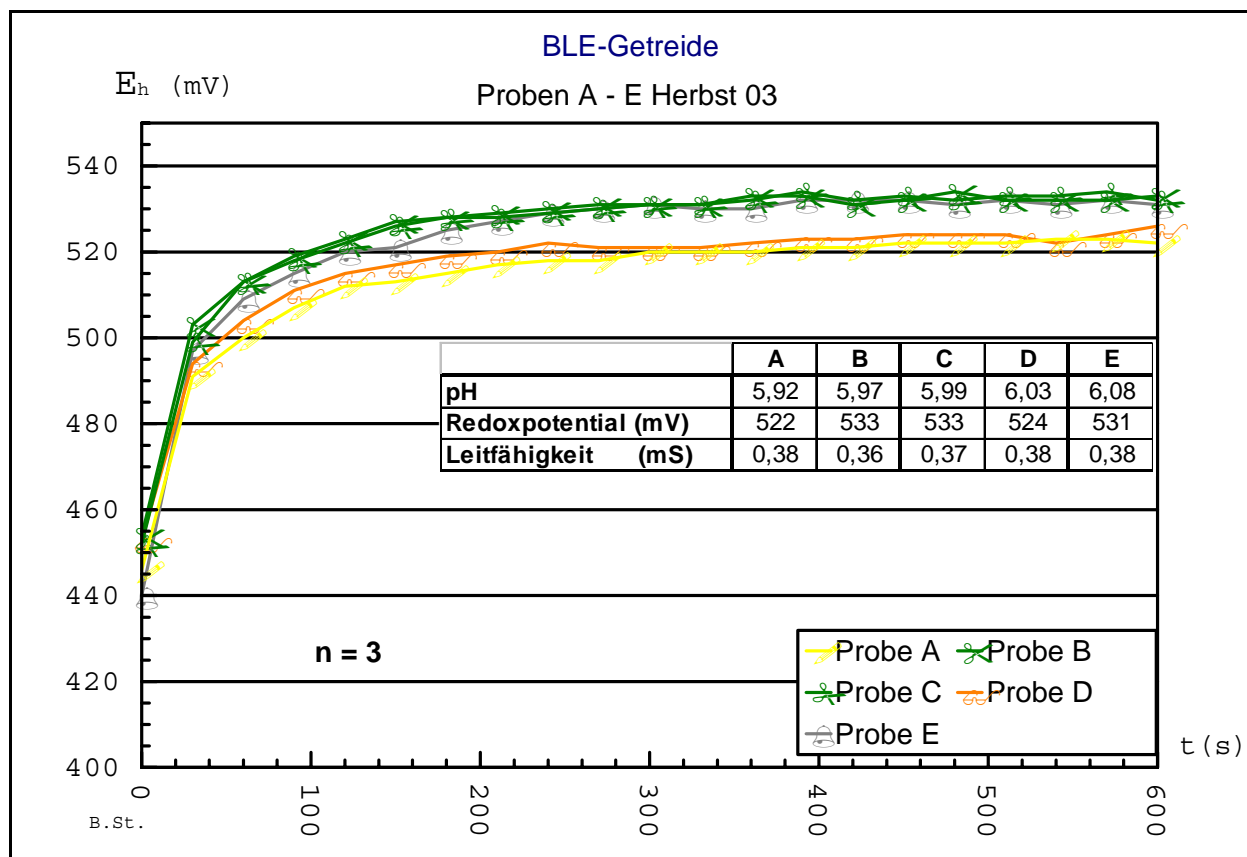


Abbildung 121: Elektrochemische Messungen Weizen DOK, Herbst 2003

ANOVA-Auswertung: P-Wert 0,0000, homogene Gruppen A, D # B, C, E

Diskussion: Die beiden biologischen Düngungsvarianten unterscheiden sich von den konventionellen Proben durch die deutlich höheren Redoxpotenziale, wie bereits bei der Probe vom

Frühjahr 2003. Während die biologische Düngung keinen Einfluss auf die Stresssituation der Pflanze gegenüber der Nullvariante zeigt, wirken sich hier die konventionellen Düngungsvarianten positiv auf den Weizen aus.

4.4.5.4 Möhren Uni Kassel M22 / M55

- 2 Varianten als Bulkprobe, 1 Variante ungedüngt, 1 Variante mit 150 kg N/ha

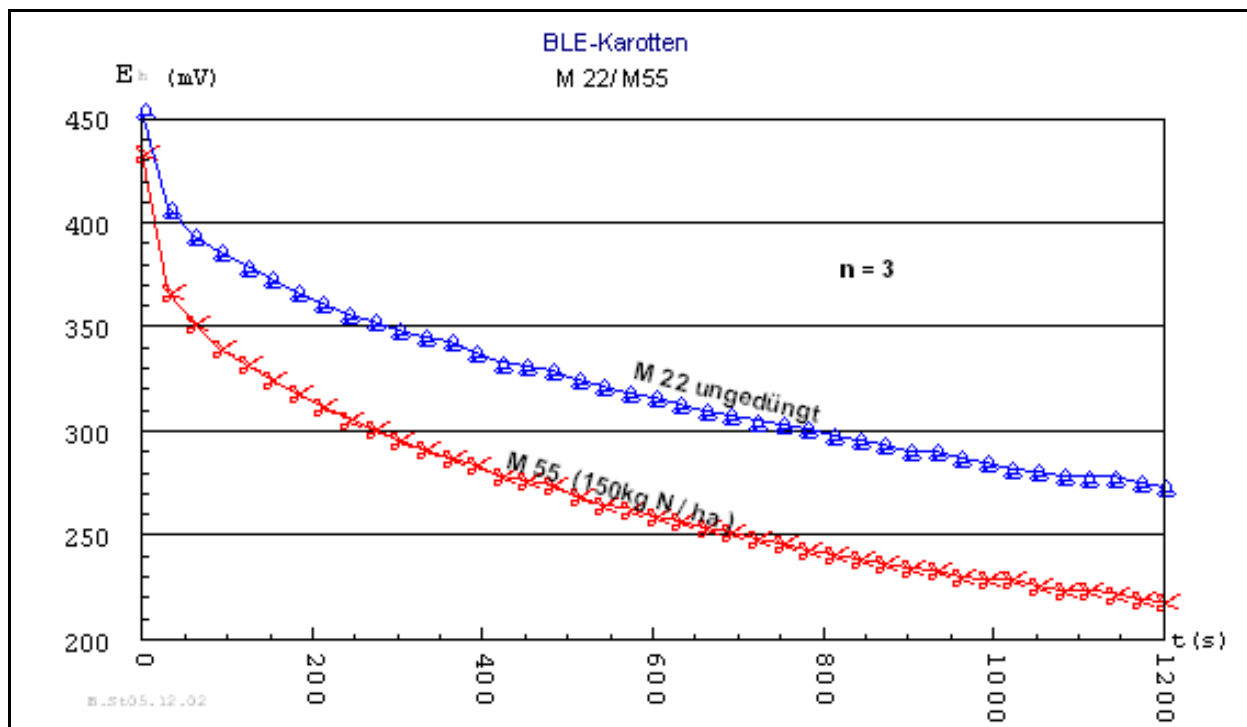


Abbildung 122: Elektrochemische Messungen der Karotten M22 / M55

ANOVA-Auswertung: P-Wert (Redox) = 0,0001

Diskussion: Die beiden Proben lassen sich elektrochemisch signifikant trennen. Ein Unterschied im Redoxpotenzial dieser Größenordnung ist nach den bisher vorliegenden Erfahrungen nicht mehr auf die Düngung allein zurückzuführen.

4.4.5.5 Möhren Uni Kassel M11 / M44

- 2 Varianten als Bulkprobe, 1 Variante ungedüngt (M 11), 1 Variante (M 44) mit 150 kg N / ha

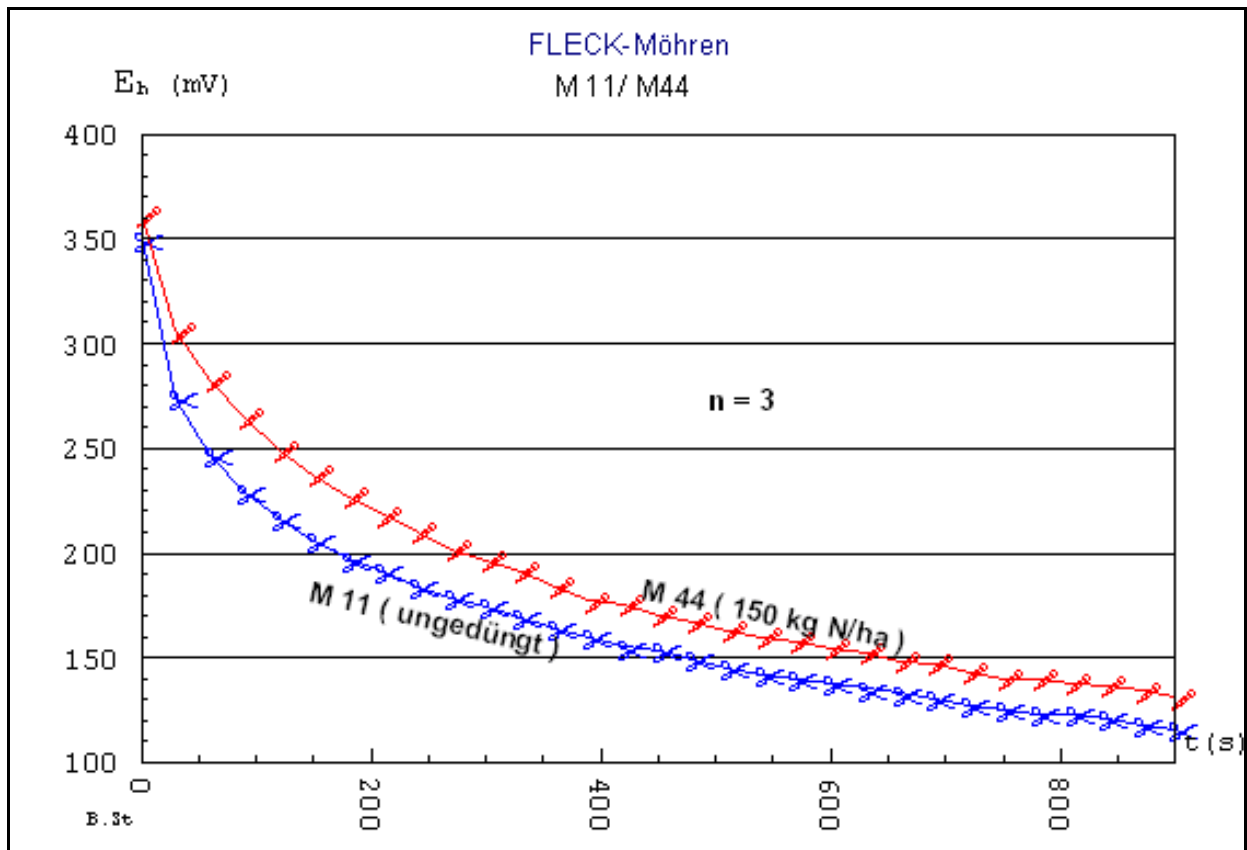


Abbildung 123: Elektrochemische Messungen Möhren Uni Kassel M11 / M44

ANOVA-Auswertung: P-Wert = 0,0148

Diskussion: Eine Trennung der Proben ist über das Redoxpotenzial eindeutig möglich, wie aus den Graphiken deutlich sichtbar wird. Eine elektrochemische Bewertung der Proben war nicht möglich, da sich die Möhren in einem physiologisch sehr schlechten Zustand befanden. Höhere Redoxwerte können sowohl eine Stresssituation für die Pflanze als auch Stoffwechselprodukte von Fäulnis und Schimmelbefall sein.

4.4.5.6 Möhren Uni Kassel

- 2 Varianten als Bulkprobe, M88 ungedüngt, M 77 mit 150 kg N/ha

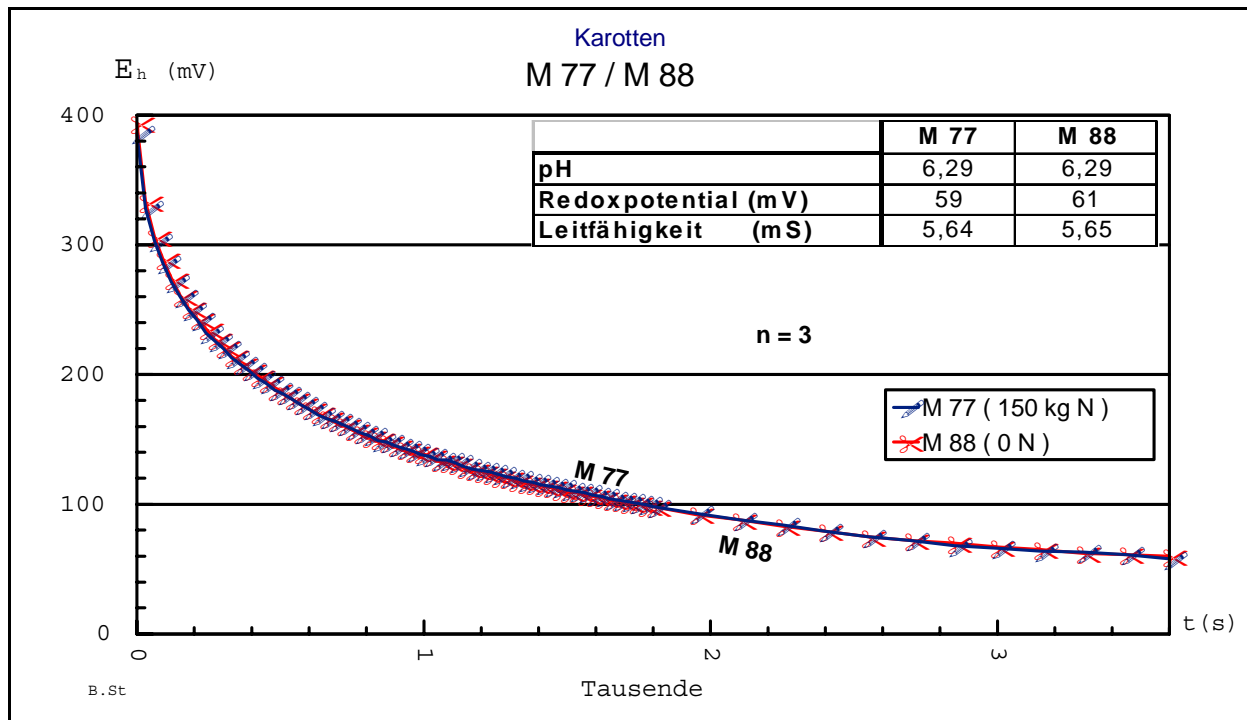


Abbildung 124: Elektrochemische Messungen Möhren Uni Kassel M 77 / M 88

ANOVA-Auswertung: P-Wert = 0,84

Diskussion: Die beiden Proben sind nach elektrochemischen Kriterien vollkommen identisch, sie unterscheiden sich in keinem der 3 Parameter (pH-Wert, Redoxpotenzial, Leitfähigkeit).

4.4.5.7 Möhren FIBL E, F, G

- 3 Varianten als Bulkprobe,
- 2 Varianten Hybride (E, F),
- 1 Variante Populationssorte (G)

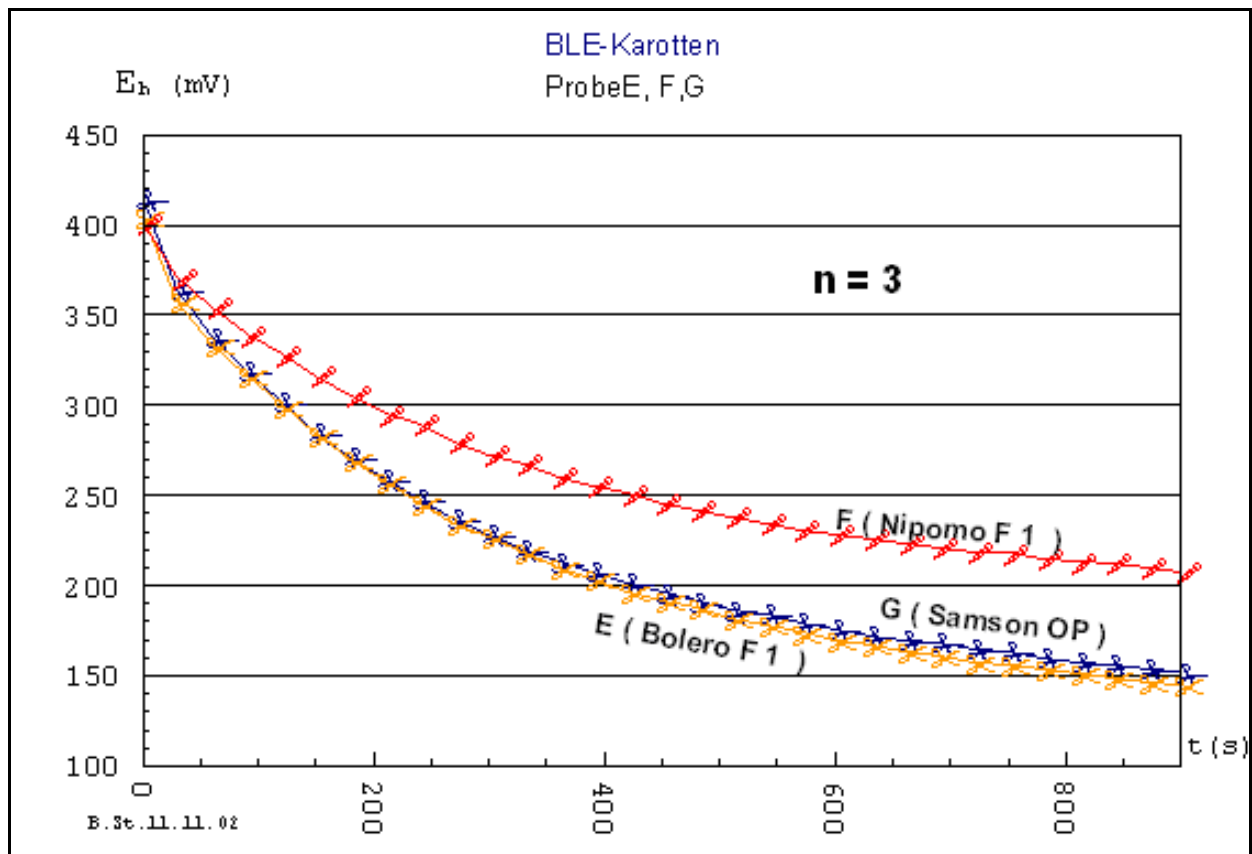


Abbildung 125: Elektrochemische Messungen Möhren FIBL E, F, G

ANOVA-Auswertung: P-Wert = 0,0053, homogene Gruppen F # E;G

Diskussion: Setzt man gleiche Bodenverhältnisse bei den 3 Karottenproben voraus, so sind die Proben E und G wesentlich besser an den Boden und die klimatischen Bedingungen angepasst als Probe F.

4.4.5.8 Möhren FIBL H bis L

- 4 Varianten als Bulkprobe,
- 2 Varianten (J ,K) Hybride,
- 2 Varianten (H, L) Populationssorten.

