



DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR QUALITÄTSFORSCHUNG
(PFLANZLICHE NAHRUNGSMITTEL) E. V.
c/o Fachgebiet Obstbau TUM, 85350 Freising
XXXVII. VORTRAGSTAGUNG, Hannover, 2002

Möglichkeiten und Nutzen von spektrometrischen Methoden in der qualitätsorientierten Züchtung bei Obst und Gemüse

Rolf Quilitzsch

Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenanalytik,
Neuer Weg 22/23, D-06484 Quedlinburg

Chance and advantage of spectrometric methods in quality breeding of fruit and vegetables
Abstract: *If breeders in the selection of plants will focus on quality parameters they need support by a fast analytical or measuring technique. Near infrared (NIR) spectrometry in combination with multivariate regression, e.g. partial least squares (PLS), provides a fast and non-destructive method to predict chemical and physical properties in complex compositions like agricultural and food products. Today the mid infrared (MIR) spectrometry in combination with multivariate statistics also has the potential, to predict chemical properties of plant material faster than time consuming chromatographical analyses. This is made possible by the application of FT-IR spectrometer in combination with a diamond-ATR equipment. A report is given on numerous NIR-spectrometric measurements on carrots, tomatoes, apples and strawberries as well as MIR-spectrometric measurements on carrots and various cabbage species. Reference values of HPLC analyses and materials testing were used to generate individual chemometric models. These models are used to predict quality parameters of vegetables and fruit on the basis of the NIR and MIR spectra.*

Einleitung

Züchtung auf Qualität ist immer nur ein Teilaspekt der Selektion von Kulturpflanzen mit dem Ziel der allgemeinen Gebrauchswertsteigerung. Dabei konzentriert sich der Züchter auf wenige oder meist nur einen Qualitätsparameter, bei dem eine genetisch vorhandene und züchterisch zugängliche Variation vorliegt. Der Züchter muß dabei Auswahlentscheidungen nach Parametern und Inhaltsstoffen treffen. Für objektive Entscheidungen ist die Unterstützung durch chemische Analysen oder physikalische Methoden unbedingt erforderlich. Dabei ist die Mess- und Analystechnik für züchterische Zwecke nur akzeptabel, wenn ein hoher Probendurchsatz gewährleistet ist, die Anwendung möglichst ohne Probenvorbereitung sehr einfach ist und die Genauigkeit soweit ausreicht, dass Pflanzenkollektive bezüglich des Qualitätsparameters unterscheidbar sind. Hier haben spektrometrische Methoden einen Vorteil gegenüber den zeitaufwendigen chromatographischen Trennverfahren. Sie kommen mit minimaler Probenvorbereitung aus und können zum größten Teil auch zerstörungsfrei angewendet werden. Reflexionsmessungen an pflanzlichem Material sind heute im gesamten Spektralbereich von 0,4 μm (25000 cm^{-1}) bis 15,0 μm (666 cm^{-1}) gut zu handhaben, wobei dieser Bereich sich in VIS (sichtbare Strahlung von 0,4 bis 0,8 μm), NIR (Strahlung im nahen Infrarot von 0,8 bis 2,5 μm) und MIR (Strahlung im mittleren Infrarot von 2,5 bis 25,0 μm entsprechend 4000 bis 400 cm^{-1}) gliedert. Die Bereichsangabe erfolgt im MIR ausschließlich

in Wellenzahlen. Die Abbildung 1 zeigt als Beispiel Messungen an einer frischen Möhre. Die Anwendung von Messungen im VIS-Bereich zielen sehr häufig auf eine farbmetrische

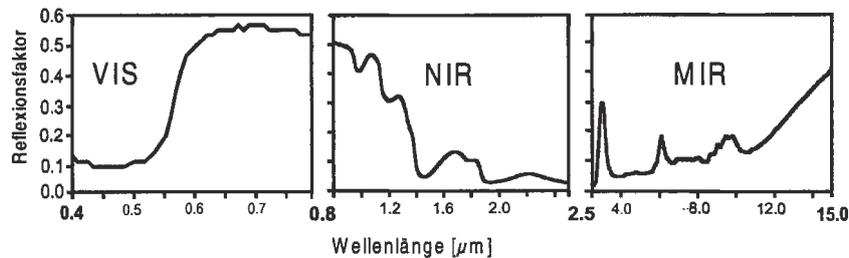


Abbildung 1: Reflexionsspektren von frischem Möhrengewebe in drei Wellenlängenbereichen

Beurteilung von Früchten oder Pflanzenteilen (Quilitzsch 1998, Shaw 1991). Eine besonders starke Zunahme verzeichneten in den vergangenen 10 Jahren die Anwendungen im NIR-Bereich. Dies hat seine Ursachen in der Entwicklung leistungsfähiger NIR-Spektrometer und chemometrischer Auswerteverfahren. Während in der Futtermittel- und Lebensmittelindustrie etablierte Meßverfahren existieren, liegen Beispiele für züchtungsrelevante NIR-spektrometrische Inhaltsstoffbestimmungen nur vereinzelt bei Getreide (Carver 1994), Stärkepflanzen (Berardo u.a. 2000) und Medizinalpflanzen (Schulz u.a. 2001, Schulz 2002, Pank u.a. 2001) vor. Weiterhin findet man Anwendungen der quantitativen NIR-Spektrometrie viel häufiger bei Obst (z.B. Moons u.a. 2000, Peiris u.a. 1998) als bei Gemüse (Tongming u.a. 2000), wobei keine Anwendung züchtungsorientiert ist.

