

***Metabolomics*-basierte Herkunftsbestimmung von
weißem Spargel mittels NMR-Spektroskopie**

DISSERTATION

zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften

Doctor rerum naturalium

am Institut für Lebensmittelchemie, Fachbereich Chemie, Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg.

Vorgelegt von Juliane Klare.

Hamburg 2021.

Tag der mündlichen Prüfung:	05.02.2021
Prüfungsvorsitz, Betreuer:	Prof. Dr. Markus Fischer
Erstgutachter, Co-Betreuer:	Dr. Thomas Hackl
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Bernward Bisping
Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:	Prof. Dr. José A. C. Broekaert Prof. Dr. Stephan Seifert Prof. Dr. Wolfgang Maison
Druckfreigabe:	16.06.2021

*„Wenn Du Kartoffeln oder Spargel isst,
schmeckst du den Sand der Felder und den Wurzelsegen,
des Himmels Hitze und den kühlen Regen,
kühles Wasser und den warmen Mist.“*

Carl Zuckmayer

I Publikationsliste

Poster „Regionalverbandstagung Nord“, 2014: FOOD PROFILING - Authentizitätsbestimmung von Lebensmitteln; Klare, J., Creydt, M., Felbinger, C., Werner, P., Hackl, T., Fischer, M.

Poster „Deutscher Lebensmittelchemikertag“, 2014: Food Profiling: Analytische Strategien zur Authentizitätsbestimmung von Lebensmitteln

Werner, P., Klare, J., Creydt, M., Klockmann, S., Felbinger, C., Hünninger, T., Hackl, T., Fischer, M.

Poster „Fachgruppe Magnetische Resonanz“, 2014: Analytical Strategies for Verification of Food Authenticity; Klare, J., Bollen, A., Creydt, M., Klockmann, S., Felbinger, C., Werner, P., Fischer, M., Hackl, T.

Poster „Deutscher Lebensmittelchemikertag“, 2015: Entwicklung einer Methode zur Isolierung des polaren Metaboloms von Spargel; Klare, J., Grube, T., Hackl, T., Fischer, M.

Poster „ISEAC“, 2016: Determination of the geographical Origin of Asparagus using NMR-based Metabolite Profiling; Klare, J., Rottmann, E., Grube, T., Richter, B., Creydt, M., Hackl, T., Fischer, M.

Poster „Fachgruppe Magnetische Resonanz“, 2016: SPARGEL MONITORING – Determination of the geographical Origin of Asparagus using NMR-based Metabolite Profiling; Klare, J., Rottmann, E., Grube, T., Richter, B., Creydt, M., Hackl, T., Fischer, M.

Poster „Regionalverbandstagung Nord“, 2017: SPARGEL MONITORING – Herkunftsbestimmung von weißem Spargel mittels NMRbasierter Metabolomicsanalyse; Klare, J., Rottmann, E., Grube, T., Richter, B., Creydt, M., Hackl, T., Fischer, M.

Publikation: Klare, J., Rurik, M., Rottmann, E., Bollen, A., Kohlbacher, O., Fischer, M., Hackl, T., 2020. Determination of the Geographical Origin of *Asparagus officinalis* L. by ¹H NMR Spectroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry.

II Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
1D/2D-¹H-NOESY	One/Two-dimensional ¹ H-Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
3DCC	Three-dimensional cross correlation
AiF 18349 N	Projekt Nr. 18349 N der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen
Av	<i>Avalim</i>
Ba	<i>Backlim</i>
BB	Brandenburg
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSA	Bovine serum albumin
BW	Baden-Württemberg
BWN	Baden-Württemberg Nord
BWS	Baden-Württemberg Süd
BY	Bayern
BYAb	Bayern Abensberg
BYFr	Bayern Franken
BYSr	Bayern Schrobenhausen
Cu	<i>Cumulus</i>
DE	Deutschland
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DS	Number of dummy scans
ES	Spanien
FC	Foreign Country
FID	Free induction decay
FNR	False negative results
Gi	<i>Gijnlim</i>
Gr	<i>Grolim</i>
GR	Griechenland
Grv	<i>Gravel</i>
GHS	Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals
He	<i>Herkulim</i>
HE	Hessen
H-Sätze	Hazard-Sätze

II Abkürzungsverzeichnis

ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
IR-MS	Isotope Ratio Mass Spectrometry
intSOP	interene Standardarbeitsanweisung (Standard operating procedure)
J-RES	J-Resolved Spectroscopy
LC-MS	Liquid chromatography mass spectrometry
LDF	Lineare Diskriminanzfunktion
Mo	<i>Mondeo</i>
MT	Mediterranean (Spargelproben aus dem mediterranen Raum)
NB	Neighbours (Spargelproben aus den Nachbarländern Deutschlands)
NI	Niedersachsen
NIR	Nah-Infrarot
NL	Niederlande
NMR	Nuclear magnetic resonanz
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NS	Number of Scans
NW	Nordrhein-Westphalen
NWBo	Nordrhein-Westphalen Bornheim
NWWa	Nordrhein-Westphalen Walbeck
O1P	Transmitter frequency offset
OS	Oversea (Spargelproben von Übersee)
PCA	Principal component analysis
PE	Peru
PLS	Partial least square analysis
PLS-DA	Partial least square discriminant analysis
PL	Polen
PROF-1H	Automationsmessprogramm eines 1D- ¹ H-NOESY-Experiments
PROF-JRES	Automationsprogramm zur Messung eines J-resolved Experiments
P-Sätze	Precautionary-Sätze
RNA	Ribonukleinsäure
Rfl	<i>Rafelo</i>
RP	Rheinland-Pfalz
Rmd	<i>Ramada</i>
Rmr	<i>Ramiris</i>
Rps	<i>Rapsody</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH	Schleswig-Holstein