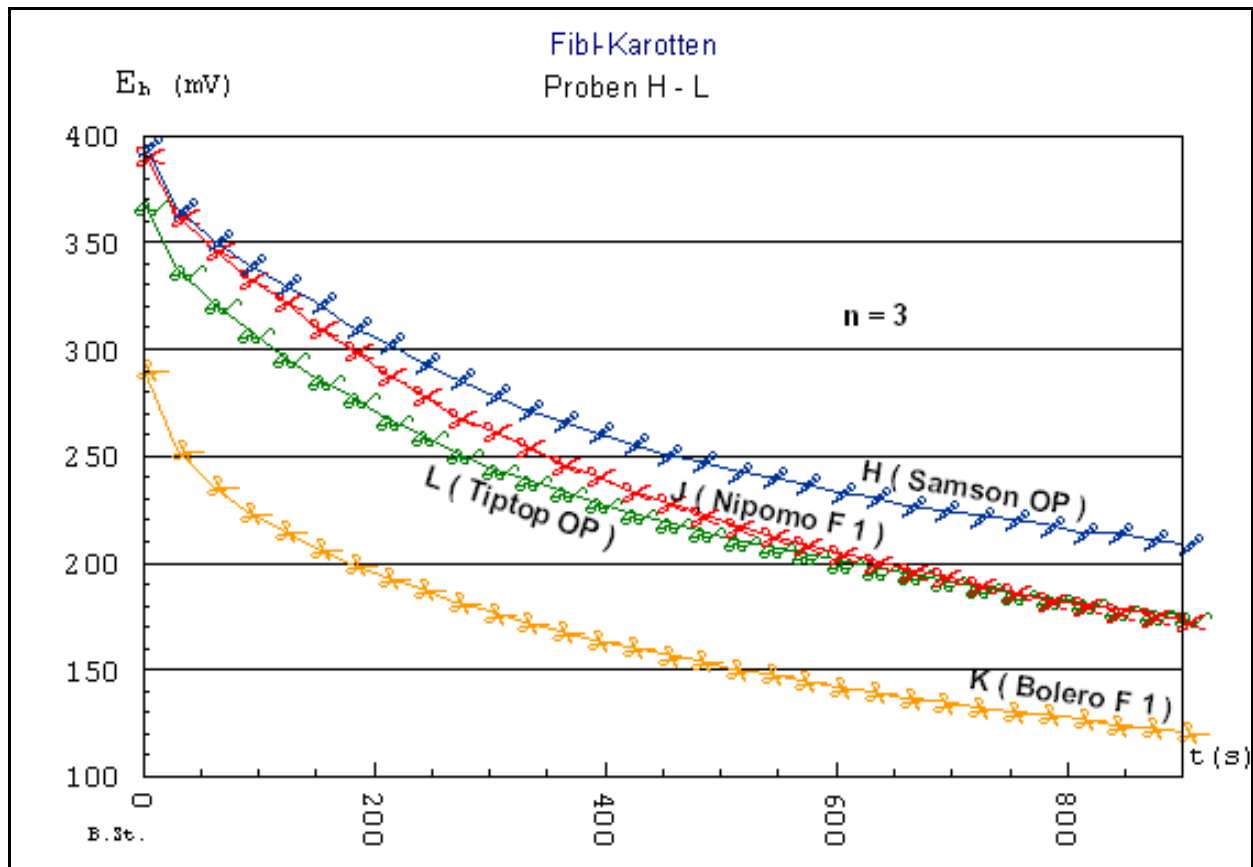


Abbildung 126: Elektrochemische Messungen Möhren FIBL H, J, K, L

ANOVA-Auswertung: P-Wert = 0,0000, homogene Gruppen H#K# J, L

Diskussion: Obwohl es sich um die gleichen Proben wie in der vorhergehenden Messung handelt, zeigen die Karotten ein völlig anderes elektrochemisches Verhalten. Während bei der Messung im Herbst die Sorten Bolero und Samson elektrochemisch nicht zu unterscheiden waren, hat sich die Lagerung auf die Sorte Samson ungünstig ausgewirkt. Eine Trennung von Hybrid- und Populationssorten war auch hier nicht möglich, doch unterscheiden sich die beiden Sorten Bolero und Samson signifikant von den anderen.

4.4.5.9 Möhren FIBL A - D

- 4 Varianten als Bulkprobe,
- 2 Varianten (B, C) Hybride,
- 2 Varianten (A, D) Populationssorten

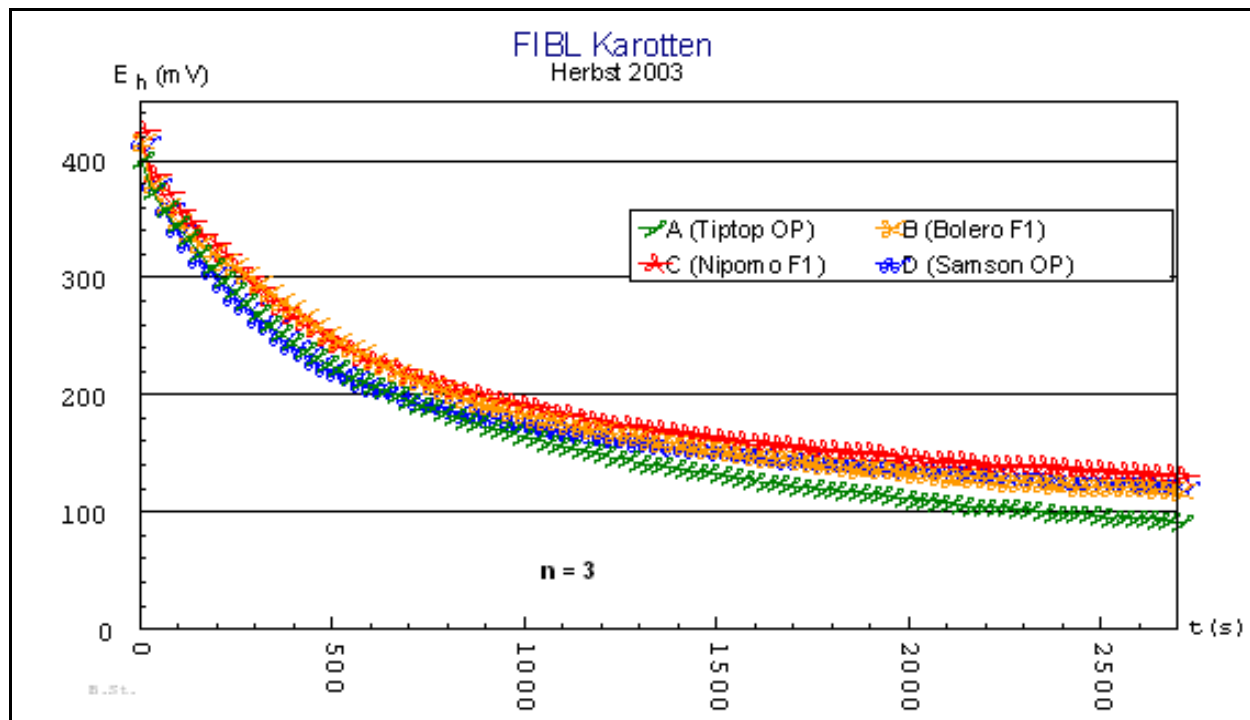


Abbildung 127: Elektrochemische Messungen Möhren FIBL A bis D

ANOVA-Auswertung: P-Wert = 0,0000, homogene Gruppen A#C# B,D

Diskussion: Eine Trennung zwischen Hybrid- und Populationssorten war auch hier nicht möglich, jedoch unterscheiden sich die Sorten (außer B von D) elektrochemisch signifikant.

Der Versuch mit den Hybridsorten im Vergleich zu den Populationssorten zeigt deutlich, dass das qualitätsbestimmende Kriterium die Adaption der Pflanze an die Standortbedingungen ist. Vergleiche dieser Art sind deshalb nur dann sinnvoll, wenn sie über einen längeren Zeitraum durchgeführt und dann statistisch ausgewertet werden.

4.4.6 Abschätzung der Eignung der Methode für die Fragestellung

Abgeleitet aus den Hauptsätzen der Thermodynamik bedeutet ein niedriges Redoxpotenzial ein höheres Maß an Freier Energie. Für Lebensmittel wäre dies gleichbedeutend mit der Fähigkeit, dem Körper mehr verfügbare Energie bei gleicher Menge an Nahrungsmitteln zur Verfügung stellen zu können. Betrachtet man den zunehmenden Verlust von essentiellen Inhaltsstoffen, verursacht durch zweckorientierte Züchtung nach optischen, organoleptischen und wirtschaftlichen Kriterien, so wäre die Auswahl nach elektrochemischen Parametern ein denkbarer Weg, in der Qualitätsbeurteilung von Lebensmitteln neue Wege einzuschlagen.

In der praktischen Anwendung eignet sich die Methode erfahrungsgemäß optimal zur Beurteilung von Prozesskontrollen in der Lebensmittelverarbeitung, zur Beurteilung der biologischen Aktivität von Böden, zur Abschätzung von Sorteneignung für bestimmte Anbaulagen und zur Beurteilung der ernährungsmedizinischen Relevanz durch entsprechende *in vivo*- und *in vitro*-Tests.

Zur weiteren direkten Nutzenanwendung sind die bereits angelaufenen ernährungsmedizinischen Forschungen zum Nachweis der Gesundheitsrelevanz von natürlich angebauten und stressarm verarbeiteten und damit reduzierten Lebensmitteln verstärkt fortzusetzen.

4.4.7 Aussage über den möglichen Einsatz der Methode für andere Fragestellungen

Der Nutzen für den Öko-Anbau ergibt sich speziell in der Anbauberatung durch Abschätzung des zu erwartenden Stressbelastungsrisikos.

Die in den letzten Jahren durchgeführten Messungen haben gezeigt, dass eine höhere Stressbelastung der Pflanzen sich in höheren Redoxwerten widerspiegelt. Der wesentliche Einfluss der Bodenqualität auf Kartoffeln ist aus Abbildung 128 ersichtlich. Hier wurden unter Versuchsbedingungen (Einheitsboden) verschieden Kartoffelsorten angebaut. Weitere Ergebnisse zum Komplex Boden/Qualität liegen für Karotten, Tabak und Tomaten vor.

Aus der Studie „Standortvergleich zwischen pilzwiderstandsfähigen und traditionellen Rebsorten nach elektrochemischen Kriterien“ (DELINAT 2002) geht hervor, dass bei geeigneter Auswahl der pilzresistenten Rebsorten wesentlich bessere Weine erzeugt werden können, die zu einer starken Reduzierung von Spritzmitteln und einem reduzierten Arbeitseinsatz im Weinberg führen.

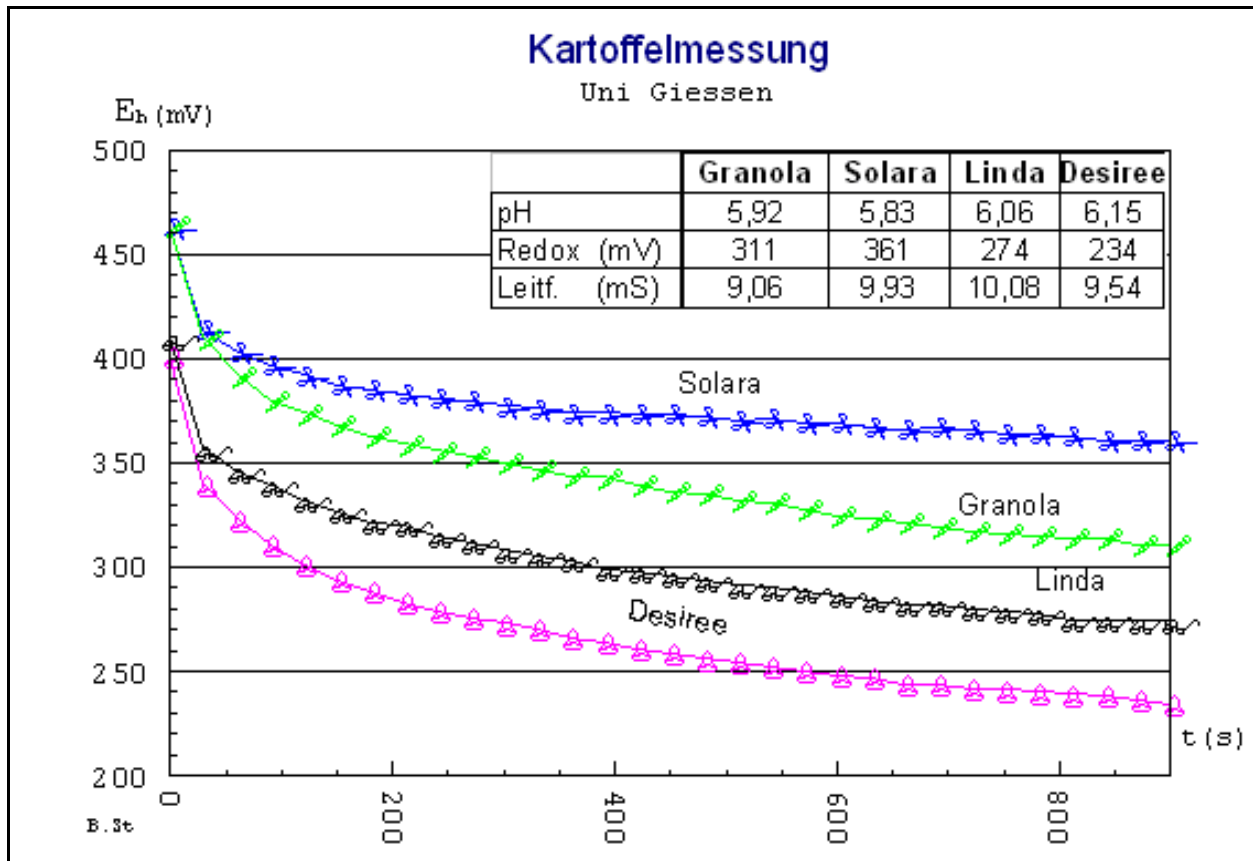


Abbildung 128: Elektrochemische Messungen an Kartoffeln

Ein seit 3 Jahren laufender Vergleich von irischen Lachs (normale Haltung / Biolachs) ergab, dass sich die geringere Besatzdichte und das Futter im niedrigerem Redoxpotenzial des Fleisches beim Biolachs widerspiegeln. Dies zeigte sich auch bei einem Vergleich zwischen Forellen aus normalen Zuchtbedingungen im Vergleich zu Bio-Forellen. Weitere Versuche zur Bestimmung der elektrochemischen Parametern an anderen Fischen werden seit Mitte dieses Jahres von der Bundesanstalt für Fischerei durchgeführt.

4.5 HPLC-Messungen - Test Methode Polyphenole (A. Werries)

4.5.1 Beschreibung der Methode

Mit den vorliegenden Untersuchungen wurde innerhalb des Projektes „Validierung ganzheitlicher Verfahren 020E170“ eine Methode, die für Messungen des Polyphenolgehaltes in Äpfeln entwickelt wurde, für Möhren- und Weizenproben aus definierten Anbausystemen weiterentwickelt.

Dem Verfahren liegt der Gedanke zugrunde, den physiologischen Status von Kulturpflanzen anhand einer Substanzklasse der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe mit dem Bezug zum Anbausystem zu charakterisieren.

Stoffe, die in der Pflanze nicht im Primärstoffwechsel gebildet und verbraucht werden, nennt man sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Aus den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wurde die Substanzklasse der Polyphenole für diesen Zweck gewählt, weil sie innerhalb der Pflanze verschiedene Funktionen in der Interaktion mit der Umwelt und der Regulation von Stoffwechsellleistungen besitzen. In Untersuchungen wurde die Induktion der Pflanzenabwehr und die Synthese dieser Stoffe durch biotische und abiotische Einflussgrößen beschrieben (ALT 1980, COLE 1984). Eine Abhängigkeit des Polyphenolgehaltes vom Anbausystem erscheint daher möglich.

Die Gruppe der Polyphenole besteht aus mehreren tausend (derzeit) bekannten Substanzen, die als gemeinsames Merkmal über einen oder mehrere phenolische(n) Ring(e) verfügen. Die meisten phenolischen Komponenten leiten sich von der Aminosäure Phenylalanin her. Auch die Aminosäure Tyrosin wird als Vorläufer diskutiert. Wichtige Vertreter innerhalb der Gruppe sind die Flavonoide aber auch die Hydroxycimtsäuren und Benzoesäuren. Weitere phenolische Grundgerüste sind Cumarin, Stilben, Antrachinon.

Polyphenole haben in der Pflanze folgende Funktionen:

- „Attraktivitätssteigerung“ gegenüber Bestäubern in Form von Farbpigmenten (Anthocyane)
- Abwehreffekte gegenüber Fraßfeinden durch die Bildung mechanischer Barrieren (z.B. Lignin)
- Abwehreffekte durch abschreckende Wirkung (z.B. in Form von Bitterstoffen wie Isocumarin)
- Abwehreffekte gegenüber Fraßfeinden durch bakterizide und toxische Prinzipien (Phytoalexine)
- Abwehreffekte gegenüber Fraßfeinden durch hormonelle Wirkungen
- Abwehr gegenüber Konkurrenten am Standort (Beeinflussung der Chlorophyllsynthese, Manipulation des Membranpotenzials, Hinderung des Wurzelwachstums von Konkurrenten am Standort)
- Schutzfunktionen für Chlorophyll gegenüber UV-Strahlung

Weiterhin besitzen die Polyphenole auch für die menschliche Ernährung eine gewisse Bedeutung durch:

- Allgemeine antioxidative Kapazität (Flavonoide)
- Eigenschaften als wirksame Quencher der radikalischen Oxidation (Quercetin, Rutin)
- Eigenschaften als Antilipid-Peroxidantien
- Eigenschaften als Auslöser der Apoptose (Falcarinol)

4.5.2 Stand der Methoden zu Projektbeginn

Die Fragestellung der vorliegenden Untersuchungen ist es zu zeigen ob es möglich ist, Möhren bzw. Weizen aus unterschiedlichen Anbausystemen anhand des Polyphenolspektrums zu differenzieren.

Zur Analytik der Polyphenole wird in der Regel ihre Fähigkeit zur Lichtabsorption genutzt. Das Absorptionsmaximum der Phenole hängt dabei von ihrer Struktur ab (MABRY et al. 1970). Die Größe und die Komplexität des Moleküls entscheiden darüber, ob ein Phenol farbig erscheint oder lediglich UV-Licht absorbiert. Diese UV-Absorption (zwischen 220 und 300 nm) ist allen Phenolen gemeinsam.

Für den Nachweis von Polyphenolen in Pflanzenproben werden photometrische Methoden sowie Papier- oder Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Gelegentlich wurde auch die Gaschromatographie für die Trennung von Phenolen verwendet. Dies setzt jedoch eine Derivatisierung von nicht flüchtigen Polyphenolen voraus.

Ein direkter Nachweis von Polyphenolen, das heißt ohne vorherige Derivatisierung, kann mittels der reversed - phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) geführt werden. Zur Detektion werden meistens Spektralphotometer verwendet, deren Wellenlänge frei wählbar ist. Durch die Wahl einer bestimmten Wellenlänge können einzelnen Klassen von Polyphenolen selektiv detektiert werden (s. Tabelle 45)

Phenol Gruppe	Absorptionsmaximum (nm)
Isoflavone	250 – 275
Flavanole	280
Hydroxyzimtsäuren	290 – 330
Flavanone	270- 290
Benzochinone	260 – 280, 375 – 410
Stilbene	ca. 300
Flavonole	340 – 380

Tabelle 45: UV-Absorption ausgewählter phenolischer Substanzen
(nach: FEUCHT und TREUTTER 1989)

Dioden-Array-Detektoren (DAD) sind in der Lage gleichzeitig die Lichtabsorption mehrerer Wellenlängen zu messen. Mit einem DAD ist es somit möglich während einer Analyse die

Absorptionsspektren aller Peaks zu messen und damit Hinweise auf die Identität einzelner Substanzen zu erhalten. HPLC-Methoden sind in der Literatur (RECHNER 2001, TCHONÉ 2002, TREUTTER 1988) für die Analytik des Polyphenolspektrums in unbekanntem Proben beschrieben. Für die Analytik des vorliegenden Projektes sollte in den ersten Versuchen - in Zusammenarbeit mit dem Institut für Obstbau (Prof. Dr. Treutter) am Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW) -, eine bereits etablierte HPLC-Methode (TREUTTER 1988) zur Bestimmung des Polyphenolmusters in Äpfeln, an die Bestimmung dieser Substanzklasse in Möhren- und Weizenproben angepasst und hinsichtlich einiger methodenspezifischer Kenngrößen charakterisiert werden.