Schnelle Probenpräparation und Messung im mittleren Infrarot (MIR) waren mittels ATR-Vorrichtungen (ATR: abgeschwächte Totalreflexion) lange Zeit nur mit flüssigen Proben möglich (Böcker 1997, Schulz u.a. 2001). Weil die Spektren im MIR bedeutend mehr Informationsgehalt als NIR-Spektren haben und für chemometrische Auswertung ein höheres Bestimmtheitsmaß erwarten lassen, war es erstrebenswert, den MIR-Bereich auch für pflanzliche Proben (frisch, getrocknet und pulverisiert) zu erschließen. Dieses wurde durch Kombination von Diamant-ATR-Technik mit FT-IR-Spektrometern möglich. Mit einer Diamant-ATR-Vorrichtung können feste Proben mit hohem Druck auf den Diamantkristall gepresst werden, so dass die IR-Strahlung in der Grenzschicht des Kristalls mit der Probe wechselwirken kann.

Im folgenden wird über zahlreiche spektrometrische Messungen und deren chemometrischen Auswertungen an Erntegut von Obst und Gemüsekulturen im NIR- und MIR-Bereich berichtet. Dabei werden in der angegebenen Reihenfolge jeweils methodische Einzelheiten und Resultate für einen Spektralbereich besprochen. Betrachtet werden reflexions-spektrometrische Methoden bei den Kulturen Möhre, Tomate, Kohl, Apfel und Erdbeere. Es wird versucht, jede kulturartspezifische Anwendung bezüglich der Aussagekraft für Züchtungsarbeiten zu diskutieren. Die Möglichkeiten der Spektrometrie im VIS-Bereich zur farbmetrischen Charakterisierung des Erntegutes von Pflanzenpopulationen war schon an anderer Stelle diskutiert worden (Quilitzsch 1999).

Methodenentwicklung in der NIR-Spektrometrie von Obst und Gemüse

Es ist für das Verständnis der Methode hilfreich, ihre Charakteristika unabhängig von speziellen Anwendungsfällen an den Anfang zu stellen.

Die NIR-Spektrometrie

- stellt eine schnelle, indirekte (chemometrische) Methode dar, mit der Inhaltsstoffkonzentrationen bzw. äußere Parameter von Proben unbekannter Zusammensetzung und Eigenschaften über deren spektrale Daten bestimmt (vorhergesagt) werden können.
- realisiert die Vorhersagen mit vorher entwickelten Kalibrationen, die zu chemometrischen Modellen führen, mit denen die Korrelation zwischen den spektralen Daten und den Konzentrationen bzw. Parametern beschrieben wird.
- charakterisiert die jeweilige Vorhersage mit entsprechenden Leistungsparametern, d.h. durch Angabe von Bestimmtheitsmaßen und Vorhersagefehlern.
- wird als Messverfahren jeweils an bestimmte Proben angepasst und eine Übertragung auf anders geartete Proben bleibt in der Regel ausgeschlossen.

Einem guten chemometrischen Kalibriermodell geht immer eine doch recht aufwendige Methodenentwicklung voraus. Voraussetzungen für eine Methodenentwicklung sind: 1. ein geeignetes Spektrometer, 2. ein geeigneter Probensatz, 3. eine Referenzanalytik bzw. ein Referenzmessverfahren und 4. ein geeigneter Auswertalgorithmus.