Begleitend wurden Analysen an Möhren- und Weizenproben aus kontrollierten Anbauversuchen (FIBL, Schweiz) durchgeführt. Analysiert wurde Probenmaterial, welches zum Zeitpunkt der Untersuchung codiert war.

Die Untersuchungen wurden in zwei Versuchsreihen einmal in Freising (WZW) im Jahr 2002 und zum anderen an der Universität Kassel / Witzenhausen im Jahr 2003 durchgeführt. Für Möhren und Weizen wurden methanolische Extrakte sowie Extrakte mittels saurer Hydrolyse hergestellt und mit der HPLC untersucht.

Die Detektion der Peaks erfolgte in der ersten Versuchsreihe mit einem UV-VIS Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm, in der zweiten mittels eines Diodenarraydetektors (DAD) bei einer Wellenlänge von 280 nm. Eine Auswertung der Messungen erfolgte anhand der Messergebnisse (Peakfläche bezogen auf den internen Standard 6-Methoxy-Flavon) für die einzelnen Peaks.

4.5.3 Vorbereitung

4.5.3.1 Möhren (2002, WZW)

4.5.3.1.1 Probenmaterial

Das untersuchte Probenmaterial stammt aus unterschiedlichen Anbauversuchen und wurde in zwei verschiedenen Partien geliefert.

Probe: Möhren (*Daucus carota*)

Lieferant: FAL

Herkunft: Universität Kassel, Domäne Frankenhausen

Lieferdatum: 28.10.02

Geliefert wurden zwei Bulkproben Möhren von der Universität Kassel, Domäne Frankenhausen:

- M 33 - 20 Stück
- M 66 - 20 Stück

Diese Proben werden im weiteren als "Möhre 33" bzw. "Möhre 66" bezeichnet.

Probe: Möhren (*Daucus carota*)

Lieferant: FAL

Herkunft: Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL), CH 5070 Frick

Lieferdatum: 11.11.02

Geliefert wurden 3 Bulk-Proben:

- Möhre G - 16 Möhren
- Möhre F - 16 Möhren
- Möhre E - 16 Möhren

4.5.3.1.2 Methoden

Probenvorbereitung

Die Möhren wurden unter fließendem Wasser gründlich von anhaftenden Erdpartikeln gereinigt, wobei eine Verletzung der äußeren Schale vermieden wurde. Anschließend wurden die gewaschenen Möhren zu Dokumentationszwecken fotografiert und der Zustand der einzelnen Bulkproben dokumentiert. An beiden Enden jeder Möhre wurde ein 2 cm langes Stück abgeschnitten und verworfen. Der verbliebene Rest wurde als Probe weiter verarbeitet.

Für die weitere Verarbeitung wurden die Möhrenproben in ca. 4mm dicke Scheiben geschnitten, schadhafte Stellen wurden verworfen. Die Scheiben wurden gefriergetrocknet und in einer Schwingmühle (Retsch MM2) staubfein gemahlen.

Methanolische Extrakte

Von diesem Pulver wurden unterschiedliche Mengen – 0,1 g, 0,2g und 0,5 g – mit jeweils 1 ml Methanol + Standard (6-Methoxy-Flavon = 0,1 mg/ml) versetzt und bei 4 °C für 30 min im Ultraschallbad extrahiert. Die Proben wurden dekantiert und der Überstand zur HPLC eingesetzt. Von jeder Probe wurden 5 Wiederholungen angefertigt und anschließend vermessen.

Nach der HPLC-Untersuchung zeigte es sich, dass die Konzentration zu niedrig war. Daher wurden die Proben aufkonzentriert. Dafür wurden 700 µl jeder Probe im Rotationsvakuumverdampfer

(Uniequip) eingedampft, der Rückstand in 150 µl Methanol (100%) aufgenommen. Die Lösung wurde zentrifugiert (Zentrifuge: Hettich 1110, Mikro 22R; 10 min bei 4 °C) Der Überstand wurde für die HPLC verwendet.

Saure Hydrolyse mit Möhrenproben

Je 0,2 g gefriergetrocknetes Möhrenpulver wurden in ein Schraubdeckelröhrchen (10 ml) eingewogen und 3 ml eines Gemisches (1 :1, v : v) aus Methanol (+ Methoxy-Flavon = 0,1 mg/ml) und Salzsäure zugegeben. Diese Mischung wurde für 30 min. im Ultraschallbad extrahiert und nachfolgend im Wasserbad für 30 min. gekocht. Nach dem Zentrifugieren (10 min. bei 10.000 g) wurde der Überstand (ca. 2 ml) dekantiert. Dem Überstand werden 2,5 ml Ethylacetat zugegeben und das Gemisch ausgeschüttelt. Um die Phasentrennung zu beschleunigen wurde dieser Mischung etwas Wasser (HPLC Grade) zugegeben. Die obere (methanolisch-wässrige) Phase wurde abpipettiert und weitere zwei Male mit jeweils 2,5 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphasen wurden in einen 20 ml Kolben zusammengefasst und in einem Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 500 µl Methanol (p.a.) aufgenommen, nochmals zentrifugiert (10 min., 10000 g, 4 °C) und der Überstand dekantiert. Dieser Extrakt wurde für die HPLC eingesetzt.

4.5.3.2 Möhren (2003, Universität Kassel)

4.5.3.2.1 Probenmaterial

Probe: Möhren (*Daucus carota*)

Lieferant: FAL

Herkunft: Universität Kassel, Domäne Frankenhausen

Geliefert wurden zwei Bulk-Proben:

- M 77 (Möhre 77)
- M 88 (Möhre 88)

Probe: Möhren (*Daucus carota*)

Lieferant: FAL

Herkunft: Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL), CH 5070 Frick

Geliefert wurden 4 Bulk-Proben:

- Möhre A - ca. 100 Stck
- Möhre B - ca. 100 Stck

- Möhre C - ca. 100 Stck
- Möhre D - ca. 100 Stck

Von jeder Probe wurde eine nach Größen- und Gewichtsverteilung repräsentative Probe zusammengestellt und weiter verarbeitet.

4.5.3.2.2 Methoden

Probenvorbereitung

Die weitere Verarbeitung und Extraktion erfolgte für die Möhren 77 und 88 sowie für die Möhren A, B, C und D gleichermaßen.

Alle Möhren wurden unter fließendem Wasser gründlich von anhaftenden Erdpartikeln gereinigt, wobei eine Verletzung der äußeren Schale vermieden wurde. Anschließend wurden die gewaschenen Möhren zu Dokumentationszwecken fotografiert und der Zustand der einzelnen Bulkproben dokumentiert.

An beiden Enden jeder Möhre wurde ein ca. 2 cm langes Stück abgeschnitten und verworfen. Der verbliebene Rest wurde in ca. 4mm dicke Scheiben geschnitten, schadhafte Stellen wurden verworfen. Die Scheiben wurden für 4 Tage gefriergetrocknet und in einer Zentrifugalmühle (Retsch, ZMP 100, Sieb 0,5 mm) gemahlen.

Methanolische Extrakte

Von dem Möhrenpulver wurden jeweils 5g in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) eingewogen und mit 20 ml Methanol + Standard (6-Methoxy-Flavon = 0,03 mg/ml) für 30 min im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min zentrifugiert (Zentrifuge: Hettich, Biofuge R, 4000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und in einem Rotationsverdampfer (Heidolph, Laborota 4000 efficient) bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 3 ml Methanol (100%) aufgenommen. Die Lösung wurde zentrifugiert (10 min bei 4 °C, 4000 rpm) und der Überstand für die HPLC verwendet.

Lösungen dieser Art wurden für die Proben 77 und 88 sowie für die Proben A, B, C und D in jeweils 5-facher Ausführung angefertigt und mit der HPLC vermessen.

Saure Hydrolyse mit Möhrenproben

5 g gefriergetrocknetes Möhrenpulver wurden in eine Schottflasche (50 ml) eingewogen und 20 ml

eines Gemisches (1:1, v:v) aus Methanol (Methanol + Methoxy-Flavon = 0,1 mg/ml) und Salzsäure zugegeben. Diese Mischung wurde für 30 min. Ultraschallbad extrahiert und nachfolgend im Wasserbad für 30 min. gekocht. Nach dem Zentrifugieren (10 min., 4000 rpm) wurde der Überstand (ca. 15 ml) dekantiert. Dem Überstand wurden 18 ml Ethylacetat zugegeben und das Gemisch ausgeschüttelt. Um die Phasentrennung zu beschleunigen wurde dieser Mischung etwas Wasser (HPLC Grade) zugegeben. Die obere (methanolisch-wässrige) Phase wurde abgenommen, in ein Schraubdeckelröhrchen überführt und weitere zwei Male mit jeweils 18 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphasen wurden in einem 50 ml Kolben zusammengefasst und in einem Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in 3 ml Methanol (p.a.) aufgenommen, nochmals zentrifugiert (10 min., 4000 rpm, 4 °C) und der Überstand dekantiert.

Lösungen dieser Art wurden für die Proben 77 und 88 sowie für die Proben A, B, C und D in jeweils 5-facher Ausführung angefertigt und für die HPLC eingesetzt.

4.5.3.3 Weizen (2002, WZW)

4.5.3.3.1 Probenmaterial

Das Material für die untersuchten Weizenproben stammte aus kontrollierten Anbauversuchen (DOK-Versuch) und war zum Zeitpunkt der Auslieferung codiert. Geliefert wurden 20 Weizenproben (Lieferant: FAL, Institut für ökologischen Landbau). Bei den Proben handelte es sich um 4 Feldwiederholungen von 5 Anbauvarianten (2x aus konventionellem Anbau, 2x aus ökologischem Anbau und eine ungedüngte Nullvariante). Die Lieferung erfolgte am 21.10.2002.

Folgende Proben wurden angeliefert:

A 15	B 87	C 159	D 249	E 303
A 33	B105	C 177	D 231	E 321
A 69	B 123	C 195	D 267	E 339
A 51	B141	C 213	D 285	E 356

Der Umfang jeder einzelnen Probe betrug ca. 500g (ganze Körner). Von jeder Probe wurden im weiteren Verlauf 100g in einer Schwingmühle fein gemahlen.

4.5.3.3.2 Methoden

Methanolische Extraktion

Das gemahlene Material wurde in unterschiedliche Mengen – 0,1 g, 0,2 g und 0,5 g – mit jeweils 1 ml Methanol + Standard (6-Methoxy-Flavon = 0,1 mg/ml) versetzt und bei 4 °C für 30 min im Ultraschallbad extrahiert. Die Proben wurden dekantiert und der Überstand zur HPLC eingesetzt. Von jedem Extrakt wurden 5 Wiederholungen angefertigt.

Nach der HPLC Untersuchung zeigten sich – außer dem internen Standard 6-Methoxy-Flavon – keinerlei Anhaltspunkte auf enthaltene Polyphenole. Daher wurden die Proben gegenüber dem Ausgangsextrakt um den Faktor 20 aufkonzentriert, wobei sich der Stärkeanteil der Weizenkörner als begrenzender Faktor für das weitere Aufkonzentrieren der Proben heraus stellte.

Die aufkonzentrierten Proben wurden unter den gleichen Bedingungen für die HPLC eingesetzt. Auch in diesen Extrakten zeigten sich keinerlei Anhaltspunkte auf enthaltene Polyphenole. Diese Art der Extraktion wurde daher nicht weiter verfolgt.

Saure Hydrolyse

Um die Stärkefraktion der Weizenkörner abzutrennen, wurden weitere Extrakte mit der sauren Hydrolyse hergestellt. Dafür wurden jeweils 0,2 g gemahlener Weizen in ein Schraubdeckelröhrchen eingewogen und 3 ml eines Methanol (Methanol + Standard = 6-Methoxy-Flavon, 0,1 mg / ml) / Salzsäure Gemisches (1:1, v:v) zugegeben. Das Gemisch wurde für 30 min. im Ultraschallbad extrahiert und anschließend im Wasserbad 30 min. gekocht. Nach dem Zentrifugieren (10 min. bei 10 000 g) wurde der Überstand (ca. 2 ml) dekantiert. Dem Überstand werden 2,5 ml Ethylacetat zugegeben und das Gemisch ausgeschüttelt. Die obere (methanolisch-wässrige) Phase wurde abpipettiert und weitere zwei Male mit jeweils 2,5 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphasen wurden in einen 20 ml Kolben zusammengefasst und in einem Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 500 µl Methanol (p.a.) aufgenommen und nochmals zentrifugiert (10 min., 10 000 g, 4 °C). Dieser Extrakt wurde für die HPLC eingesetzt.

4.5.3.4 Weizen (2003, Universität Kassel)

4.5.3.4.1 Probenmaterial

Das Material für die untersuchten Weizenproben stammte aus kontrollierten Anbauversuchen und war zum Zeitpunkt der Auslieferung (Lieferdatum: 15.09.03) codiert. Geliefert wurden 5 Weizenqualitäten (2x aus konventionellem Anbau, 2x aus ökologischem Anbau und eine ungedüngte Nullvariante) in jeweils 4 Feldwiederholungen:

A 1	B 1	C 1	D 1	E 1
A 2	B 2	C 2	D 2	E 2
A 3	B 3	C 3	D 3	E 3
A 4	B 4	C 4	D 4	E 4

Die verschiedenen Weizenqualitäten sind mit den Großbuchstaben A-E bezeichnet, die Zahlen bezeichnen die Feldwiederholungen innerhalb einer Probe.

Der Umfang jeder einzelnen Probe betrug ca. 300 g (ganze Körner). Von jeder Probe wurden - nach der Reinigung von Verschmutzungen - im weiteren Verlauf 120 g in einer Zentrifugalmühle (Retsch, Sieb 0,5 mm) gemahlen.

4.5.3.4.2 Methoden

Saure Hydrolyse

Da sich bereits in den Vorversuchen am WZW die methanolische Extraktion des gemahlene Weizen als nicht geeignet herausstellte, wurden die weiteren Extraktionen nur noch mit der sauren Hydrolyse durchgeführt. Im Vergleich zu den Vorversuchen wurde aus labortechnischen Gründen das Probenvolumen erhöht.

Für diese Untersuchungen wurden jeweils 3 g gemahlene Weizens in eine Schottflasche (50 ml) eingewogen und 20 ml eines Methanol (Methanol + Standard = 6-Methoxy-Flavon, 0,03 mg / ml) - Salzsäure-Gemisches (1:1, v:v) zugegeben. Das Gemisch wurde für 30 min. im Ultraschallbad extrahiert und im Wasserbad 30 min. gekocht. Nach dem Zentrifugieren (10 min., 4000 rpm) wurde der Überstand (ca. 15 ml) dekantiert, der Rückstand wurde verworfen. Dem Überstand werden 17 ml Ethylacetat zugegeben und das Gemisch ausgeschüttelt. Die obere (methanolisch-wässrige) Phase wurde abpipettiert und weitere zwei Male mit jeweils 17 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphasen wurden in einen 50 ml Kolben zusammengefasst und in einem Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 3ml Methanol (p.a.) aufgenommen und nochmals zentrifugiert (10 min., 4000 g, 4 °C). Dieser Extrakt wurde für die HPLC eingesetzt. Es wurden verschiedene Gradientenbedingungen mit unterschiedlichen Säulen getestet

Die Vorbereitung und Untersuchung mit der HPLC wurde für jede Probe zweifach durchgeführt.

4.5.3.5 HPLC Bedingungen (2002, WZW)

Die Untersuchung der einzelnen Möhren- und Weizenproben erfolgte im Gradientenbetrieb. Fließmittel A= Ameisensäure (5%), B = Methanol 100% (Gradient Grade). Die Flussrate betrug 0,5 ml / min., das Probenvolumen betrug 10 µl, alle Injektionen wurden von Hand ausgeführt. Der Injectionport wurde nach jeder Injektion mit Methanol gespült.

HPLC System :	Beckman
Detektor:	UV vis Detektor (Beckmann); Messungen bei 280 nm
Säulenmaterial:	1.Shandon Hypersil, 0,3 µm Innendurchmesser: 4mm, 250 mm 2.Shandon Hypersil 0,3 µm, Innendurchmesser 4mm, 145 mm
Software:	Gynkosoft

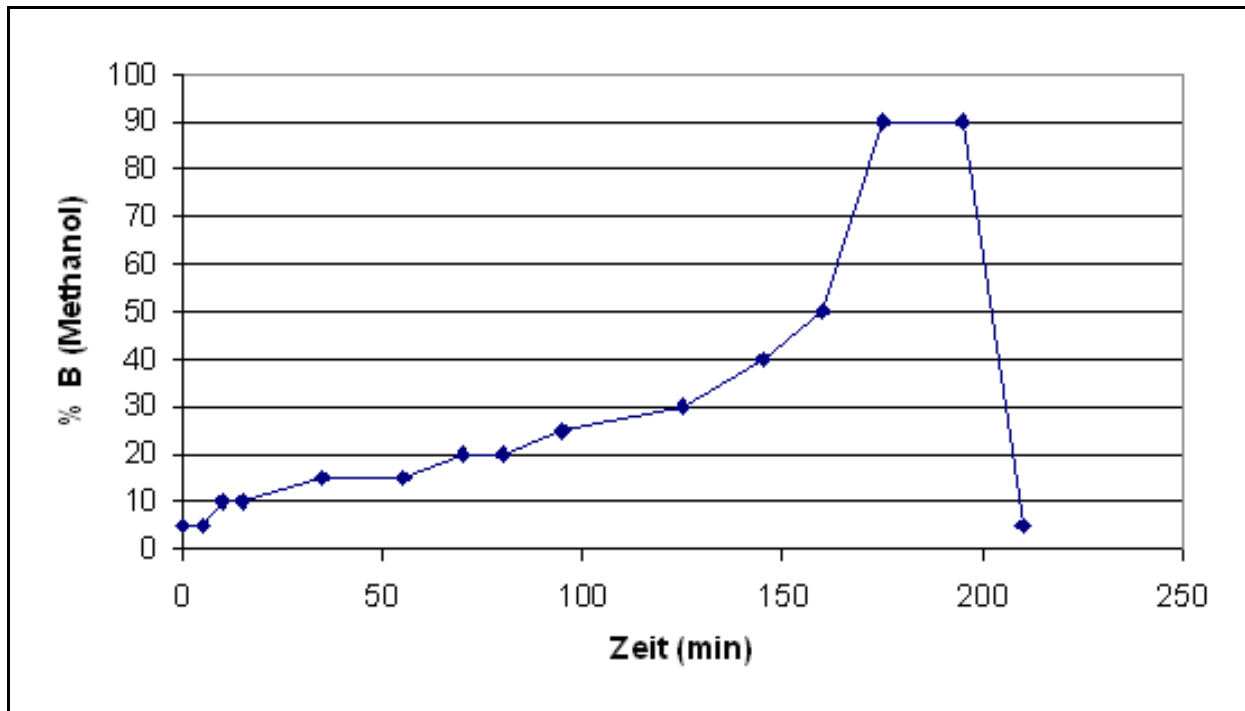


Abbildung 129: Gradientenbedingungen (Gradient 1) für die untersuchten Möhren- und Weizenproben

Nach den ersten Versuchen mit den in Abbildung 129 dargestellten Gradientenbedingungen wurden, um eine bessere Trennung der Peaks in den ersten 50 min. zu erzielen, die Bedingungen verändert. Die letztendlich eingesetzten Gradientenbedingungen für die Messungen der Proben sind in der Abbildung 130 dargestellt.

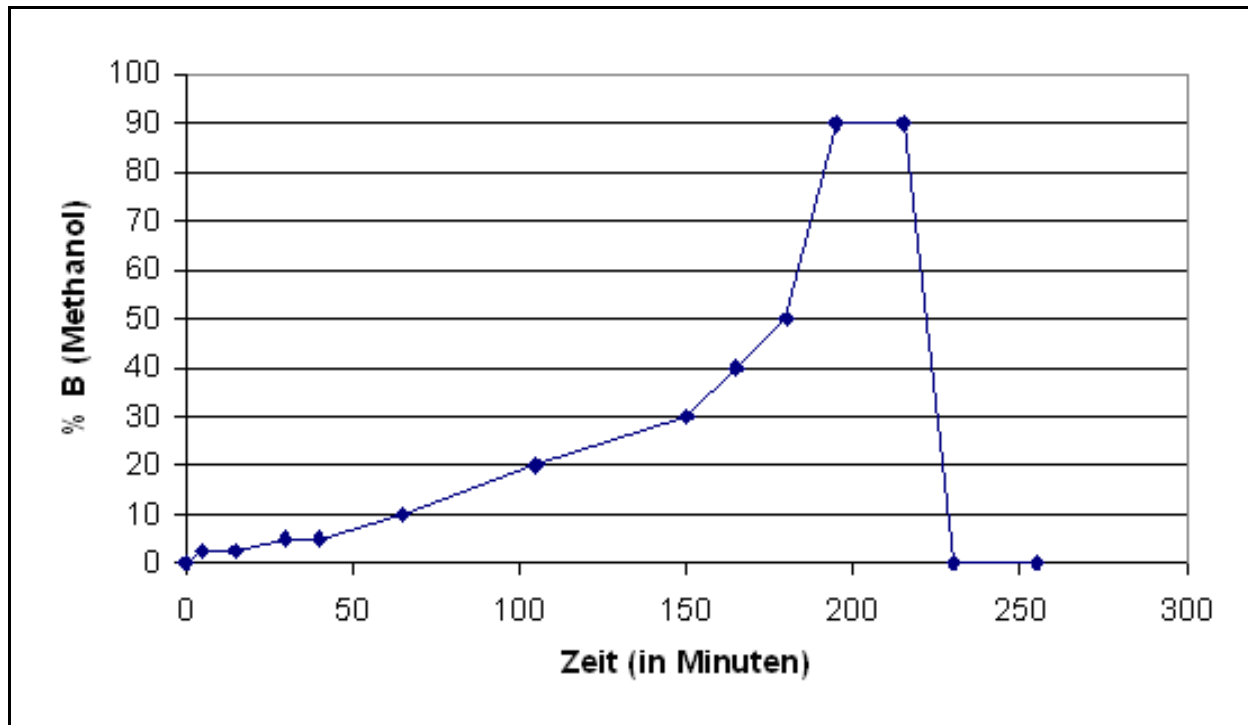


Abbildung 130: Veränderte Gradientenbedingungen (Gradient 2) für die Untersuchung der Möhren- und Weizenproben

4.5.3.6 HPLC Bedingungen (2003, Universität Kassel)

Die Untersuchung der einzelnen Weizenproben erfolgte wie vorher beschrieben im Gradientenbetrieb. Die Säulentemperatur konnte durch einen Säulenofen konstant bei 25 °C gehalten werden.

Fliessmittel: A= Ameisensäure (5%),
B = Methanol 100% (Gradient Grade).

Die eingesetzten Gradientenbedingungen für die Messungen der Proben sind in der Abbildung dargestellt. Die Flussrate betrug 0,5 ml / min., das Injektionsvolumen betrug 20 µl, alle Injektionen wurden vom Autosampler ausgeführt. Durch den kontinuierlichen Einsatz des Diodenarraydetektors konnten über die gesamte Laufzeit Spektren aufgenommen werden.

Nach jeweils 5 untersuchten Proben wurde ein HPLC-Lauf mit 100% Methanol durchgeführt.

HPLC System : Waters Alliance
Detektor: Waters Diodenarraydetektor, 2489
Säulenmaterial: Shandon Hypersil 0,3 µm, Innendurchmesser 4mm, 145 mm
Software: Empower

Die Gradientenbedingungen der Untersuchungen in der zweiten Versuchsreihe (Universität Kassel) entsprachen denen der ersten Versuchsreihe (2002, WZW). Die Gradientenbedingungen sind in Abbildung 130 dargestellt.

4.5.4 Validierung

4.5.4.1 Charakterisierung der Methode

Die dem Teilprojekt Polyphenole im Rahmen der Validierung ganzheitlicher Methoden zugrunde liegende Frage lautet:

“Lassen sich durch den Vergleich der Chromatogramme die vorliegenden Weizen- und Möhrenproben aus unterschiedlichen Kulturverfahren differenzieren?”

4.5.4.1.1 Systematische Beurteilung der Faktoren die das Ergebnis beeinflussen können

4.5.4.1.1.1 Degradation der Analyten während der sauren Hydrolyse

Manche Eigenschaften der Polyphenole, wie Flüchtigkeit oder die Möglichkeit zur Polymerisation bzw. der Degradation von Polyphenole zu Mono- bzw. Dimeren erfordern es, die Stabilität gegenüber der Extraktion mit der sauren Hydrolyse zu überprüfen.

Zu diesem Zweck wurde eine Mischung aus 7 verschiedenen methanolischen Standardlösungen (Chlorogensäure, Vanillinsäure, Kaffeesäure, p-Hydroxybenzoesäure, Syringasäure, Ferulasäure und 6-Methoxy-Flavon) der Probenvorbereitung der sauren Hydrolyse unterzogen und vermessen. Der Extrakt der sauren Hydrolyse wurde auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt, so dass die theoretischen Gehalte der Standards in der Lösung mit denen der methanolischen Extraktion verglichen werden konnten.

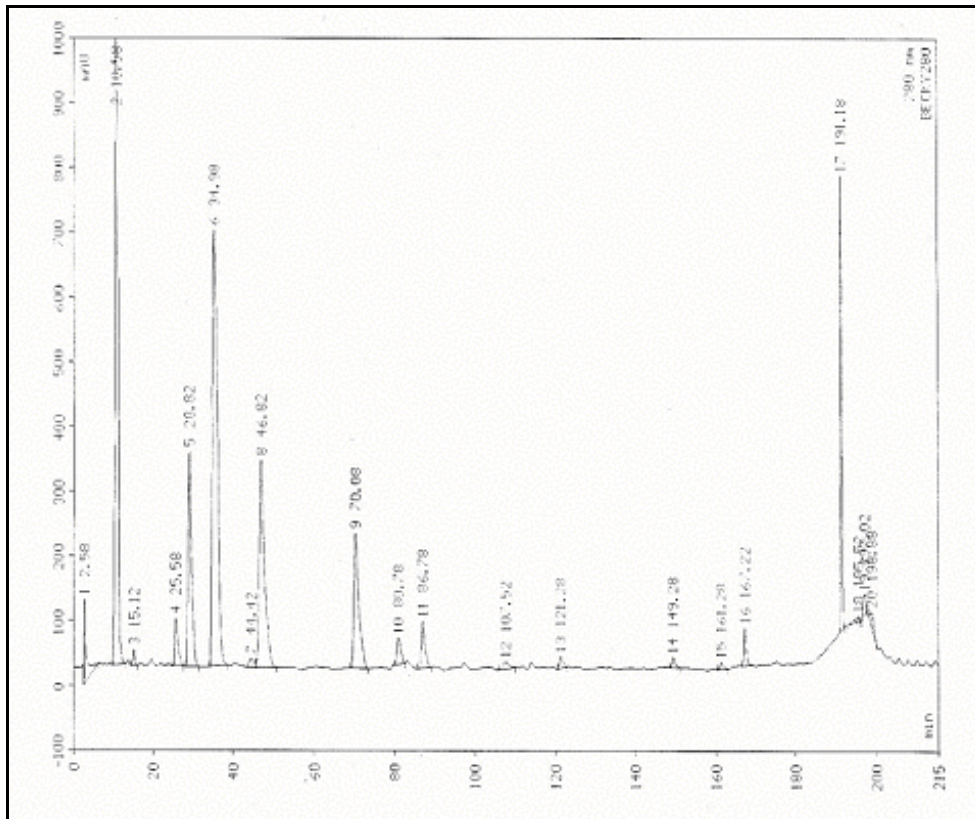


Abbildung 131: Chromatogramm einer Mischung aus 7 verschiedenen methanolischen Standardlösungen (Chlorogensäure, Vanillinsäure, Kaffeesäure, p-Hydroxybenzoesäure, Syringasäure, Ferulasäure und 6-Methoxyflavon).

Wie im Vergleich der Chromatogramme zu erkennen ist, zeigen sich in der Probe nach der Behandlung mit der sauren Hydrolyse deutliche Veränderungen gegenüber den rein methanolischen Lösungen. Die Signalintensität sinkt und die Zahl der detektierten Peaks nimmt ab.

Die untersuchten Standardlösungen sind demnach gegenüber der sauren Hydrolyse nicht stabil. Die Befunde können evtl. als erste Hinweise auf eine Umlagerung der Substanzen verstanden werden. Die Bestätigung und eine Identifizierung durch die Untersuchung mit GC-MS waren nicht Bestandteil des Projektes. Erste Untersuchungen in dieser Richtung brachten aber noch keine Hinweise zur Strukturaufklärung. Weiterführende Untersuchungen sollen in einem weiteren Projekt durchgeführt werden.

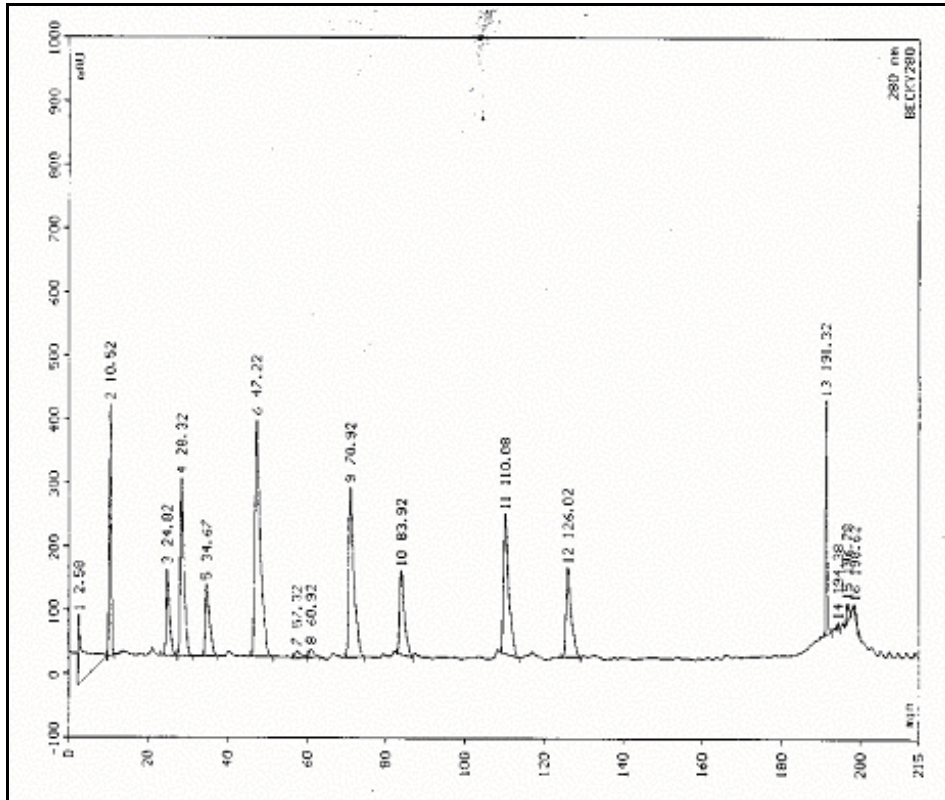


Abbildung 132: Chromatogramm einer Mischung aus 7 verschiedenen Standardlösungen (siehe vorhergehende Abbildung) nach Extraktion mit saurer Hydrolyse. Die theoretische Konzentration der jeweiligen Substanzen im Extrakt wie in der rein methanolischen Probe

4.5.4.1.1.2 Unvollständige Homogenisierung des gemahlten Probenmaterials

Aus Untersuchungen des Weizens (BROWN 1984, HARMS 1982) ist bekannt, dass die Verteilung der Polyphenole in Weizenkörnern nicht homogen sondern an bestimmte Kompartimente des Korns gebunden ist. Polyphenole finden sich dabei hauptsächlich in der Samenschale während der Stärkekörper weitgehend frei von ihnen ist.

Trotz des Vermahlens mit einer Siebgröße von 0,5 mm kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich in der Probe - der Korngrößenverteilung folgend - eine Fraktionierung mit jeweils unterschiedlichem Polyphenolgehalt und -muster einstellt. Der Einfluss dieses Umstands auf die Schwankungsbreite der gemessenen Peakfläche für die einzelnen Peaks bei der mehrfachen Aufbereitung und Vermessung einer Probe kann trotz Sorgfalt nicht ausgeschlossen werden.

4.5.4.2 Verfahrensmerkmale

4.5.4.2.1 Identifizierung

Die Identifizierung der Peaks wurde durch Retentionszeitenvergleich, Standardaddition sowie den Vergleich des UV-Spektrums vorgenommen. Auf diese Weise konnten im Chromatogramm eines methanolischen Möhrenextraktes der Peak Nr. 2 als p-Hydroxybenzoesäure und der Peak Nr. 3 als Chlorogensäure identifiziert werden. Die Identität der anderen Peaks konnte noch nicht aufgeklärt werden. Diese werden im weiteren als Peak + laufende Nr. bezeichnet. Es wurde ausserhalb dieses Projektes damit begonnen, einzelne Peaks massenspektrometrisch zu untersuchen (ESI-MS). Diese Untersuchungen waren nicht Teil des Antrags. Ergebnisse liegen noch nicht vor.

4.5.4.2.2 Messpräzision

Zur Überprüfung der Messpräzision wurde die selbe Probe unter gleichen Bedingungen in kurzen Zeitabständen in 5-facher Wiederholung am selben Gerät vom selben Prüfer untersucht. Die Variationskoeffizienten (V_K) sind als Maß für die Wiederholpräzision in den folgenden Tabellen dargestellt:

Peak Nr.	V_K	Peak Nr.	V_K
1	0,54 %	7	0,82 %
2	1,88 %	8	1,41 %
3	1,86 %	9	1,70 %
4	1,21 %	10	1,84 %
5	0,54 %		
6	0,76 %		

Tabelle 46: Methanolische Extraktion der Probe "Möhre 88".

Variationskoeffizienten für die einzelnen Peaks

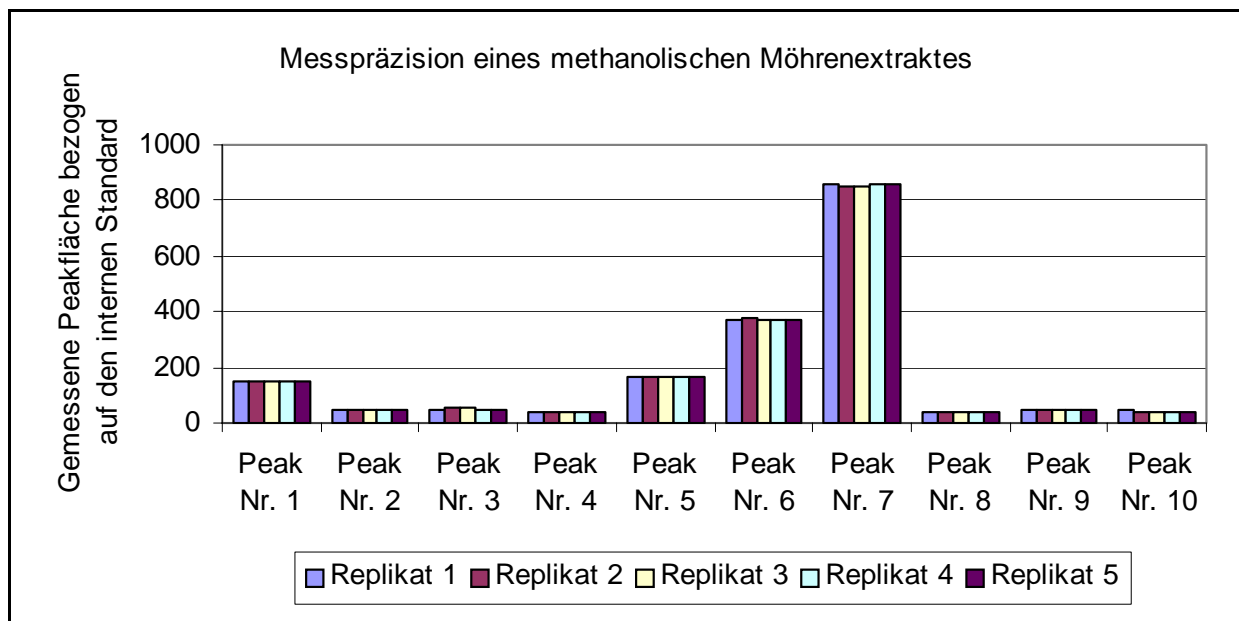


Abbildung 133: Methanolische Extraktion "Möhre 88". Messpräzision

Peak Nr.	V_K	Peak Nr.	V_K
1	0,54 %	7	0,82 %
2	1,88 %	8	1,41 %
3	1,86 %	9	1,7 %
4	1,21 %	10	1,84 %
5	0,54 %		
6	0,76 %		

Tabelle 47: Saure Hydrolyse der Probe "Möhre 88".
Variationskoeffizienten für die einzelnen Peaks.