Für die Registrierung von Nah-Infrarotspektren stehen heute, den jeweiligen Anforderungen entsprechend, zahlreiche Spektrometersysteme zur Verfügung, die teilweise auf unterschiedlichen Prinzipien aufbauen. Bei der hier beschriebenen Methodenentwicklung im NIR wurde ein Fourier-Transform-Spektrometer vom Typ EQUINOX 55 (Fa. Bruker, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Das universelle Spektrometer wurde für diesen Zweck mit seinen optischen Komponenten auf den NIR-Bereich eingestellt und benutzt dabei zur Probenbeleuchtung und Messung eine Lichtleitersonde, was für Messungen an Früchten die einzig mögliche Technik ist. Als Probensatz werden viele gleichartige Objekte (Kulturart) mit möglichst großer Variation des zu kalibrierenden Parameters bzw. Inhaltsstoffes benötigt. Um dies zu realisieren, muß man möglichst viele verschiedene Sorten einer Kulturart verwenden und durch Einbeziehung unterschiedlicher Reifestadien oder Lagerzeiten die Variation des interessierenden Inhaltsstoffes (Parameters) noch vergrößern. Die Referenzanalytik für die in Betracht genommenen Pflanzeninhaltsstoffe ist vorwiegend eine chromatographische Methode, in unserem Fall HPLC und HPTLC. Für einen äußeren Pflanzenparameter wie die Festigkeit wird das Referenzverfahren mit einer Materialprüfmaschine realisiert. Bevor das Auswertverfahren zum Einsatz kommt, ist der Ablauf z.B. für Äpfel folgender. An jeder einzelnen Frucht wird an mehreren Stellen (meist 3 bis 5) ein NIR-Reflexionspektrum gemessen. Für die Auswertung wird davon das Mittelwertspektrum verwendet. Die Frucht wird danach an einer Materialprüfmaschine mittels Druckprobe und Penetrometerprobe gemessen. Diese Werte, im Prinzip auch Mittelwerte von 2-3 Messpunkten an der Frucht, werden als Referenzwerte später dem Mittelwertspektrum der Frucht zugeordnet. Danach wird die Frucht zerkleinert und einer Probenvorbereitung für die Zuckeranalyse mittels HPLC zugeführt. Die hierbei gewonnenen Analysenwerte (Einzelzuckerkonzentrationen und deren Summe) werden später ebenfalls dem Mittelwertspektrum der Frucht zugeordnet. Erst ab etwa 60 Mittelwertspektren und dazugehörigen Referenzwerten ist die Durchführung einer chemometrischen Kalibrierung sinnvoll. NIR-Spektrometer sind heute schon vom Hersteller her mit einer bedienerfreundlichen Quantifizierungssoftware ausgestattet, z.B. ist OPUS/Quant 2 in der Spektrometersoftware des EQUINOX55 enthalten. Diese arbeitet mit einem Partial Least Squares Algorithmus (PLS), einer Methode der multivariaten linearen Regression (Henrion 1995). Bei multivariaten Kalibrationen fällt eine große Menge von Daten (zahlreiche Spektren mit hunderten von Datenpunkten) an. Um diese Daten zu verarbeiten, werden sie in Form von Matrizen abgelegt, wobei jede Reihe der Matrix einem

Spektrum entspricht. Die Konzentrations-/Parametermatrix beinhaltet die entsprechenden Konzentrations-/Parameterwerte. Die in den Spektren enthaltene Information wird mit Hilfe der PLS-Regression mit der Information der Konzentrations-/Parameterwerte verglichen. Dabei wird vorausgesetzt, daß die systematischen Veränderungen im Spektrum eine Folge von Konzentrations-/Parameteränderungen der Komponenten sind. Die Matrizen werden nach Informationsgehalt (Varianz) in Eigenvektoren zerlegt, die dann als Faktoren bezeichnet werden. Es müssen nicht alle der Faktoren verwendet werden, um die relevanten spektralen Informationen zu beschreiben. Einige dieser Faktoren beschreiben einfach das spektrale Rauschen der Messung. Nur die relevanten Faktoren werden dann anstelle der originalen spektralen Daten verwendet, was zu einer beträchtlichen Reduzierung der Datenmenge führt. Mit Hilfe des PLS-Algorithmus wird die beste Korrelation zwischen der Spektraldatenmatrix und der Konzentrations-/Parametermatrix gesucht. Diese ist dann das chemometrische Modell für die Vorhersage von Konzentrationen bzw. Parametern aus spektralen Daten. Das Modell muß aber noch getestet werden, um die Verlässlichkeit der Vorhersage zu bestimmen (Validierung). Es gibt zwei verschiedene Arten der Validierung: interne Validierung (Kreuzvalidierung) und externe Validierung (Test-Set-Validierung). Aus praktischen Gründen wird die Kreuzvalidierung häufiger angewandt. Bei der Kreuzvalidierung wird lediglich ein Probensatz für Kalibration und Validierung verwendet. Von der Gesamtheit der Proben wird eine Probe vor Beginn der Kalibration aus dem Satz entfernt. Diese Probe wird für die Validierung verwendet. Mit den restlichen Proben, dem Kalibrationsdatensatz, wird ein chemometrisches Modell erstellt. Anschließend wird die vorher entfernte Probe gegen dieses Modell getestet. Dieser Vorgang wird jedesmal mit einer anderen Probe wiederholt, bis alle Proben einmal zur Validierung verwendet worden sind. Die Software OPUS/Quant2 generiert diesen iterativen Vorgang automatisch, angefangen mit der ersten Probe, bis alle Proben einmal zur Validierung herangezogen worden sind. Mit jeder Validierung ist eine Ausreisserermittlung verbunden. Durch diese können für das Modell ungeeignete Proben erkannt und danach entfernt werden. Nach der Ausreisserentfernung wird die Modellrechnung mit dem kleineren Datensatz wiederholt. Die Güte der Vorhersage von Konzentrationen bzw. Parametern aus spektralen Daten mit dem entwickelten Modell wird durch folgende Größen charakterisiert: Bestimmtheitsmaß R^2 , mittlerer Vorhersagefehler der Kreuzvalidierung RMSECV (root mean square error of cross validation). Das Minimum des RMSECV gibt die optimale Zahl von Faktoren (Rang) des entwickelten Modells an. In den folgenden Abschnitten werden die Anwendungsmöglichkeiten von Vorhersagemodellen für Zucker, Säure, Festigkeit und Carotinoide diskutiert