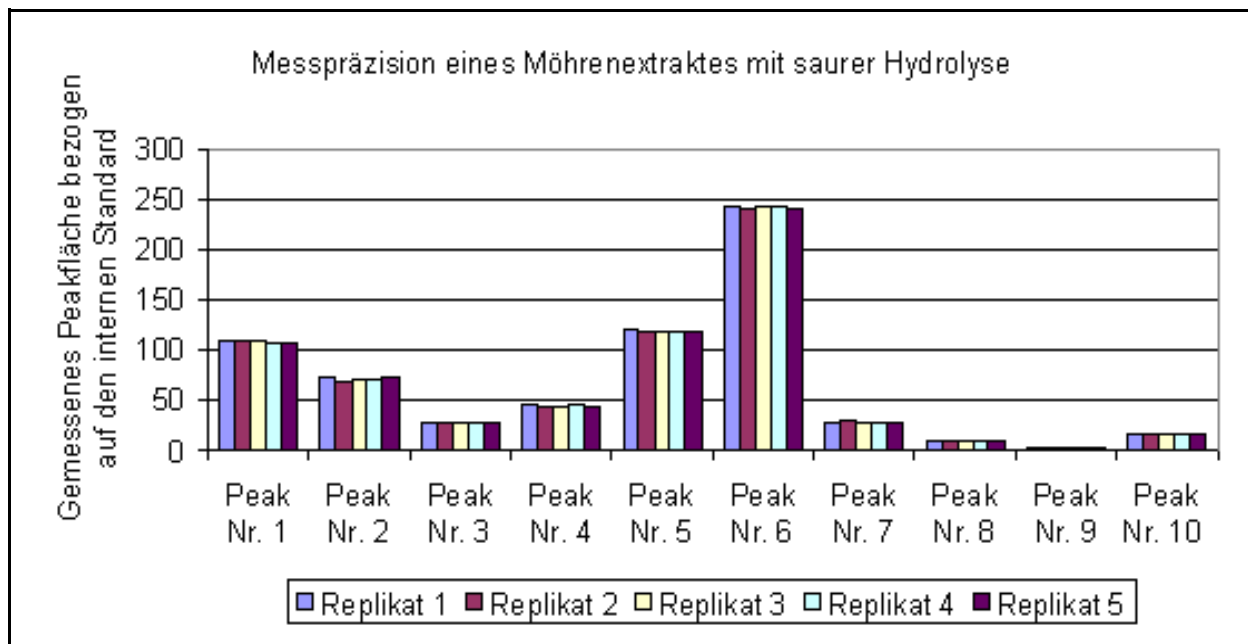


Abbildung 134: Möhrenextrakt mit saurer Hydrolyse. Messpräzision

Peak Nr.	V_K	Peak Nr.	V_K
1	0,58 %	7	0,82 %
2	0,70 %	8	0,82 %
3	0,74 %	9	0,92 %
4	0,57 %	10	1,14 %
5	0,69 %	11	0,52 %
6	0,78 %		

Tabelle 48: Weizenextrakt, Extraktion mit saurer Hydrolyse (Probe A1). Variationskoeffizienten der einzelnen Peaks

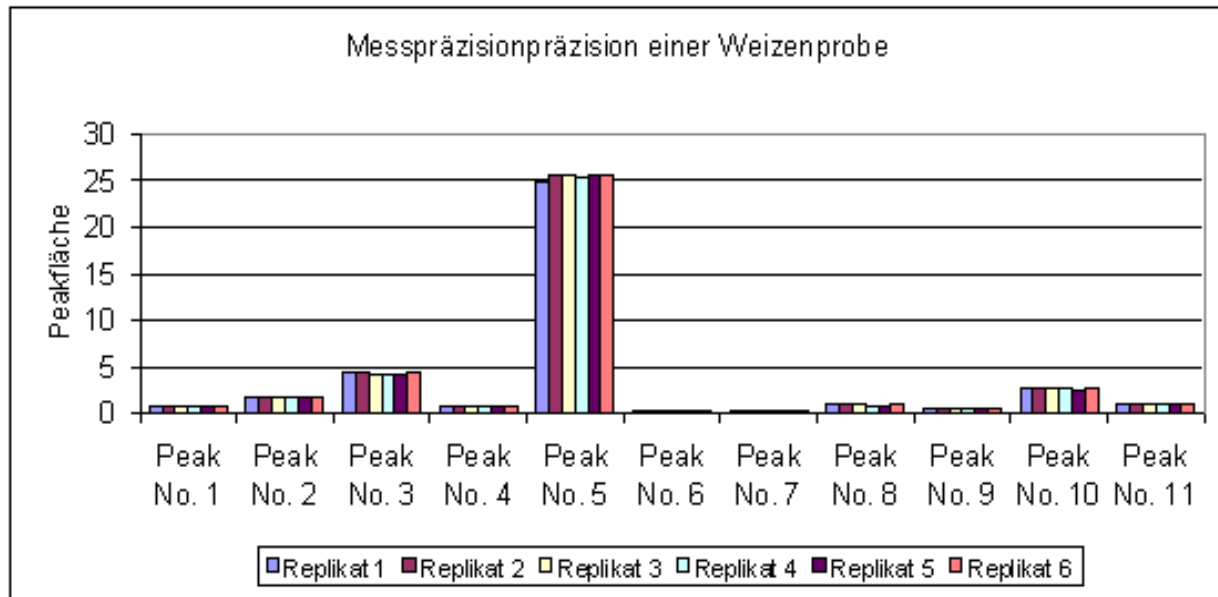


Abbildung 135: Saure Hydrolyse einer Weizenprobe. Messpräzision

4.5.4.2.3 Wiederholpräzision

Zur Überprüfung der Wiederholpräzision wurde die selbe Probe unter gleichen Bedingungen im selben Labor aufbereitet und in kurzen Zeitabständen in 5-facher Wiederholung am selben Gerät vom selben Prüfer untersucht.

Die berechneten Variationskoeffizienten (V_K) lagen vor allem für die vermessenen Weizenproben je nach Peak in einem Bereich zwischen 0,5% und 41%. Alle Peaks, für die ein V_K von > 20 % ermittelt wurde, wurden nicht mit in die weitere Auswertung der Vergleichsmessungen einbezogen.

4.5.4.2.4 Stabilität der Lösungen

Zur Überprüfung der Stabilität der eingesetzten Lösungen wurden jeweils eine der untersuchten Möhren- bzw. Weizenextrakte in einem Abstand von einem Tag, einer Woche und vier Wochen zum Zeitpunkt der Messung untersucht. In der Zwischenzeit wurden die Extrakte gekühlt bei -18°C aufbewahrt. Jede Probe wurde in 5-facher Wiederholung gemessen.

In allen untersuchten Extrakten konnte über den Zeitraum von 4 Wochen eine Abnahme der gemessenen Signalintensität für die jeweiligen Peaks beobachtet werden. Für die Vergleichsmessungen wurden daher alle Extrakt frisch hergestellt und direkt im Anschluß vermessen.

4.5.4.2.5 Linearität und Kalibrierfunktion

Die Prüfung der Linearität gibt Aufschluss darüber in welchen Konzentrationsbereich der geprüften Substanz die Menge der Substanz mit der Größe des Messsignals, in diesem Falle der gemessenen Peakfläche, linear korreliert ist. Dies dient einerseits der Überprüfung des verwendeten HPLC Systems andererseits soll sicher gestellt werden, dass alle ermittelten Messsignale im linearen Bereich des HPLC Systems liegen.

4.5.4.2.5.1 Linearität von Standardlösungen verschiedener Konzentrationen (WZW, 2002)

Die Linearitätsbestimmung wurde mit der Substanz 6-Methoxy-Flavon (Extra-Synthèse) in einem Konzentrationsbereich von 0,00075 mg bis 1,2 mg pro ml Standardlösung durchgeführt. Untersucht wurden Standardlösungen in jeweils 4 Wiederholungen.

Es ergab sich eine lineare Regression mit hoher Korrelation. Alle aufgenommenen Messwerte lagen im linearen Bereich der Datenaufnahme.

Geradengleichung: $y = 10568x - 7,6139$

Bestimmtheitsmass: $r^2 = 0,9937$

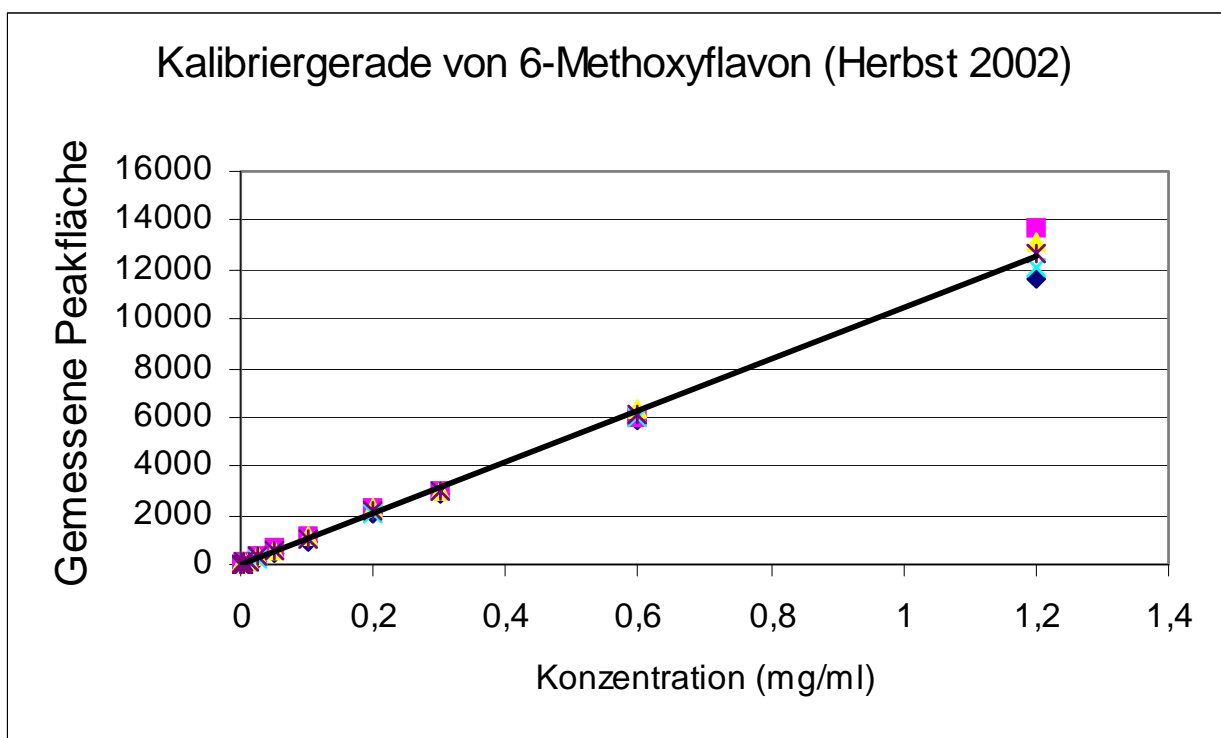


Abbildung 136: Kalibriergerade für 6-Methoxyflavon (WZW)

4.5.4.2.5.2 Linearität von Standardlösungen verschiedener Konzentrationen (Universität Kassel)

Linearitätsbestimmungen mit dem internen Standard 6-Methoxyflavon wurden zur Überprüfung der Freisinger Messungen in einer zweiten Messreihe mit einem anderen Gerät (Waters, Alliance) an der Universität Kassel durchgeführt. Eingesetzt wurden Standardlösungen in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,003 mg/ml und 1,0 mg/ml.

Auch in diesen Untersuchungen ergab sich im vermessenen Konzentrationsbereich eine lineare Regression mit hoher Korrelation:

Geradengleichung: $y = 10877x - 8,652$

Bestimmtheitsmaß: $r^2 = 0,9994$

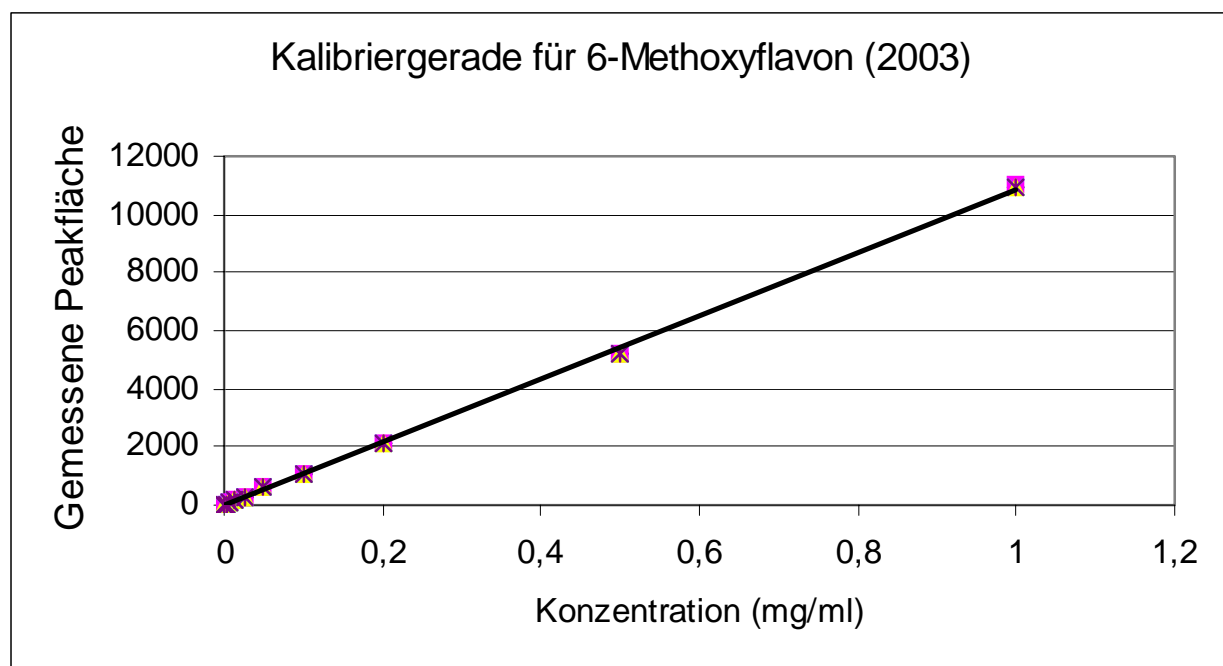


Abbildung 137: Kalibriergerade von 6-Methoxyflavon (Universität Kassel)

Die Ergebnisse der ersten Messreihe konnten bestätigt werden, alle aufgenommenen Messwerte lagen im linearen Bereich der Datenaufnahme.

4.5.4.2.5.3 Linearität von Peaks verschiedener Konzentrationen

Da die meisten der mit HPLC Untersuchung als Peaks gemessenen Substanzen nicht identifiziert wurden, beschränkte sich die Untersuchung der Linearität der Einzelsubstanzen auf die Untersuchung des Gesamtchromatogramms. Dafür wurde in der ersten Messreihe (WZW 2002) eine Möhrenprobe in mehreren Stufen bis zum 10-fachen bzw. zu einem Zehntel der Konzentration der Arbeitslösungen aufkonzentriert bzw. verdünnt und gemessen.

Das Bestimmtheitsmaß der einzelnen Peaks ist in der Tabelle 28 dargestellt. Die gemessenen Peakflächen lagen im linearen Bereich der Datenaufnahme.

Peak Nummer	Bestimmtheitsmaß (r^2)	Peak Nummer	Bestimmtheitsmaß (r^2)
1	0,99	6	0,98
2	0,93	7	0,95
3	0,99	8	0,92
4	0,97	9	0,94
5	0,95	10	0,91

Tabelle 49: Linearität einzelner Peaks einer Möhrenprobe (methanolische Extraktion) in verschiedenen Konzentrationsstufen

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden die Messungen zur Linearität von Chromatogrammen in einer zweiten Versuchsreihe an der Universität Kassel wiederholt. Das Bestimmtheitsmass der einzelnen Peaks ist in der nächsten Tabelle dargestellt. Die gemessenen Peakflächen lagen im linearen Bereich der Datenaufnahme.

Peak Nummer	Bestimmtheitsmaß (r^2)	Peak Nummer	Bestimmtheitsmaß (r^2)
1	0,99	6	0,97
2	0,93	7	0,94
3	0,97	8	0,99
4	0,89	9	0,95
5	0,91	10	0,92

Tabelle 50: Linearität einzelner Peaks einer Möhrenprobe (methanolische Extraktion) in verschiedenen Konzentrationsstufen

4.5.5 Ergebnisse der Vergleichsversuche

4.5.5.1 Auswertung der Ergebnisse

Alle Proben wurden in 5-facher Wiederholung aufbereitet und gemessen. Als Endgröße der Messung diente der Quotient aus gemessener Peakfläche (PF) des Analyten und der gemessenen Peakfläche des internen Standards 6-Methoxy-Flavon (PF/PFSTA). Dieses wurde für jeden einzelnen Peak durchgeführt.

Die Daten wurden auf Normalverteilung und Homogenität der Varianzen geprüft und soweit zulässig wurde ein paarweise gekoppelter t-Test auf das Datenmaterial angewendet (p-Wert Anpassung nach Bonferroni)

Die Peaks, in einem Probensatz, für die eine signifikante Trennung ermittelt werden konnte, werden einzeln dargestellt.

4.5.5.2 Ergebnisse der Messung von Weizenproben

4.5.5.2.1 Weizen (WZW, 2002)

Das Material für die untersuchten Weizenproben stammte aus kontrollierten Anbauversuchen und war zum Zeitpunkt der Auslieferung (Lieferdatum: 21.10.02) codiert. Untersucht wurden 5 Weizenqualitäten (2x aus konventionellem Anbau, 2x aus ökologischem Anbau und eine ungedüngte Nullvariante) in jeweils 4 Feldwiederholungen.

Anhand des Vergleichs der Einzelpeaks konnten im Sinne der Fragestellung in den Proben keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Möglichkeiten für die Differenzierung und der Gruppierung von Qualitäten ergaben sich nicht.

4.5.5.2.2 Weizen (Universität Kassel, 2003)

Das Material für die untersuchten Weizenproben stammte aus kontrollierten Anbauversuchen und war zum Zeitpunkt der Auslieferung (Lieferdatum: 15.09.03) codiert. Untersucht wurden 5 Weizenqualitäten (2x aus konventionellem Anbau, 2x aus ökologischem Anbau und eine ungedüngte Nullvariante) in jeweils 4 Feldwiederholungen.

Anhand des Vergleichs der Einzelpeaks konnten im Sinne der Fragestellung in den Proben keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Möglichkeiten für die Differenzierung und der Gruppierung von Qualitäten ergaben sich nicht.

4.5.5.3 Ergebnisse der Messung von Möhrenproben (WZW, 2002)

4.5.5.3.1 Möhren FIBL, methanolische Extrakte

Peak Nr. 7

Ergebnis des paarweise gekoppelten t-Test:

	Samson (OP)	Bolero (F1)
Bolero (F1)	n.s.	
Nipomo (F1)	***	***

Anhand des Peaks Nr. 7 könnte die Sorte Nipomo F1 von den Sorten Samson OP und Bolero F1 getrennt werden. Gruppierungen zur Unterscheidung von samenfesten und Hybridsorten können anhand dieser Ergebnisse nicht getroffen werden.

4.5.5.3.2 Möhren (FIBL, 33 und 66)

Nur anhand des Peaks Nr. 4 der Chromatogramme kann die Sorte Bolero F1 von der Sorte Nipomo F1 getrennt werden. Differenzierungsmöglichkeiten zwischen samenfesten und Hybridsorten bieten sich auf dieser Grundlage nicht. Die Möhrenproben 33 und 66 lassen sich nicht trennen.

4.5.5.4 Ergebnisse Messung Möhrenproben (Universität Kassel, 2003)

4.5.5.4.1 Methanolische Extrakte

4.5.5.4.1.1 Möhren 77 und 88

An den Peaks 1, 2 (p-Hydroxybenzoesäure), 7 und 8 zeigen sich hochsignifikante Unterschiede zwischen den Möhren aus dem Anbau mit unterschiedliche Düngungsstufen. Die Möhrenproben 77 und 88 können getrennt werden.

4.5.5.4.1.2 Möhren FIBL

Peak Nr. 2

Ergebnis des paarweise gekoppelten t-Test

	A (Tiptop, OP)	B (Bolero, F1)	Nipomo (F1)
B (Bolero, F1)	***		
C Nipomo (F1)	***	***	
D Samson (OP)	***	**	**

Peak Nr. 3

Ergebnis des paarweise gekoppelten t-Test:

	A (Tiptop, OP)	B (Bolero, F1)	Nipomo (F1)
B (Bolero, (F1)	**		
C Nipomo (F1)	n.s.	**	
D Samson (OP)	n.s.	**	n.s.