NIR-spektrometrische Vorhersage von Zucker und Säure in Erdbeeren und Äpfeln

Bei der Züchtung an Obstkulturen spielt der Zuckergehalt sowie sein Verhältnis zum Säuregehalt für die Geschmacksausbildung eine übergeordnete Rolle. Die Selektion bezüglich dieser Kenngröße wurde bisher größtenteils durch sensorische Prüfungen unterstützt. HPLC-Analysen können wegen des erheblichen Zeit- und Arbeitsaufwandes nicht durchgängig züchtungsbegleitend eingesetzt werden. Die schnelle und zerstörungsfreie NIR-spektrometrische Vorhersage von Zucker und Säure hat das Potential, auch ständig züchtungsbegleitend eingesetzt werden zu können. Im folgenden soll dies mit Validierungsergebnissen an Erdbeeren und Äpfeln unterlegt werden. Der Probensatz bestand bei Erdbeeren aus Früchten von 12 Sorten mit verschiedenen Reifegraden. Der Reifegrad wurde nach der Fruchtausfärbung beurteilt. Eine Probe bestand aus 5 Beeren einer Sorte mit annähernd gleichem Reifegrad. Alle an den 5 Beeren gemessenen NIR-Spektren wurden zu einem Mittelwertspektrum zusammengefaßt. Die Mischprobe aus den Beeren wurde mittels HPLC mit RI-Detektion bezüglich Zucker analysiert. Die freie Gesamtsäure der Probe wurde titrimetrisch bestimmt. Die Validierungsrechnungen zeigten für die Ernte 1999 unzureichende Ergebnisse wegen Inhomogenitäten des Probensatzes bezüglich der Zuckergehalte. Deshalb

Tabelle 1: Kreuzvalidierungsergebnisse der NIR-spektrometrischen Bestimmung von Zucker und Säure bei Obstkulturen.

	Erdbeere(1999/2000) 157/110 Spektren			Apfel(2000) 122/100 Spektren		
	Bereich	R ²	RMSECV	Bereich	R ²	RMSECV
Saccharose	0,2-1,0%	0,73	0,09%	0,6-2,6%	0,84	0,14%
Glucose	0,8-1,6%	0,63	0,10%	0,4-1,6%	0,80	0,09%
Fructose	0,8-1,8%	0,79	0,09%	2,1-4,9%	0,81	0,24%
Ges.-Zucker	2,2-3,6%	0,77	0,12%	4,2-7,1%	0,82	0,23%
Ges.-Säure	1,0-2,1%	0,66	0,11%	0,2-1,4%	0,93	0,07%
Zucker/Säure	0,9-3,5	0,85	0,19	4,5-25,8	0,84	1,02

wurde ein Probensatz aus zwei Erntejahren gebildet, mit dem befriedigende Validierungsergebnisse erzielt wurden, wie in Tabelle 1 zu sehen ist. Dabei mußte aber die Ausreisserentfernung so intensiv durchgeführt werden, dass der endgültige Kalibrationsdatensatz nur noch aus 110 Proben bestand. Wenn man den Konzentrationsbereich von Zucker und Säure betrachtet, so ist klar, dass es sich um Minorbestandteile handelt. So ist es doch erstaunlich, dass einige Bestimmtheitsmaße für die NIR-spektrometrische Bestimmung fast den Wert 0,8 erreichen. Die Versuchsdurchführung bei Äpfeln war analog der bei Erdbeeren, nur dass hier die Variationsbreite der Konzentrationen durch unterschiedliche Lagerzeiten vergrößert wurde. Der Probensatz enthielt 8 Sorten. Eine Probe bestand aus 4 Äpfeln einer Sorte mit gleicher Lagerzeit. Die Validierungsergebnisse für Äpfel sind merklich besser als bei Erdbeeren und können für praktische Anwendungen als brauchbar eingestuft werden.

NIR-spektrometrische Vorhersage der Fruchtfestigkeit von Tomaten und Äpfeln

Beim Experimentieren mit den NIR-spektrometrischen Methoden stellte sich heraus, dass nicht nur Inhaltsstoffe sondern auch äußere Parameter von Früchten mit der Variation von NIR-Spektren korrelieren. Das bietet zum Beispiel die Möglichkeit, die Druck- und Schalenfestigkeit von Früchten zerstörungsfrei über spektrale Reflexionsmessungen vorherzusagen. Für die Erstellung von Kalibrierbeziehungen für Tomaten und Äpfel wurden pro Frucht 5 Reflexionsmessungen mit der Fasersonde durchgeführt. Das Mittelwertspektrum wurde den entsprechenden Referenzwerten zugeordnet. Die Referenzwerte wurden mit einer Materialprüfmaschine TIRAtest 27025 mit entsprechend empfindlichem Kraftsensor gemessen. An jeder Frucht wurden drei Druckproben und drei Penetrometerproben durchgeführt. Die jeweiligen Mittelwerte stellen die Referenzwerte für die Druckfestigkeit und die Schalenfestigkeit der Frucht dar. Nach den Festigkeitsmessungen erfolgte abschließend noch eine gravimetrische Trockenmassebestimmung für jede Frucht. Der Probensatz für Tomaten bestand aus 6 Sorten mit unterschiedlichen Reifegraden und mehreren Ernteterminen. Der Probensatz für Äpfel bestand aus 8 Sorten (siehe Zuckerbestimmung) mit verschiedenen Lagerzeiten. Die Berechnung einer Kalibration mit anschließender Kreuzvalidierung wird immer für jede Kenngröße separat durchgeführt und liefert einen Validierungsplot (Referenzwerte versus spektrometrisch vorhergesagte Werte). Abbildung 2 zeigt als Beispiel eines der Resultate bei Äpfeln (N-Anzahl der Proben). Die Zusammenfassung aller Ergebnisse aus zwei Versuchsjahren ist in Tabelle 2 dargestellt. Nach den erreichten Bestimmtheitsmaßen sind für alle äußeren Fruchtparameter gute Vorhersagen möglich mit Ausnahme des Trockenmassegehaltes von Tomaten.

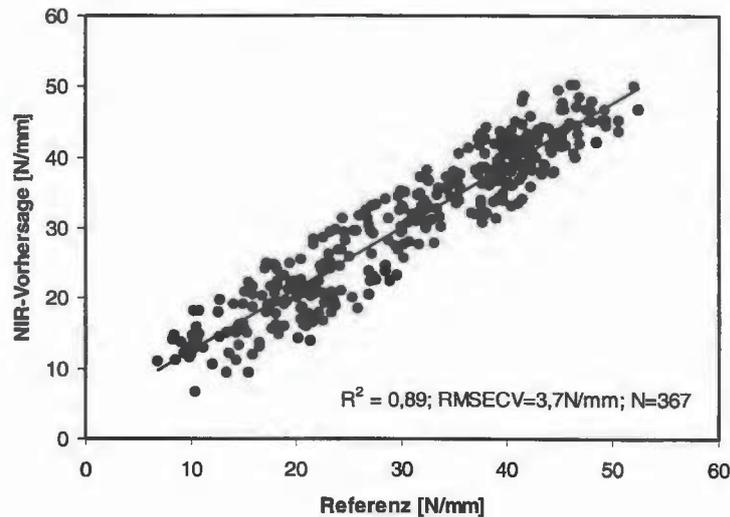


Abbildung 2: Kreuzvalidierungsplot für die Druckfestigkeit von Äpfeln (Ernte 2000)

Tabelle 2: Kreuzvalidierungsergebnisse der NIR-spektrometrischen Bestimmung von Festigkeiten und Trockenmassegehalt

Versuch	N	Druckfestigkeit: F/dl(D)			Schalenfestigkeit: F/dl(P)			Trockenmassegehalt			
		Bereich N/mm	R ²	RMSECV N/mm	Bereich N/mm	R ²	RMSECV N/mm	Bereich %	R ²	RMSECV %	
Tomate	1999	177	2,2-16,3	0,84	1,18	0,4-6,0	0,81	0,46	4,4-7,0	0,60	0,36
	2000	150	2,5-23,5	0,85	2,00	1,0-10,0	0,80	1,05	3,7-6,8	0,57	0,45
Apfel	1999	220	5,2-53,7	0,87	3,85	3,2-19,0	0,92	1,10	11,9-22,1	0,94	0,45
	2000	367	6,8-52,5	0,89	3,7	5,0-24,7	0,86	1,67	10,8-23,3	0,95	0,51

Die Tabelle 2 demonstriert zusammen mit der Tabelle 1 einen bedeutenden Vorteil der NIR-Spektrometrie, nämlich die Möglichkeit der simultanen Bestimmung mehrerer Parameter oder auch Inhaltsstoffkonzentrationen mit einem Mittelwertspektrum pro Frucht. Im Beispiel der Äpfel hat man den günstigen Fall, daß mit einem Mittelwertspektrum pro Frucht insgesamt 9 Kenngrößen (Inhaltsstoffe und Festigkeiten) vorhergesagt werden können. Die Voraussetzungen sind natürlich die schon erarbeiteten Kalibriermodelle für alle Kenngrößen.