Peak Nr. 8

Ergebnis des paarweise gekoppelten t-Test:

	A (Tiptop, OP)	B (Bolero, F1)	Nipomo (F1)
B (Bolero, F1)	***		
C Nipomo (F1)	***	***	
D Samson (OP)	n.s.	***	***

Anhand der Messergebnisse für die Peaks Nr. 2, 3 und 8 können hochsignifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Sorten ermittelt werden. Eine Gruppierung in samenfesten und Hybridsorten kann aufgrund dieser Messergebnisse jedoch nicht vorgenommen werden.

4.5.5.4.2 Extrakte mit saurer Hydrolyse

4.5.5.4.2.1 Möhren 77 und 88

An den Peaks 3, 4, 5, 6 und 9 zeigen sich hochsignifikante Unterschiede zwischen den Möhren aus Anbau mit unterschiedlichen Düngungsstufen. Die Möhrenproben 77 und 88 konnten getrennt werden.

4.5.5.4.2.2 FIBL Möhren

Peak Nr.1

Ergebnis des paarweise gekoppelten t-Test:

	A (Tiptop, OP)	B (Bolero, F1)	Nipomo (F1)
B (Bolero, F1)	n.s.	.	n.s.
Nipomo (F1)	n.s.	n.s.	n.s.
Samson (OP)	n.s.	***	*

Peak Nr. 2

Ergebnis des paarweise gekoppelten t-Test:

	A (Tiptop, OP)	B (Bolero, F1)	Nipomo (F1)
B (Bolero, F1)	n.s.		
Nipomo (F1)	n.s.	n.s.	
Samson (OP)	***	***	***

Peak Nr. 4

Ergebnis des paarweise gekoppelten t-Test:

	A (Tiptop, OP)	B (Bolero, F1)	Nipomo (F1)
B (Bolero, F1)	n.s.		
Nipomo (F1)	n.s.	n.s.	
Samson (OP)	n.s.	***	***

Peak Nr. 6

Ergebnis des paarweise gekoppelten t-Test:

	A (Tiptop, OP)	B (Bolero, F1)	Nipomo (F1)
B (Bolero, F1)	***		
Nipomo (F1)	***	n.s.	
Samson (OP)	***	**	n.s.

Peak Nr. 8

Ergebnis des paarweise gekoppelten t-Test:

	A (Tiptop, OP)	B (Bolero, F1)	Nipomo (F1)
B (Bolero, F1)	***		
Nipomo (F1)	***	n.s.	
Samson (OP)	***	***	***

Peak Nr. 9

Ergebnis des paarweise gekoppelten t-Test:

	A (Tiptop, OP)	B (Bolero, F1)	Nipomo (F1)
B (Bolero, F1)	n.s.		
C Nipomo (F1)	n.s.	**	
D Samson (OP)	***	***	***

Anhand der vorliegenden Messergebnisse können hochsignifikante Sortenunterschiede zwischen den untersuchten Möhrensorten ermittelt werden. Eine Gruppierung der Sorten in samenfeste und Hybridsorten ist anhand dieser Ergebnisse nicht möglich.

4.5.6 Zusammenfassende Abschätzung zur Eignung der Methode

In den vorliegenden Untersuchungen wurden methodenspezifische Kenngrößen einer HPLC-Methode zur Analytik von Polyphenolen in Möhren- und Weizenproben beschrieben.

In Hinblick auf die Fragestellung der Untersuchung zeigt sich ein unterschiedliches Bild:

Bei den untersuchten Weizenproben konnten mit der angewandten Methode keine Parameter ermittelt werden, die eine Unterscheidung der Proben aus verschiedenen Düngungsstufen, oder sogar die Zuordnung einzelner Proben zu einem bestimmten Anbausystem erlaubt hätten.

Der Grundgedanke den physiologischen Status – und damit auch den Gehalt an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen - von Kulturpflanzen mit dem Anbausystem in Beziehung zu setzen erscheint aufgrund der Charakteristika dieser Substanzen durchaus vielversprechend. Für weitere Untersuchungen an Weizenproben sollten die Untersuchungen jedoch mit einer andern Methodik weitergeführt werden. So sind beispielsweise für die Substanzklasse der Carotinoide „Screening-Methoden“ an Weizenproben beschrieben (HENTSCHEL et al. 2002) die auch für die hier behandelte Fragestellung in Frage kämen. Es wird daher empfohlen, die Weizenuntersuchungen in der bisherigen Form nicht weiter zu führen, sondern hinsichtlich der untersuchten Substanzklassen und der Methodik abzuwandeln.

Die Untersuchungsergebnisse für die Möhrenproben zeigten, dass einzelne Peaks eine signifikante Unterscheidung zwischen Sorten treffen können. Auch Möhrenproben aus Anbausystemen mit unterschiedlicher Stickstoffdüngung zeigten signifikante Unterschiede. Eine Differenzierung samenfester Sorten und Hybridsorten konnten die untersuchten Messparameter nicht leisten.

Eine entscheidende Frage, ob die angewandte Methodik geeignet ist, ist in diesem Zusammenhang die Identifizierung der einzelnen Peaks der Chromatogramme. Diese Frage, die über den Rahmen des Projektes hinaus geht konnte nur teilweise beantwortet werden, soll aber in einem nächsten Projekt fortgesetzt werden.

5 Vergleich der Methodenergebnisse an definiertem Probenmaterial

(Dr. J. Kahl, Dr. N. Busscher, Prof. Dr. A. Meier-Ploeger)

Das in diesem Bericht dokumentierte Forschungsvorhaben führt zu zwei Ergebnissen:

1. der Validierung jeder einzelnen ganzheitlichen Methode
2. der Darstellung von Ergebnissen am gleichen Probenmaterial (Differenzierung und Gruppierung von Proben verschiedener Anbauverfahren)

5.1 Validierung jeder einzelnen Methode

Alle in diesem Projekt eingesetzten Methoden konnten gemäß den Vorgaben der ISO-Norm 17025 für die unten genannten Fragestellungen validiert werden. Nach der ISO-Norm 17025 ist eine Methode validiert wenn:

- a) das durchzuführende Labor über ein entsprechendes Qualitätsmanagementsystem verfügt,
- b) die Laborprozeduren beschrieben sind und dokumentiert werden,
- c) wenn eine oder eine Kombination aus mehreren Prüfungen für die Beantwortung der Frage durchgeführt wurden:
 1. Kalibrierung mit Bezugsnormen oder Referenzmaterialien,
 2. Vergleich der Ergebnisse, die mit anderen Verfahren erzielt wurden,
 3. Vergleiche zwischen Laboratorien,
 4. Systematische Beurteilung der Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen,
 5. Beurteilung der Ergebnisunsicherheit.

In der vorliegenden Untersuchung unterschied sich der Umfang der Validierung in Abhängigkeit von der verwendeten Methode. Die Ergebnisse der durchgeführten Arbeiten sind:

1. Für alle Methoden konnten die Prozeduren gemäß DIN/ISO Vorgaben dokumentiert werden.
2. Für alle Methoden wurde die systematische Überprüfung ausgewählter

Einflussgrößen durchgeführt.

3. Alle ganzheitlichen Methoden haben an den Vergleichsmessungen teilgenommen.
4. Die Durchführung von Laborvergleichsversuchen wurde für die Kupferchlorid-Kristallisation außerhalb dieses Projektes durchgeführt. Für die Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie konnte sie nicht durchgeführt werden, da es sich beim dem Messgerät um einen Prototyp handelt. Dabei ist festzuhalten, dass die Durchführung von Ringversuchen generell Schwierigkeiten macht, da noch nicht genügend qualifizierte Laboratorien mit den einzelnen Methoden arbeiten (z.B. für die Kupferchlorid-Kristallisation gibt es z. Zt. 3 entsprechende Institute in Europa).
5. Die Richtigkeit der sog. ganzheitlichen Methoden Kupferchlorid-Kristallisation, Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie und Elektrochemische Methoden kann aufgrund z.Zt. noch fehlender Standardmaterialien nicht überprüft werden.
6. Verfahrenskenngrößen wie Präzision oder Robustheit konnten aber für die Methoden ermittelt werden.

Die Tabelle 30 zeigt, welche ganzheitliche Methode welche der Prüfungen aus der ISO-Norm 17025 erfüllt hat:

Methode	Anforderungen ISO				
	1	2	3	4	5
Kupferchlorid-Kristallisation	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja
Physiologischer Aminosäurestatus	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Elektrochemische Messungen	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja

Tabelle 30: Überblick über die Erfüllung der Anforderungen zur Validierung analytischer Methoden gemäß ISO 17025. 1 = Kalibrierung mit Bezugsnormen oder Referenzmaterialien, 2 = Vergleich der Ergebnisse, die mit anderen

Verfahren erzielt wurden, 3 = Vergleiche zwischen Laboratorien, 4 = Systematische Beurteilung der Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen, 5 = Beurteilung der Ergebnisunsicherheit.

5.2 Ergebnisse der Vergleichsmessungen

Es werden die Ergebnisse der Vergleichsmessungen von codierten Lebensmittelproben (Weizen, Möhren) vom Frühjahr 2003 und Herbst 2003 für die einzelnen Methoden verglichen. Ein Vergleich zwischen den beiden Vergleichsmessungen ist nicht sinnvoll, da die Proben im Frühjahr aus dem Lager kamen, im Herbst aber direkt vom Feld. Auf Grund der kurzen Projektlaufzeit waren Untersuchungen weiterer Ernten nicht möglich.

Eine direkte (statistische) Korrelation der einzelnen Methoden anhand der Vergleichsmessungen wurde nicht durchgeführt, da die Methoden sowohl bei bulk-Proben und/oder bei Feldwiederholungen eingesetzt wurden. Trotzdem können die Aussagen der einzelnen Methoden an den Vergleichsproben pro Methode bewertet und im Zusammenhang mit den anderen Methoden diskutiert werden. Eine Korrelation mit weiteren chemisch-analytischen Parametern war nicht Bestandteil des Projektes, soll aber auch nach Beendigung evtl. innerhalb eines neuen Projektes erfolgen.

5.2.1 Ergebnisse Differenzierung von Proben mit der Kupferchlorid-Kristallisation

(Dr. N. Busscher, Dr. J. Kahl)

Die Kupferchlorid-Kristallisation konnte die 5 Weizenproben aus dem DOK-Versuch in beiden Vergleichsmessungen zu 3 Probenklassen gruppieren, wobei die konventionellen und die ökologischen Varianten zu einer Gruppe zusammengefasst werden. Die Trennung von je einer ökologischen und konventionellen Probe mit einer Variable der Texturanalyse ist signifikant. In 2002 liegen die Nullvariante und die beiden konventionellen Varianten dichter zusammen als in 2003; in 2003 liegen die beiden konventionellen Varianten deutlicher von den beiden ökologischen entfernt. Die Trennung der beiden Gruppe ist im Gegensatz zu 2002 sogar mit nur einer einzigen Variablen der Texturanalyse signifikant.

In beiden Jahren konnten die Möhrenproben aus dem N-Düngungsversuch der Universität Kassel getrennt werden, wobei in 2003 der Unterschied bezogen auf nur eine einzige Variable der Texturanalyse nicht signifikant war. Dies kann methodisch durch den großen Unterschied der Proben im Vergleich zum Jahr 2002 und die dadurch notwendig gewordene Änderung des Mischungsverhältnisses pro Platte begründet sein. Diese Änderung kann durch den Einfluß der extremen Wetterbedingungen in den Monaten Juni-August 2003 auf das Möhrenwachstum und die Reife der Möhren erklärt werden.

Eine Hybridsorte (Bolero F1) konnte in beiden Vergleichsmessungen des Sortenversuches (FIBL) für Möhren von den drei anderen Proben getrennt werden. In 2003 konnten die samenfesten Sorten eindeutig gruppiert werden, die beiden Hybridsorten bilden jeweils eine eigene Gruppe.

Für die gesamten Untersuchungen wurden ca. 6000 Platten erstellt. Es wurden alle Muster ohne Vorsortierung ausgewertet.

5.2.2 Ergebnisse der Differenzierung von Proben mit der Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie

(Dr. J. Strube)

Die Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie ordnete die 5 Weizenproben aus dem DOK-Versuch des FIBL in 2 Probengruppen. Die Gruppe der samentypischeren Proben enthielt die ökologischen Varianten, die andere Gruppe die konventionellen Weizenproben und die Nullvariante. Die Trennung zwischen den Gruppen war signifikant. Es wurden unter den codierten Proben die ökologischen und die konventionellen Proben richtig identifiziert.

Die Nullvariante unterschied sich durch auffällig große Streuung von den übrigen Proben. Wurden die beiden Feldwiederholungen der Nullvariante entfernt, die vom mittleren Gesamtergebnis aller Proben stark abwichen, so ergab die Nullvariante Ergebnisse vergleichbar den ökologischen Proben.

Die Unterschiede zwischen ökologischen und konventionellen Weizen-Varianten waren im Anbaujahr 2003 deutlicher ausgeprägt als im Anbaujahr 2002.

Bei Möhren wurden die Düngungsvarianten zu den 4 Untersuchungszeitpunkten jeweils signifikant getrennt. Nach der Erstuntersuchung zur Feststellung der Verfahrensreaktion auf die Düngungsstufen wurden bei den 3 folgenden Untersuchungen die Düngungsstufen richtig identifiziert.

Bei der Unterscheidung von hybriden und samenfesten Möhrenvarianten wurde bei der Erstuntersuchung ein Unterschied erkannt. Bei der zweiten Untersuchung konnten die codierten 2 hybriden und 2 samenfesten Sorten richtig gruppiert werden. Bei der dritten Untersuchung wurde richtig gruppiert und die Gruppen richtig identifiziert.

5.2.3 Ergebnisse der Differenzierung von Proben mit der Physiologischer Aminosäurestatus (Dr. P. Stolz)

Durch Bestimmung des physiologischen Aminosäurenstatus konnten bei Weizenproben des DOK-Versuchs signifikant die biologischen und die konventionellen Kulturverfahren differenziert und identifiziert werden. Bei den Proben des Jahres 2002 konnte die Nullvariante sicher abgetrennt und identifiziert werden. Bei den Proben des Jahres 2003 war die Nullvariante nicht von den ökologischen Verfahren zu trennen.

Die codierten Proben des von der Universität Kassel, Domäne Frankenhausen durchgeführten Düngungsversuchs an Möhren konnten signifikant getrennt und sicher identifiziert werden.

Die Proben des FIBL-Sortenversuchs hybride/samenfeste Sorten konnten in der letzten codierten Probenserie identifiziert werden.

Insgesamt zeigte sich bei einigen Probenserien bei allen der geprüften Einzelparameter eine signifikante Trennung als Basis für eine sichere Identifizierung. Bei anderen Probenserien zeigte sich bei einigen Parametern keine Signifikanz, jedoch war mit Hilfe anderer Prüfparameter eine

signifikante Trennung und sichere Identifizierung möglich.

5.2.4 Ergebnisse der Differenzierung von Proben mit der Elektrochemische Messungen

(Dipl. Phys. B. Staller)

Mit der elektrochemischen Meßmethode ließen sich bei beiden Getreidevergleichsmessungen 2003 die ökologischen Varianten von den konventionellen signifikant trennen, wobei die biologischen Proben immer eine homogene Gruppe bildeten. Die Nullprobe im Frühjahr 2003 bildete mit der konventionellen Normaldüngung eine homogene Gruppe, während sie sich im Herbst 2003 zu den ökologischen Proben gruppierte. Deutliche sichtbar wird die Stressbelastung durch den anormalen Witterungsverlauf dieses Sommers anhand der wesentlich höheren Redoxwerte beim Getreide 2003.

Die Möhren aus dem N-Düngungsversuch ließen sich bis auf die letzten Proben (M77/M88) signifikant trennen. Hierbei handelt es sich nach unseren Messungen um vollkommen identische Proben, die sowohl im Redoxpotential als auch in der Leitfähigkeit und dem pH-Wert übereinstimmen.

Der Vergleich zwischen Hybrid- und samenfesten Sorten lieferte keine eindeutige Zuordnung. Die Kriterien der Differenzierung zwischen hybrid und samenfest werden hier scheinbar durch wesentlich stärkere Einflüsse wie klimatische Bedingungen und Lagerung überlagert, was sehr deutlich durch die Verschiebung der Redoxwerte zwischen den Proben aus 2002 und 2003 zum Ausdruck kommt.

Bemerkenswert wäre noch, dass das Ergebnis bezüglich der Gruppierung (F#E,G) bei der Probe E, F, G mit den Ergebnissen des Parameters ChiE/H50w aus der Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie übereinstimmt.

5.2.5 Ergebnisse der Differenzierung von Proben mit der HPLC-Messungen Methode Polyphenole (A. Werries)

Die Messungen der Polyphenolspektren von Weizen- und Möhrenproben zeigen, dass die Möhrenproben aus unterschiedlichen N-Düngungsstufen und verschiedener Sorten getrennt werden konnten. Eine Gruppierung in samenfeste und Hybridmöhren war allerdings noch nicht möglich. Dafür müssen weitere Proben gemessen und die relevanten Peaks identifiziert werden (z.B.

massenspektrometrisch). Für die Trennung von Weizenproben nach dem Spektrum einer Klasse der sekundären Pflanzenstoffe sollten Methoden z.B. für die Bestimmung von Carotinoiden zum Einsatz kommen.

5.2.6 Zusammenfassung

(Dr. Kahl, Dr. N. Busscher, Prof. Dr. A. Meier-Ploeger)

Die Methoden Kupferchlorid-Kristallisation, Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie und Physiologischer Aminosäurestatus sind für die in diesem Projekt formulierte Fragestellung der Differenzierung von definierten Lebensmittelproben unterschiedlicher Anbausysteme geeignet. Darüber hinaus konnten mit der Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie und über den physiologischen Aminosäurestatus die Proben auch den Anbauweisen richtig zugeordnet werden.

Die elektrochemischen Methoden konnten nicht alle Proben eindeutig trennen, die Anwendung der Methode Polyphenole auf Weizen mit der HPLC Messung ist für die Fragestellung ungeeignet.

Bemerkenswert ist die unterschiedliche Gruppierung der Weizenproben in 2003: Während die Methode Physiologischer Aminosäurestatus die Nullvariante den ökologischen Proben zuordnet, gruppieren Kupferchlorid-Kristallisation und Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie die Nullvariante zu den Proben aus konventionellem Anbau. Die elektrochemische Methode ordnet die Nullvariante im Frühjahr 2003 den konventionellen Proben zu, im Herbst 2003 aber den ökologischen Proben. Dies zeigt, dass nicht alle Methoden die gleiche Aussage treffen bzw. die Aussage evtl. auf Grund anderer Qualitätsparameter (z.B. Struktur/Ordnung) erfolgt. Bisher liegen noch zu wenige Ergebnisse von validierten Methoden vor, um diese Frage zu beantworten.

Nicht nur aufgrund dieser unterschiedlichen Aussage, sondern vor allem, um die Gesamtaussage einer Trennung von Anbausystemen am Produkt noch robuster zu machen und Verbesserungspotentiale bei der Auswertung der Methoden mit einzubeziehen, sollten zumindest die drei erst genannten Verfahren weiterhin nebeneinander in direkt anschließenden weiteren Projekten eingesetzt werden.

6 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse für den ökologischen Landbau

(Dr. J. Kahl, Dr. N. Busscher, Prof. Dr. A. Meier-Ploeger)

Die in diesem Projekt eingesetzten ganzheitlichen Methoden wurden zum ersten Mal nach ISO 17025 dokumentiert und ihre charakteristischen Kenngrößen ermittelt. Dazu gehören neben Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit auch die Vergleichsmessungen an codierten Standardproben.