Dieser bedeutende Vorteil der quantitativen NIR-Spektrometrie sollte bei Züchtungsarbeiten von Nutzen sein, auch wenn der Anfangsaufwand relativ groß erscheint.

NIR-spektrometrische Vorhersage von Carotinoiden in Möhren

Da die gleichmäßige Ausfärbung des Wurzelkörpers von Möhren eindeutig auf eine homogene Verteilung wenigsten der Hauptcarotinoide α - und β -Carotin hinweist, sollten diese sich auch in der chemometrisch nachweisbaren Variation von NIR-Reflexionsspektren niederschlagen. Das konnte innerhalb von dreijährigen Versuchen durch stabile Validierungsergebnisse bestätigt werden (Tabelle 3). Es wurden generell Mittelwertspektren jeder

Tabelle 3: Kreuzvalidierungsergebnisse der NIR-spektrometrischen Bestimmung von α -, β - und Gesamtcarotin in Möhren

Versuch	N	α -Carotin			β -Carotin			Gesamt-Carotin		
		Bereich mg/100ml	R ²	RMSECV mg/100ml	Bereich mg/100ml	R ²	RMSECV mg/100ml	Bereich mg/100ml	R ²	RMSECV mg/100ml
1997	288	1,2-22,8	0,76	1,88	4,4-29,2	0,86	1,61	5,9-52,0	0,83	3,08
1998	627	2,5-25,3	0,80	1,69	2,3-45,4	0,72	3,48	9,3-72,7	0,76	5,46
1999	304	1,1-12,3	0,78	0,95	3,8-24,7	0,73	2,11	5,9-36,9	0,78	2,71

einzelnen Möhre (3 Meßpunkte längs verteilt) den HPLC-Analysenwerten an der gleichen Möhre zugeordnet. Am Versuch 1998 waren Exemplare von 28 Sorten beteiligt. Wenn man berücksichtigt, dass es sich bei den Carotinoiden um Minor Komponenten handelt, so können die erreichten Bestimmtheitsmaße als befriedigend bezeichnet werden. Bei der Züchtung von Industriemöhren auf hohen Carotinoidgehalt kann die NIR-spektrometrische Bestimmung als eine begleitende Kontrollmethode von Bedeutung sein.

Methodische Ansätze der MIR-spektrometrischen Bestimmung von Pflanzeninhaltsstoffen von Gemüse

Seit etwa einem Jahr kann im IPA der BAZ gering aufgearbeitetes Pflanzenmaterial im mittleren Infrarot (MIR) gemessen werden. Die Messungen wurden an einem Gerät des Typs „Travel-IR“ der Resultec Analytic Equipment (Garbsen, Deutschland) durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein Fourier-Transform-IR-Spektrometer mit fest montierter Diamant-ATR-Vorrichtung und einem Mikro-Video-System zur Probenbeobachtung (Coates u.a. 2000, Feustel 2001). Bei der Diamant-ATR-Vorrichtung sind ein Diamant- und Zinkselenidkristall so zusammengefügt, dass an der freien Oberfläche des Diamantkristalls die Totalreflexions-

bedingung für Infrarotstrahlung erfüllt ist. Dort werden die Proben (flüssig oder fest) aufgebracht. Im Fall von festen oder pulverförmigen Proben werden diese zur Verbesserung des Kontaktes mit dem Kristall durch eine Anpressvorrichtung mit definiertem Druck angepresst. Der Anpressdruck kann in acht Stufen eingestellt werden, was durch eine Leuchtdiodenzeile angezeigt wird. Die Fläche des Diamantkristalls beträgt ca. 1,8 mm², so dass Probenmengen von 2 bis 5 µl für die Registrierung eines Spektrums ausreichen. Die ATR-Spektren wurden im Wellenzahlenbereich 650 – 4000 cm⁻¹ mit einer spektralen Auflösung von 2 cm⁻¹ registriert. Die Auswertung der Spektren erfolgte ebenfalls mit dem Programm Opus/Quant 2.0, wie es schon weiter oben für die Arbeiten im NIR-Bereich

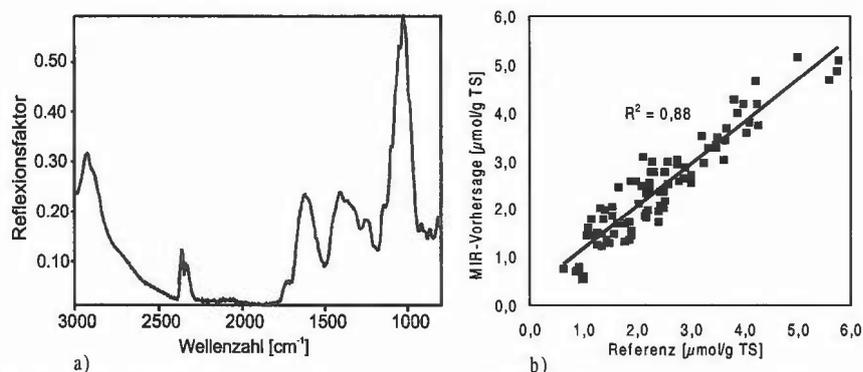


Abbildung 3: ATR-Spektrum von Kohlpulver (a) und Kreuzvalidierungsplot für den Inhaltsstoff Iberin (b)

beschrieben worden ist. Die an gefriergetrocknetem, pulverisiertem Material von Kopfkohl gemessenen Spektren wurden gemeinsam mit den Glucosinolatgehalten (HPLC-Bestimmung) der gleichen Proben für eine chemometrische Modellbildung verwendet. Die Abbildung 3 zeigt ein Beispielspektrum (a) und den Validierungsplot für die Vorhersage von Iberin (b).

Tabelle 4: Kreuzvalidierungsergebnisse der ATR-IR-spektrometrischen Bestimmung von Glucosinolatgehalten in Kohlpulver

Inhaltsstoff	Bereich	R ²	RMSECV
Glucobrassicin	0,8-5,3 µmol/g TS	0,69	0,5 µmol/g TS
Iberin	0,6-5,8 µmol/g TS	0,88	0,4 µmol/g TS
4-Methoxyglucobrassicin	0,4-1,2 µmol/g TS	0,73	0,1 µmol/g TS
Sinigrin	1,5-7,3 µmol/g TS	0,80	0,6 µmol/g TS

Der Probensatz bestand aus 107 Proben, wobei 18 Kohlsorten mit Wiederholungen vertreten waren. Es konnten mit den MIR-Spektren und den vorliegenden HPLC-Analysenwerten für 4 Glucosinolate Kalibriermodelle berechnet werden. Die Ergebnisse der Kreuzvalidierungen sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die erreichten Werte können als befriedigend bezeichnet werden und lassen weitere erfolgreiche Anwendungen an pulverförmigem Pflanzenmaterial erwarten. Des weiteren wurden mit dem „Travel-IR“ Messungen an frischem Möhrengewebe und Möhrensaft durchgeführt. Der Probensatz bestand aus 240 frischen Möhren (4 Sorten, 2 Ernten im Abstand von 4 Wochen). Von jeder Möhre wurde ein 2 mm starker Streifen

abgeschnitten und sofort auf den Diamant-ATR-Kristall gelegt, angepresst und spektrometrisch vermessen. Jede gemessene Möhre wurde sofort zu Saft verarbeitet, danach wurde der Saft mit der Diamant-ATR und parallel dazu mit einer konventionellen horizontalen ATR (HATR) am EQUINOX 55 gemessen. Der Saft wurde danach zunächst tiefgefroren und zu einem späteren Zeitpunkt mittels HPTLC analysiert. Mit den analysierten Zuckerwerten und den drei verschiedenen Spektrensätzen konnten drei verschiedene Vorhersagemodelle berechnet werden. Die Tabelle 5 zeigt die drei MIR-spektrometrischen Methoden im Vergleich mit der NIR-spektrometrischen Methode (an der ganzen Möhre).

Tabelle 5: Vergleich der Kreuzvalidierungsergebnisse für verschiedene spektrometrische Vorhersagemethoden für Gesamtzucker und Fructose bei Möhren

	Gesamtzucker			Fructose		
	Bereich	R ²	RMSECV	Bereich	R ²	RMSECV
HATR (Saft)	0,7-16,2%	0,92	0,92%	0,0-7,7%	0,94	0,41%
Diamant-ATR (Saft)	0,7-16,2%	0,91	0,95%	0,0-7,7%	0,94	0,40%
Diamant-ATR (Möhre)	0,7-15,3%	0,61	2,00%	0,0-7,0%	0,65	1,00%
NIR (Möhre)	1,5-11,8%	0,83	1,00%	0,0-4,6%	0,81	0,54%

Wegen der Übersichtlichkeit sind nur für den Gesamtzucker- und einen Einzelzucker-gehalt die Validierungsergebnisse gegenübergestellt. Die beiden Methoden mit Saft haben gleichermaßen die besten Ergebnisse. Die Diamant-ATR-Methode hat dabei noch den Vorteil der sehr geringen benötigten Probenmenge. Es zeigt sich ganz deutlich, dass die Zuckerbestimmung an Möhrensaft mittels ATR-IR-Spektrometrie eine brauchbare Schnellmethode werden kann.