Diese entscheidenden bisherigen Hindernisse für die allgemeine Anerkennung der Methoden und ihren Einsatz an Lebensmitteln aus ökologischen Landbau (Sichtbarmachung am Produkt) konnten durch dieses Forschungsprojekt ausgeräumt werden. Die Methoden konnten für eine bestimmte Fragestellung gemäß ISO 17025 validiert werden.

Zum ersten Mal wurden die Proben des DOK-Versuches am FIBL/CH (ökologisch versus konventioneller Anbau) mit einigen der nunmehr validierten Methoden signifikant getrennt und darüber hinaus nach Anbauverfahren gruppiert. Gleiches gilt für die Möhrenproben des Sortenversuches. Damit ist die Voraussetzung gegeben, diese Methoden überhaupt für weitere Fragestellungen des ökologischen Landbaus einzusetzen.

Durch die hier vorgelegten Ergebnisse der Forschung wird angenommen, dass diese komplementären Methoden über den Einsatz in der Unterscheidung und Charakterisierung der Anbauverfahren am Produkt, auch für Fragestellungen aus Handel und Verarbeitung verwendet werden können. Besonders soll hervorgehoben werden, dass der gleichzeitige Einsatz mehrerer Methoden das Ergebnis (z.B. die Unterscheidung von Anbauverfahren) wesentlich sicherer und robuster macht, als wenn mit einer Methode allein gearbeitet wird. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse, dass von den verschiedenen Methoden unterschiedliche Qualitätsaspekte abgebildet werden (s. u. a. die Gruppierung der DOK-Proben oder Sortenversuch Möhren). Ob diese Methoden quasi die Summe verschiedener bekannter Aspekte der Produktqualität zeigen oder unabhängige, ggf. bisher nicht bestimmte Qualitätskriterien abbilden, kann erst im Vergleich mit den Ergebnissen einer Reihe weiterer Methoden wissenschaftlich bewiesen werden. Der Vergleich der Ergebnisse der in diesem Projekt eingesetzten Methoden zeigt jedenfalls, dass die Kupferchlorid-Kristallisation und die Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie verschiedene Proben nach Anbauvariante gruppieren, die nicht identisch ist mit der Gruppierung durch den physiologischen Aminosäurestatus.

Eine Übertragbarkeit der Methodenfähigkeit und Messunsicherheit auf die Anwendung der Verfahren für andere Fragen oder in anderen Laboratorien als die am Projekt beteiligten ist nur zulässig, wenn entsprechende Validierungsergebnisse gemäß ISO-Norm 17025 nachgewiesen werden. Dazu gehört u.a. die Teilnahme an Ringversuchen und Vergleichsmessungen. Dies ist aber mit den in diesem Projekt erreichten Zielen nunmehr möglich.

Die in diesem Projekt gestellte Frage bezog sich auf definiertes Probenmaterial. Damit kann noch keine Aussage über die Fähigkeit der Methoden gemacht werden, generell Proben aus ökologischem Anbau von Proben aus konventionellem Anbau zu unterscheiden. Dafür müssen die verschiedenen Methoden über weitere Jahre an definierten Proben und Proben aus dem Handel (Marktproben) verglichen werden. Darüber hinaus sollten weitere Produkte (z.B. Obst, tierische Produkte wie Milch) getestet werden. Wenn diese Vorhaben erfolgreich durchgeführt sind, stehen dem ökologischen Landbau Verfahren zur Verfügung, die zum einen Produkte aus verschiedenen Anbauverfahren unterscheiden können und zum anderen die Qualität ökologischer Lebensmittel evtl. über bisher nicht erfasste Parameter charakterisieren. Als Maß für die Qualitätsaussage der hier beschriebenen Verfahren sollten ergänzend zu den chemisch-analytischen Messmethoden für Lebensmittel Fütterungsversuche und Ernährungsstudien eingesetzt werden (Aufbau einer Referenzbibliothek). Damit wäre die noch ausstehende Prüfung der Richtigkeit (durch die Bereitstellung von Referenzmaterial) in bezug auf den Gesundheitswert auch für die sog. ganzheitlichen Methoden möglich.

7 Literatur

7.1 Kupferchlorid-Kristallisation

- Alföldi, T, Bickel, R, Weibel, F, (2001). Vergleichende Qualitätsforschung. *Ökologie & Landbau* 177, 1, 11-13
- Alföldi, T.; Bickel, R. und Weibel, F. (1998): Vergleichende Qualitätsuntersuchungen zwischen biologisch und konventionell angebauten Produkten: Eine kritische Betrachtung der Forschungsarbeiten zwischen 1993 und 1998. Interner Bericht. Forschungsinstitut für biologischen Landbau, Frick /Schweiz 1998
- Andersen, J-O, (2001). Development and application of the biocrystallisation method. Biodynamic Research Association, Denmark, Report No. 1
- Andersen, J-O, Henriksen, CB, Lursen, J, Nielsen, AA, (1999). Computerised image analysis of biocrystallograms originated from agricultural products. *Computers and electronics in agriculture* 22, 51-69
- Andersen, J-O, Kaack, K, Nielsen, M, Thorup-Kristensen, Kr., Labouriau, R, (2001). Comparative study between biocrystallisation and chemical analysis of carrots (*Daucus carota* L.) grown organically using different levels of green manures. *Biological Agriculture and Horticulture* 19, 29-48
- Andersen, J-O, Laursen, J, Kolster, P, (1998). A refined biocrystallisation method applied in a pictomorphological investigation of a polymer. *Elemente der Naturwissenschaft* 68, 1-20
- Ballivet, C, Knijpenga, H, Barth, J-G, Clad, R, (1999). Zur Empfindlichkeit der Methode der Kupferchloridkristallisation. *Elemente der Naturwissenschaft* 70, 1, 1-32
- Balzer-Graf, U, (1994). Die Qualität ökologisch erzeugter Produkte. In (Mayer et al. Hrsg.): *Ökologischer Landbau - Perspektiven für die Zukunft* Stiftung Ökologie und Landbau, 261-290
- Balzer-Graf, U, (1996). Vitaqualität von Weizen aus unterschiedlichem Anbau. *Beiträge zur Förderung der biologisch-dynamischen Landwirtschaft*. 44, 440-450
- Balzer-Graf, U, (2001a), Vitaqualität-Qualitätsforschung mit bildschaffenden Methoden. *Ökologie & Landbau*, 117, 1, 22-24
- Balzer-Graf, U, (2001b), Verlust der Vitaqualität durch moderne Lebensmittelverarbeitung. *Ökologie & Landbau* 120, 4, 13-16

- Balzer-Graf, U, Balzer, F, (1991a). Steigbild und Kupferchloridkristallisation - Spiegel der Vitalaktivität von Lebensmitteln. In: Meier-Ploeger & Vogtmann, Lebensmittelqualität - Ganzheitliche Methoden und Konzepte, 163-210
- Balzer-Graf, U, Balzer, F, (1991b). Milchqualität im Spiegel bildschaffender Methoden. Lebendige Erde 5, 236-254
- Beckmann, H, (1959). Über Keimbildung, Einkristallwachstum und Auffächerungswachstum von $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in rein wässrigen und eiweißhaltigen Lösungen. Dissertation Universität Bonn
- Bloksma, J., Northolt, M., Huber, M. (2001a): Parameters for Apple Quality, Part 1 Report. Louis Bolk Institute, Driebergen, 2001 (ISBN 90-74021-22-0)
- Bloksma, J., Northolt, M., Huber, M. (2001b): Parameters for Apple Quality, Part 2 Annexes. Report. Louis Bolk Institute, Driebergen, 2001 (ISBN 90-74021-22-0)
- DIN 17025 (Hrsg.), (2000). DIN EN ISO IEC 17025-Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien. Europäisches Komitee für Normung, Beuth Verlag, Berlin
- Engquist, E, (1970). Gestaltkräfte des Lebendigen. Vittorio Klostermann Verlag, Frankfurt a.M.
- Engquist, M, (1961). Strukturveränderungen im Kupferchloridkristallisationsbild von Pflanzensubstanzen durch Alterung und Düngung. Lebendige Erde, 3
- Engquist, M, (1963). Pflanzenwachstum in Licht und Schatten. Lebendige Erde 14, 2 51-60
- Fuchshofen, W. (1994). Aussagekräftigkeit der ganzheitlichen Methoden. GhK Universität Kassel-Witzenhausen und FH Fulda. Witzenhausen. April 1994. Bericht im Projekt Qualitätserfassung pflanzlicher Produkte. Witzenhausen
- Kjer, I. (1993): Die Qualität von Hopfen und Gerste aus ökologischem Anbau und deren Einfluss auf die Zwischen- und Endprodukte der Bierherstellung Dissertation, Gesamthochschule Kassel-Witzenhausen.
- Kleber, W, Steinike-Hartung, U, (1959). Ein Beitrag zur Kristallisation von Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat aus Lösungen. Zeitschrift für Kristallographie 111, 213-234
- Kromidas, S (Hrsg.), (2000). Handbuch Validierung in der Analytik. Wiley-VCH, Weinheim
- Mäder, P, Pfiffner, L, Niggli, U, Balzer, U, Balzer, F, Plochberger, K, Velimirov, A, Besson, J-M,

- (1993). Effect of three farming systems (bio-dynamic, bio-organic, conventional) on yield and quality of beetroot (*Beta Vulgaris* L. var. *Esculenta* L.) in a seven year crop rotation. *Acta Horticulturae* 339, 11-31
- Matthies, K. (1991): Qualitätserfassung pflanzlicher Produkte aus unterschiedlichen Düngungs- und Anbauverfahren. Dissertation, Gesamthochschule Kassel-Witzenhausen.
- Meier-Ploeger, A , Vogtmann, H, (Hrsg.) (1991). Lebensmittelqualität - Ganzheitliche Methoden und Konzepte. Schriftenreihe der Stiftung Ökologie und Landbau, 66. Verlag C.F. Müller, Karlsruhe
- Meier-Ploeger, A, (2001). Qualitative und gesundheitliche Unterschiede von Lebensmitteln aus ökologischem und konventionellem Landbau - ein Vergleich. Fachliche Stellungnahme im Auftrag des Bundesministeriums (BMVEL)
- Merten, D, Lagoni, H, Peters, K-H, (1959). Über den Einfluss von Milch und Milchbestandteilen sowie Milchprodukte auf das Kupferchlorid-Kristallisationsbild. *Kieler Milchwissenschaftliche Forschungsberichte*. XI, 69-79
- Petterson, BD, (1967). Beiträge zur Entwicklung der Kristallisationsmethode mit Kupferchlorid nach Pfeiffer. *Lebendige Erde* 18,1, 15-31.
- Petterson, BD, (1970). Die Einwirkung von Standort, Düngung und wachstumsbeeinflussenden Stoffen auf die Qualitätseigenschaften von Speisekartoffeln. *Lebendige Erde* 21, 4, 134-140
- Petterson, B.D. (1982). Konventionell und biologisch-dynamisch erzeugte pflanzliche Nahrungsstoffe im Vergleich. In: Alternativen im Landbau. Schriftenreihe des Bundesministers für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten. Reihe A: Angewandte Wissenschaft, Heft 263. Landwirtschaftsverlag Münster-Hiltrup, S. 218-228
- Schudel, P, Augstburger, F, Eichenberger, M, Vogtmann, H, Matile, Ph, (1980). Kompost- und NPK-Düngung zu Spinat im Spiegel empfindlicher Kristallisation und analytischer Daten. *Lebendige Erde* 3, 3-15
- Schulz, D.G. und Köpke, U; (1997): Ein ganzheitlicher Ansatz zur Beschreibung der ganzheitlichen Nahrungsmittelqualität: Der Qualitätsindex. In: U. Köpke und J. A. Eisele (Hrsg.). Beiträge zur 4. Wissenschaftstagung zum ökologischen Landbau, 3.-4. März, Bonn, 211-216.
- Selwary, A, (1975). Samenkeimung und Metallpotenzen in Kristallisationstest. Verlag Lebendige

Erde, Darmstadt

Selwary, A, Selwary, O (Hrsg.) (1957). Die Kupferchloridkristallisation in Naturwissenschaft und Medizin. G. Fischer Verlag, Stuttgart

Soil Association (Hrsg.), (2001). Organic Farming, food quality and human health. Soil Association, Bristol

Von Hahn, F, (1962). Thesigraphie, Untersuchungsmethode an biologischen Objekten insbesondere Nahrungsmitteln. Wiesbaden

Weibel, F. P.; Bickel, R.; Leuthold, S.; Alföldi, T.; Niggli, U. und Balzer-Graf, U. (2001): Bioäpfel - besser und gesünder? Eine Vergleichsstudie mit Standard und Alternativmethoden der Qualitätserfassung. Ökologie und Landbau 177, (2001), 25-28

Woese, K, Lange, D, Boess, C, Bögl, KW, (1995). Ökologisch und konventionell erzeugte Lebensmittel im Vergleich eine Literaturstudie. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Heft 04/05; Berlin

7.2 Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie

- Agaverdiyev, A. S., Y. Y. Doskoch und B. N. Tarusov (1965). Effect of low temperatures on the ultraweak luminescence of plants. *Biophysics* 10 S. 920-924.
- Amenda, R. und J. Matschke (1997). Fluoreszenz-Messungen zum Bestimmen der inneren Qualität. *TASPO (Gartenbaumagazin)* S. 47-50.
- Bloksma, J., M. Northolt und M. Huber (2001a). Parameters for Apple Quality. Part 1 Report. Louis Bolk Instituut. Driebergen. 2001. 90 74021 22 0
- Bloksma, J., M. Northolt und M. Huber (2001b). Parameters for Apple Quality. Part 2 Annexes. Louis Bolk Instituut. Driebergen. 2001.
- Colli, L. und U. Facchini (1954). Light emission by germinating plants. *Il nuovo cimento* 12 (1) S. 150-153.
- Colli, L., et al. (1955). Further Measurements on the Bioluminescence of the Seedlings. *Experientia* XI /12 S. 479 - 481.
- Fuchshofen, W. (1994). Aussagekräftigkeit der ganzheitlichen Methoden. GhK Universität Kassel-Witzenhausen und FH Fulda. Witzenhausen. April 1994.
- Hutter, K.-J., et al. (1994). Untersuchungen an verschiedenen Gerstensorten mit Hilfe von Lumineszenz-Verfahren. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* (7/8) S. 237-242.
- Köhler, B. (2000). Der Einfluß von Haltung, Fütterung und Beleuchtung auf die Biophotonenemission (delayed luminescence) sowie herkömmliche Qualitätsparameter von Hühnereiern. Kassel. Fachgebiet Nutztierethologie und artgemäße Tierhaltung (Leitung Prof. Dr. D.W. Fölsch); Fachbereich Landwirtschaft, Internationale Agrarentwicklung und Ökologische Umweltsicherung der Universität GhKassel. Witzenhausen.
- Köhler, B., et al. (1991). Photonemission - Eine neue Methode zur Erfassung der "Qualität" von Lebensmitteln. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 87 (3) S. 78-83.
- Konev, S. V., T. I. Lyskova und G. D. Nisenbaum (1965). Very weak bioluminescence of cells in the ultraviolet region of the spectrum and its biological role. *Biophysics* 11 S. 410-413.
- Kopp, H.-J., K.-D. Paduch und K. Gierschner (1989). Qualitätsuntersuchungen an Gemüse aus konventionellem und alternativem Anbau. Tagung Qualitätsaspekte von Obst und Gemüse. 24. Vortragsstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung DGQ 1989, Ahrensburg, Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung DGQ e.V. S. 102-125.

- Lambing, K. (1992). Nutzung der "low-level-luminescence"-Meßtechnik zur Untersuchung von Lebensmitteln. Universität Kaiserslautern. Kaiserslautern. Seiten
- Mäder, P., et al. (2002). Soil Fertility and Biodiversity in Organic Farming. *SCIENCE* 296 S. 1694-1697.
- Mamedov, T. G., G. A. Popov und V. V. Konev (1969). Ultraweak luminescence of various organisms. *Biophysics* 14 S. 1102-1107.
- Mehlhardt, W., et al. (1982). Verfahren und Vorrichtung zur Qualitätskontrolle von Lebensmitteln. Offenlegungsschrift DE 3040855 A1. Deutschland, Mehlhardt, Wolfgang, Popp, Fritz-Albert, Rattemeyer, Martin, Schmidt, Hans-Günther S. 1-12.
- Meierhans, D. (1994). Schweiz: Eier aus Bodenhaltung oder Auslaufhaltung? (I) u. (II) Biophotonen-Analysen von Hühnereiern. *DGS. Bern* S. 6-8, 6-8.
- Neurohr, R. (1992). Untersuchungen zur spontanen und induzierten Lichtemission von Kresse und Kressesamen. Universität des Saarlandes, Saarbrücken. Saarbrücken. 143 Seiten
- Popp, F.-A. (1980). Über die Bedeutung elektromagnetischer Kopplungen in biologischen Systemen. *Phys. Med. u. Reh.* 21 (6) S. 334-338.
- Popp, F.-A. (1984). *Biologie des Lichts*. Paul Parey, Berlin, Hamburg.
- Popp, F.-A. (1985). Principles of quantum biology as demonstrated by ultraweak photon emission from living cells. *International conference on lasers* S. 311-316.
- Popp, F.-A. (1986). On the coherence of ultraweak photonemission from living tissues. in "Disequilibrium and self-organisation". C. W. Kilmister, D.Reidel Publishing Company S. 207-230.
- Popp, F.-A. (1987). Biophotonenanalyse zu Fragen der Lebensmittelqualität und des Umweltschutzes. *Ökologische Konzepte* 26 (Feb. 1987) S. 39-55.
- Popp, F.-A. (1988). Biophotonen- Analyse der Lebensmittelqualität. in "Lebensmittelqualität-ganzheitliche Methoden und Konzepte". A. Meier-Ploeger und H. H. Vogtmann. Karlsruhe, Georg Michael Pfaff Gedächtnisstiftung, Kaiserslautern und Verlag C.F. Müller GmbH, Karlsruhe. Gesamtherstellung: Ekopan Verlag, Oberburgstr.1, Witzenhausen 1 S. 87-112. 3-7880-9752-3
- Popp, F.-A. (1989). Verfahren zur Prüfung der Qualität und der Qualitätsänderungen von