Zusammenfassung

Die Nützlichkeit und Handhabung spektrometrischer Methoden mit ihren chemometrischen Auswertalgorithmen zur schnellen Bestimmung von Inhaltsstoffen und Parametern konnte für zwei Spektralbereiche an verschiedenen Früchten von Obst- und Gemüsekulturen gezeigt werden. Die vorliegenden Erfahrungen bei der Erarbeitung von Kalibrierungen bezüglich der bearbeiteten Kulturarten sind von Nutzen bei einer Anwendung auf weitere Kulturarten oder können Ausgangspunkt von praxisnahen Anwendungen bei Züchtungsarbeiten sein. Auch sind die Möglichkeiten einer Kombination von Methoden mit unterschiedlichen Spektralbereichen an einer Kulturart sehr vielversprechend. So kann aus den bisherigen Ergebnissen bei Möhre die Kombination von Farbmeterik (Homogenitätsbestimmung), NIR-Spektrometrie (Carotinoïdbestimmung) und MIR-Spektrometrie (Zuckerbestimmung) als Schnellmethoden-satz empfohlen werden. Die Möglichkeiten für eine praxisnahe Nutzung sind auch dadurch gegeben, dass es für die besprochenen Spektralbereiche mobile Geräte auf dem Markt gibt.

Danksagung

Der Autor dankt Dr. T. Nothnagel (BAZ), St. Schwarz (BAZ) und Dr. E. Roth (LALG Ditfurt) für die Bereitstellung des Versuchsmaterials, Dr. E. Hoberg (BAZ) und Dr. W. Schütze (BAZ) für die Betreuung der HPLC-Analysen, Frau C. Helmund für die sorgfältige Ausführung aller spektrometrischen Messungen und Dr. M. Feustel (Resultec Analytic Equipment, Garbsen) für die Nutzungsmöglichkeit des „Travel-IR“.

Literatur

- Berardo N, Previtali F, Bertolini M* (2000) Near infrared reflectance spectroscopy for selecting high amylo maize lines in breeding programmes. Proc. of 9th Int. Conf. NIR-99, Verona, Italien. NIR Publications; Charlton, Chichester: 651-654
- Böcker J* (1997) Spektroskopie: Instrumentelle Analytik mit Atom- und Molekülspektrometrie. Würzburg: Vogel Buchverlag: 162-175
- Carver B F* (1994) Genetic implications of kernel NIR hardness on milling and flour quality in bread wheat. J. Sci. Food Agric. 65: 125-132
- Coates J, Sanders A* (2000) A universal sample handling system for FT-IR spectroscopy. Spectroscopy Europe 12(5): 12-22
- Feustel M* (2001) FTIR-Routineanalytik mit Durchblick. LaborPraxis 25: 16-18
- Henrion R, Henrion G* (1995) Multivariate Datenanalyse: Methodik und Anwendung in der Chemie und verwandten Gebieten. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag: 103-157
- Moons E, Dardenne P* (2000) Determination of internal apple quality by non-destructive visible and near infrared spectroscopy. Proc. of 9th Int. Conf. NIR-99, Verona, Italien. NIR Publications; Charlton, Chichester: 785-789
- Pank F, Blüthner W D, Krüger H, Junghanns W, Overkamp J* (2001) Züchtungserfolg verhilft einjährigem Kümmel (*Carum carvi* L. var. *Annuum hort*) zum Durchbruch. Z.Arzn.Gew.Pfl. 6: 109-114
- Peiris K H S, Dull G G, Leffler R G, Kays S J* (1998) Near infrared spectrometric method for nondestructive determination of soluble solids content of peaches. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123 (5): 898-905
- Quilitzsch R* (1998) Die Bestimmung von züchtungsrelevanten Qualitätsparametern an gartenbaulichen Kulturarten mittels Farbmetrik und Reflexionsspektroskopie. VDI/MEG Kolloquium Agrartechnik, Heft 30, Qualität von Agrarprodukten: 182-192
- Quilitzsch R* (1999) Farbmetrik bei Obst und Gemüse-Interpretationsmöglichkeiten und Grenzen. In: Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung, XXXIV. Vortragstagung, Freising-Weihenstephan, 187-192
- Schulz H, Schrader B, Quilitzsch R, Steuer B* (2001) Quantitative analysis of various citrus oils by ATR/FT-IR and NIR-FT Raman spectroscopy. Applied Spectroscopy 56(1): 117-124
- Schulz H, Steuer B, Krüger H, Schütze W* (2001) Möglichkeiten und Grenzen NIR-spektroskopischer Qualitätsbestimmung pflanzlicher Drogen. Z.Arzn.Gew.Pfl. 6: 138-142
- Schulz H* (2002) Potential of NIRS for supporting breeding and cultivation of medicinal and spice plants. Proc. of 10th Int. Conf. NIR-2001, Kyongju, Korea (im Druck)
- Shaw D V* (1991) Genetic variation for objective and subjective measures of fresh fruit color in strawberries. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116(5): 894-898
- Tongming J, Ling L, Hang C, Xiangyang Z, Duoqia W* (2000) Application of near infrared spectroscopy for quality evaluation of vegetables in China. Proc. of 9th Int. Conf. NIR-99, Verona, Italien. NIR Publications; Charlton, Chichester: 907-910