- biologischen Systemen und mit ihnen wechselwirkenden organisch-chemischen Verbindungen mittels Messung der ultraschwachen Photonenemission. Offenlegungsschrift DE 39 39 411 A1. Deutschland, Popp, Fritz-Albert S. 2-33.
- Popp, F.-A., et al. (1979). Emission of Visible and Ultraviolet Radiation by Active Biological Systems. *Collective Phenomena* 1981 3 S. 187-214.
- Ruth, B. (1977). Experimenteller Nachweis ultraschwacher Photonenemission aus biologischen Systemen. Philipps-Universität. Fachbereich Physik. Marburg. 84 Seiten
- Ruth, B. und F. A. Popp (1976). Experimentelle Untersuchungen zur ultraschwachen Photonenemission biologischer Systeme. *Zeitschrift für Naturforschung* (31c) S. 741-745.
- Schulze Böckenhoff, K. (1994). Zur Eignung der ultraschwachen Photonenemission von Lebensmitteln als ganzheitlicher Parameter der Qualitätsbestimmung. Gesamthochschule Kassel Universität. Ökologischer Landbau. Kassel-Witzenhausen. Diplomarbeit. 78 Seiten
- Strube, J. und P. Stolz (1999a). Zerstörungsfreie Lebensmitteluntersuchung an Ganzproben mittels Biophotonen-Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie. Tagung Zerstörungsfreie Qualitätsanalyse. 34. Vortragsstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung DGQ 1999, Freising-Weihenstephan, Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung S. 249-254. 3-9805230-3-9
- Strube, J. und P. Stolz (1999b). Zur Beurteilung pflanzlicher Proben mittels Biophotonen. BTQ-Tagung 1999, Plankstetten, Verlag KWALIS GmbH, D-36160 Dipperz, Germany S. 1-13.
- Strube, J. und P. Stolz (2000). Fluorescence Excitation Spectroscopy for the Evaluation of Seeds. IFOAM 2000 - The World Grows Organic, 13th International IFOAM Scientific Conference, Basel, vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich S. 306-309. 3 7281 2754 X
- Strube, J. und P. Stolz (2001a). Bohne ist nicht gleich Bohne. *Ökologie & Landbau* 29 (Heft 120) S. 37-39.
- Strube, J. und P. Stolz (2001b). Lichtspeicherung und Lebensmittelqualität. *Ökologie und Landbau* 29 (Heft 117) S. 15-19.
- Strube, J. und P. Stolz (2001c). Untersuchungen zur Qualität von Calendula-Samen mittels

- zeitaufgelöster Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie. Tagung Gewürz- und Heilpflanzen. 36. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) DGQ e.V. 2001, Jena, Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung e.V. Geschäftsstelle c/o Fachgebiet Obstbau, TU München, 85350 Freising-Weihenstephan S. 93-98. 3-9805230-5-5
- Strube, J. und P. Stolz (2002). Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie zur Bestimmung der Qualität von Äpfeln aus ökologischem Anbau. Tagung Qualität und Pflanzenzüchtung. 37. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) DGQ e.V. 2002, Universität Hannover, Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) DGQ e.V. 2002 S. 209-214.
- Teubner, R. (1983). Zur Qualitätsbestimmung von Nutzpflanzen, insbesondere Medizinalpflanzen, mit Hilfe der ultraschwachen Photonenemission. Universität Göttingen. Fachbereich Agrarwissenschaften. Göttingen. Dissertation. 141 Seiten
- Teubner, R., M. Rattemeyer und W. Mehlhardt (1981). Eine neue Methode zur Untersuchung der Qualität von Pflanzen und Früchten. *Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren* 22 (4/81) S. 204-205.
- Veselova, T. V., et al. (1985). Delayed luminescence of air-dry soybean seeds as a measure of their viability. *Physiol. Plant.* 65 S. 493-497.
- Vogelgesang, J. (1997). Qualitätsregelkarte. Die überlegene statistische Qualitätssicherung für Ihre tägliche Analytik. Brüssel, Dr. Jürgen Vogelgesang, Avenue des Traquets 152, B-1150 Brüssel.
- Woese, K., et al. (1995). Ökologisch und konventionell erzeugte Lebensmittel im Vergleich. Eine Literaturstudie. Teil I. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. Berlin. 1995. BgVV-Hefte 4/1995

7.3 Physiologischer Aminosäurestatus

- Abele, U. (1987): Produktqualität und Düngung – mineralisch, organisch, biologisch-dynamisch. Schriftenreihe des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Reihe A: Angewandte Wissenschaft, Heft 345. Landwirtschaftsverlag, Münster-Hiltrup
- Alföldi, T.; Bickel, R. und Weibel, F. (1998): Vergleichende Qualitätsuntersuchungen zwischen biologisch und konventionell angebauten Produkten: Eine kritische Betrachtung der Forschungsarbeiten zwischen 1993 und 1998. Interner Bericht. Forschungsinstitut für biologischen Landbau, Frick /Schweiz 1998
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Beuth Verlag Berlin 2002
- Bloksma, J., Northolt, M., Huber, M. (2001a): Parameters for Apple Quality, Part 1 Report. Louis Bolk Institute, Driebergen, 2001 (ISBN 90-74021-22-0)
- Bloksma, J., Northolt, M., Huber, M. (2001a): Parameters for Apple Quality, Part 2 Annexes. Report. Louis Bolk Institute, Driebergen, 2001 (ISBN 90-74021-22-0)
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (1991): Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, 11. Lieferung, VCH, Weinheim
- DIN EN ISO/IEC 17025 (2000): Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf und Kalibrierlaboratorien. Deutsches Institut für Normung e.V.. Berlin 2000
- Huber, H. Kerpen, J. Pahlich, E.: Der physiologische Index - eine Charakteristik von Produkten aus ökologischem und konventionellem Anbau. In: Lebensmittelqualität - ganzheitliche Methoden und Konzepte; Hrsg.: Meier-Ploeger, A., Vogtmann, H. C.F. Müller Verlag, Karlsruhe 1988
- Kerpen, J. (1988): Untersuchungen zum Vergleich von Möhren (*Daucus carota* L.) aus ökologischen und konventionellem Anbau. Dissertation, Technische Hochschule Berlin.
- Kjer, I. (1993): Die Qualität von Hopfen und Gerste aus ökologischem Anbau und deren Einfluß auf die Zwischen- und Endprodukte der Bierherstellung Dissertation, Gesamthochschule Kassel-Witzenhausen.
- Klett, M. (1968): Untersuchungen über Licht und Schattenqualität in Relation zum Anbau und Test von Kieselpräparaten zur Qualitätserhebung. Institut für Biologisch Dynamische Forschung, Darnstadt 1968

- Kromidas, S.1999:: Validierung in der Analytik, Wiley-VCH Weinheim 1999
- Matthies, K. (1991): Qualitätserfassung pflanzlicher Produkte aus unterschiedlichen Düngungs- und Anbauverfahren. Dissertation, Gesamthochschule Kassel-Witzenhausen.
- Mengel, K.: Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze; Gustav Fischer Verlag, Jena 1991
- Pettersson, B.D. (1970): Die Einwirkung von Standort, Düngung und wachstumsbeeinflussenden Stoffen auf die Qualitätseigenschaften von Speisekartoffeln. *Lebendige Erde*(3): 78-87/134-140.
- Przemeck, E.,: Habilitationsschrift, Universität Göttingen 1971
- Reinken, G.; Keipert, K.; Lindner, U. Overbeck, G. Rüger, H. Tauscher, B. Wedler, A. (1990): Alternativer Anbau von Äpfeln und Gemüse. *Schriftenreihe der Landwirtschaftskammer Rheinland* (66).
- Schmitt, L. und Ott, M.: Chemische und biologische Qualitätsbestimmung gärtnerischer und landwirtschaftlicher Erzeugnisse. *Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik Band IV*, Hrsg R. Herrmann, Neumann Verlag Radebeul und Berlin 1953
- Schulz, D.G. und Köpke, U; (1997): Ein ganzheitlicher Ansatz zur Beschreibung der ganzheitlichen Nahrungsmittelqualität: Der Qualitätsindex. In: U. Köpke und J. A. Eisele (eds). *Beiträge zur 4. Wissenschaftstagung zum ökologischen Landbau*, 3.-4. März, Bonn, 211-216.
- Schuphan, W. (1974): Nutritional value of Crops as influenced by organic and inorganic fertilizer treatments – Results of 12 years‘ experiments with vegetables (1960-1972). *Qualitatis Plantarum - Plant Foods for Human Nutrition* 23 (4): 333 –358
- Schuphan, W. (1976): Mensch und Nahrungspflanze. Der biologische Wert der Nahrungspflanze in Abhängigkeit von Pestizideinsatz, Bodenqualität und Düngung. Dr. W. Junk B.V.-Verlag, Den Haag
- Stöppler, H., Vogtmann, H., Seibel, W., Bolling, H. Gerstenkorn, P. (1989). Moderne Winterweizensorten in einem System mit Geringer Betriebsmittelzufuhr von außen in der Bundesrepublik Deutschland. II. Verarbeitungsqualität der Sorten im Hinblick auf die Herstellung von Brot und Kleingebäck aus Typen- und Vollkornmehl. *Getreide, Mehl und Brot* 43 (9): 272-278.

- Stolz, P., J. Strube, M. Buchmann und C. Hiss (2000). Aminosäuren – Funktionelle Inhaltsstoffe von Pflanzenprotein; Veränderung der Aminosäuregehalte von weißen Bohnen in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen. Beitrag zur 35. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Qualität pflanzlicher Lebensmittel (DGQ) 2000 in Karlsruhe; 3-9805230-4-7.
- Stolz, P., J. Strube, M. Buchmann and C. Hiss (2000). Better Dietary Protein-Quality of Beans Cultivated Biodynamically than by Hydro-Culture. IFOAM 2000-The World grows organic, 13th International IFOAM Scientific Conference Basel, vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich p 302.
- Stolz, P. (2001). Bericht zur Untersuchung von codierten Weizenproben aus dem DOK-Versuch auf Gesamtprotein und Aminosäuregehalte; Interner Bericht)
- Stolz, P. und J. Strube (2002). Zur Wirksamkeit biodynamischer Präparate. Gehalte an Gesamtprotein und freien Aminosäuren bei Äpfeln in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen. (angemeldet als Beitrag zur 37. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Qualität pflanzlicher Lebensmittel (DGQ) am 4./5.3. 2002 in Hannover.
- Vetter, H. ; Kampe, W. ; Ranfft, K. (1983): Qualität pflanzlicher Nahrungsmittel. Ergebnisse dreijähriger Vergleichsuntersuchungen an Gemüse, Obst und Brot des modernen und alternativen Warenangebotes. Schriftenreihe des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (7).
- Weibel, F. P.; Bickel, R.; Leuthold, S.; Alföldi, T.; Niggli, U. und Balzer-Graf, U. (2001): Bioäpfel – besser und gesünder? Eine Vergleichsstudie mit Standard und Alternativmethoden der Qualitätserfassung. *Ökologie und Landbau* 177, (2001), 25-28
- Woese, K. D. Lange, C. Boess und K.W. Bögl (1995) Ökologisch und konventionell erzeugte Lebensmittel im Vergleich – Eine Literaturstudie; Teil I und II. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin 1995

7.4 Elektrochemische Messungen

- Benada, J., Vanova, M. (1972). The growth of the roots of barley in the dependence on oxidation-reduction potential, nitrogen nutrition and aeration of nutrient solution. *Biologia* (Bratislava) 27, 53-61
- Campbell, N, (1998). *Biologie*. 1. korr. Nachdruck, Spektrum Akademischer Verlag, S.97 ff.
- Dicanovic-Lucan Z, Palic, A. (1992). Redoxpotential of wines from Croatian market. *Ztschr. Lebensmitteluntersuchung Forschung* 195, 133-136
- Ehlermann, D. (1979). Die Beurteilung von Lebensmitteln aufgrund elektrischer Eigenschaften. *Mittlg. Gebiete Lebensmittel-Hygiene* 70, 107-116
- Große, W., Jovy, K., Triebel, H. (1996). Influence of plants on redoxpotential and methane production in water-saturated soil. *Hydrobiologica* 340, 93-99
- Hoffmann M (1995). "Lebensmittelqualität - Neue Erkenntnisse zu aktuellen Fragen". Stiftung Ökologie, Bad Dürkheim
- Hoffmann M (Hrsg.) (1997). Vom Lebendigen in Lebensmitteln - Die bioelektronischen Zusammenhänge zwischen Lebensmittelqualität, Ernährung und Gesundheit. Stiftung Ökologie, Bad Dürkheim
- Hoffmann, M. (1997). Electrochemical screening test for malting barley, *Brauwelt* 1/97, 48-49
- Hoffmann, M. (2002): "Lebensmittelqualität elektrochemisch betrachtet" in: *Lebendige Erde* 1/2002, 3 S.
- Hoffmann, M. (2002): "Elektrochemischer Screening-Test und seine gesundheitliche Relevanz" in: *Mühle und Mischfutter*, 1/2002, 2 S.
- Hoffmann, M.; Wolf, G; Staller, B. (2000): "Redoxpotenziale in Lebensmitteln und deren Gesundheitsrelevanz für die Umweltmedizin" in: *Zeitschrift für Umweltmedizin* 2/2000, 4 S.
- Hoppe, W. (Hrsg.) (1977) *Biophysik*, Springer Verlag, S. 250 ff.
- Kemeny, J. (1952) "Beitrag zur physikalischen und mathematischen Erklärung des Reaktionsvermögens der lebenden Organismen" in *Bulletin der Akademie der Wissenschaften*, Berlin, Februar 1952
- Kromidas, S (Hrsg.), (2000). *Handbuch Validierung in der Analytik*. Wiley-VCH, Weinheim
- Meier-Ploeger, A , Vogtmann, H, (Hrsg.) (1991). *Lebensmittelqualität - Ganzheitliche Methoden*

und Konzepte. Schriftenreihe der Stiftung Ökologie und Landbau, 66. Verlag C.F. Müller, Karlsruhe

Meier-Ploeger, A, (2001). Qualitative und gesundheitliche Unterschiede von Lebensmitteln aus ökologischem und konventionellem Landbau - ein Vergleich. Fachliche Stellungnahme im Auftrag des Bundesministeriums (BMVEL)

Schimmöller, (1991), Untersuchung zur Veränderlichkeit von Elektronenpotenzial, pH-Wert und Widerstand in Blut, Speichel und Urin, (Dissertation Universität Würzburg 1991)

Schrödinger, E, (1944). What is life?, Cambridge University Press

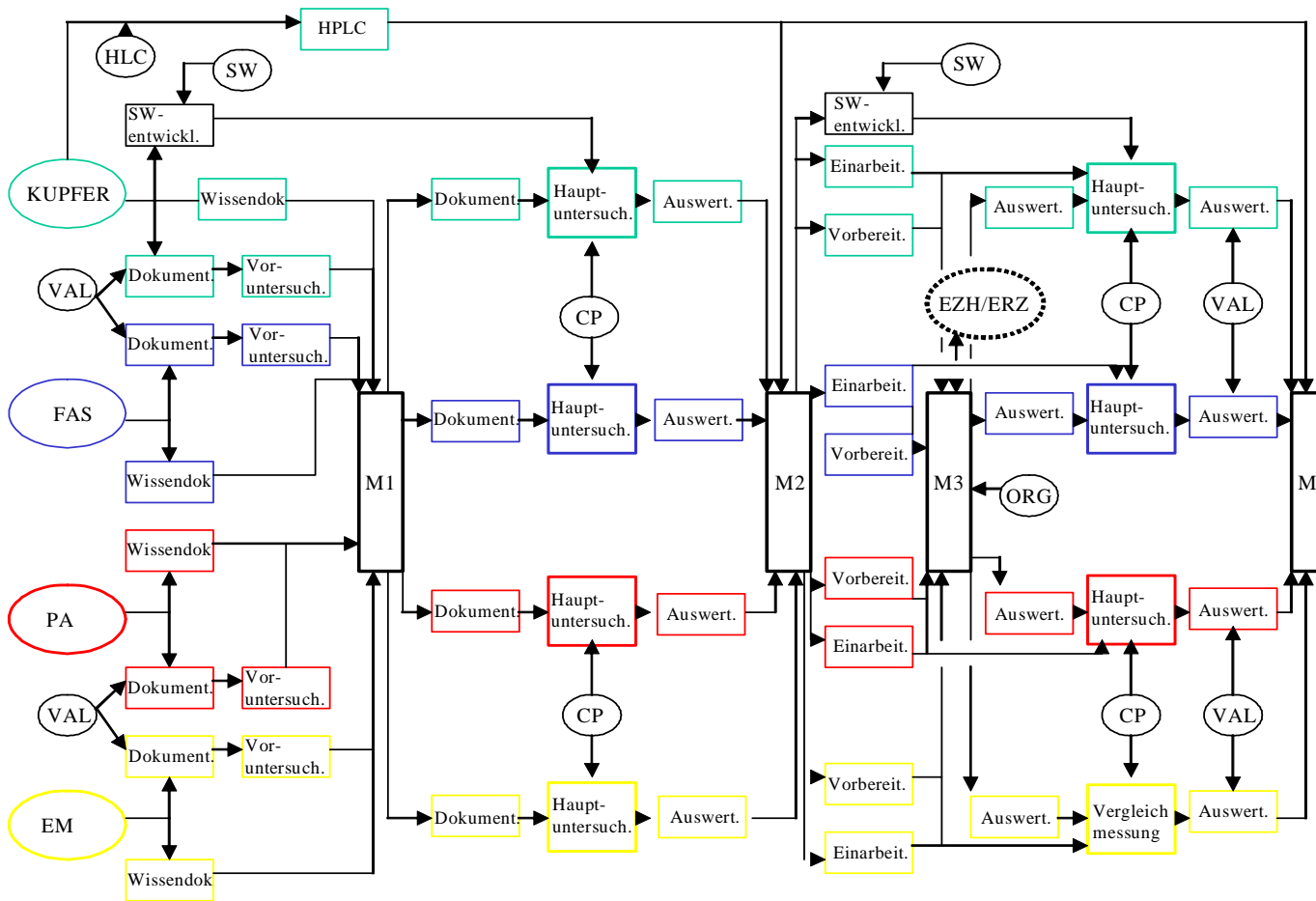
7.5 HPLC-Methode

- Alt, D., Schmidle, A., (1980), Untersuchungen über mögliche Resistenzfaktoren des Apfels gegenüber *Phytophthora cactorum*. *Angew. Botanik*, 54, 95-104
- Brown P. H., Graham, R. D., Nicholas, D.J.D., (1984), The effect of manganese and nitrate supply on the levels of phenolics and lignin in young wheat plants, *Plant and soil*, 81, 437-440
- Cole, R.A., (1984), Phenolic acids associated with resistance of lettuce *Lactuca sativa* cultivars to lettuce root aphid *Pemphigus bursarius*. *Ann. Appl. Biol.* 105, 129-146
- Feucht, D. Treutter, D., (1989), *Phenolische Naturstoffe*, Obst- und Gartenbauverlag des Bayerischen Landesverbandes für Gartenbau und Landespflege e.V.
- Harms, H., (1983), Phenolstoffwechsel von Pflanzen in Abhängigkeit von Stickstoffform und –angebot, *Landwirtsch. Forsch.*, 36, 9-18
- Hentschel, V., Kranl, K., Hollmann, J., Lindhauer, M. G., Bitsch, R., (2002), Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain., *J. Agric. Food Chem.* 50, 6663-6668
- Marbry, T. J., Markham, K. T., Thomas, M. B., (1970), *The systematic identification of flavonoids*. Springer Verlag, New York
- Rechner, A., (2001), Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die Polyphenole und antioxidative Kapazität von Apfel- und Beerenobstsäften, *Univ. Diss. Justus Liebig Universität Gießen*
- Tchoné, M., (2003), Über Polyphenole in Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) und andere gesundheitsrelevante Inhaltsstoffe, *Univ. Diss., TU Berlin*
- Treutter, D. (1988), Separation of naturally occurring mixtures of phenolic compounds from various *Prunus* tissues by reversed-phase high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 436, 490-496

8 Anhang

8.1 Anhang 1: Netzplan

Netzplan, 02OE170



KUPFER, Uni Kassel; CP: codierte P
 FAS, KWALIS 1 ORG: Organis
 PA, KWALIS 2 HLC: HPLC,
 EM, EQC VAL: Bewertu
 SW: SW-Entw., Papyrus ZIELGR: Zie

Ganzheitliche Untersuchungsmethoden zur Erfassung und Prüfung der Qualität ökologischer Lebensmittel

8.2 Anhang 2: Messapparatur elektrochemische Methoden