II Abkürzungsverzeichnis

TEG	Temperaturgradient
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TPR	True positive results
Y	L-Tyrosin

<u>Größen und Einheiten</u>	<u>Bedeutung</u>
€	Euro
μ	Mikro
c	Konzentration
D1	Relaxation delay
G	Gehalt
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
Hz	Hertz
K	Kelvin
k	Kilo
L	Liter
m	Masse [g]
M	Mega
M	Molare Masse [g/mol]
ml	Magnetische Quantenzahl
min	Minute
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
ppm	Parts per million
rpm	Rounds per minute
s	Sekunde
Skt	Skalenteile
t	Tonne
T1	Longitudinale Relaxation (Spin-Gitter-Relaxation)
T2	Transversale Relaxation (Spin-Spin-Relaxation)
TD	Size of FID
v	Chemische Verschiebung
V_P	Probenvolumen
V_Y	Volumen der L-Tyrosin-Stammlösung
ω	Lamorfrequenz

III Inhaltsverzeichnis

I Publikationsliste.....	I
II Abkürzungsverzeichnis.....	II
III Inhaltsverzeichnis.....	V
1 Zusammenfassung / <i>Abstract</i>	1
1.1 Methodenentwicklung / method development.....	1
1.2 Statistische Auswertung / statistical analysis.....	3
1.3 targeted Analyse / targeted analysis.....	5
2 Einleitung und allgemeine Grundlagen.....	7
2.1 Geschützte Herkunftsbezeichnungen der europäischen Kommission.....	7
2.2 Verfälschungsproblematik des Spargels.....	9
2.3 Projektidee und Umsetzung.....	10
3 Theoretischer Teil.....	12
3.1 Gemüsespargel (<i>Asparagus officinalis</i> L.).....	12
3.1.1 Wortherkunft und Botanik.....	12
3.1.2 Popularität und Nährstoffzusammensetzung.....	13
3.1.3 Die Wertschöpfungskette.....	14
3.1.4 Marktsituation und Anbaugebiete.....	16
3.1.5 Sorten.....	17
3.2 Metabolomics.....	18
3.2.1 Die <i>Omics</i> -Kaskade und der Begriff „ <i>Metabolomics</i> “.....	18
3.2.2 Geschichte und Forschungsstand.....	23
3.3 NMR-Spektroskopie im Metabolomics-Bereich.....	29
3.3.1 Das 1D- ¹ H-NOESY-Experiment.....	31
3.4 Statistische Auswertung.....	37
3.4.1 Hauptkomponentenanalyse (<i>Principal Component Analysis</i> , PCA).....	38
3.4.2 <i>Partial Least Square Discriminant Analysis</i> (PLS-DA).....	42
3.4.3 <i>random forest</i>	44
3.4.4 Kreuzvalidierung.....	49
4 Zielsetzung und Problemstellung der Arbeit.....	50
5 Ergebnisse und Diskussion.....	51
5.1 Methodenentwicklung.....	55
5.1.1 Probenahme.....	55
5.1.2 Probenvorbereitung.....	58
5.1.3 Probenaufarbeitung.....	64

III Inhaltsverzeichnis

5.1.4 Metabolomstabilität.....	82
5.1.5 Proteingehaltsbestimmung der Spargelextrakte nach BRADFORD	86
5.2 Statistische Auswertung.....	88
5.2.1 Vergleich deutscher Spargelproben.....	88
5.2.2 Vergleich deutscher und ausländischer Spargelproben	102
5.2.3 <i>targeted</i> Analyse	115
6 Ausblick.....	129
7 Experimenteller Teil.....	130
7.1 Materialien und Geräte.....	130
7.2 Methoden.....	134
7.2.1 Probenahme.....	134
7.2.2 Probenvorbereitung	136
7.2.3 Methodenentwicklung der Probenaufarbeitung.....	141
7.2.4 Probenaufarbeitung.....	146
7.2.5 NMR-spektroskopische Messung	153
7.2.6 NMR-Analyse und Metabolitidentifikation	159
7.2.7 Multivariate Datenanalyse	159
7.2.8 Metabolomstabilität.....	160
7.2.9 Proteingehaltsbestimmung der Spargelextrakte nach BRADFORD	161
8 Literaturliste.....	166
9 Anhang.....	183
9.1 Abbildungen.....	183
9.2 Tabellen.....	189
9.3 Entsorgung	210
IV Abbildungsverzeichnis	VII
V Tabellenverzeichnis	XIII
VI Formelverzeichnis.....	XVI
VII Danksagung.....	XVII
VIII Eidesstattliche Erklärung.....	XIX

1 Zusammenfassung / Abstract

Die erzielten Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Methodenentwicklung, der multivariaten Datenauswertung sowie der *targeted* Analyse mit anschließender Strukturaufklärung werden im Folgenden zusammengefasst.

The achieved results and conclusions of the method development, the multivariate data analysis as well as the targeted analysis with subsequent structure elucidation are summarized in the following.

1.1 Methodenentwicklung / method development

Die Entwicklung einer Methode zur kernresonanzspektroskopischen Untersuchung des Metaboloms von weißem Spargel umfasst sowohl die Probenahme, die Probenvorbereitung als auch die Probenaufarbeitung. Auf die Entwicklung und Optimierung der Probenaufarbeitungsmethode wurde besonderes Augenmerk gelegt, um den bestmöglichen Extraktionserfolg zu bewirken sowie den Anforderungen der NMR-Analytik gerecht zu werden.

Die Methodenoptimierung basiert auf einzelnen Methoden, welche in der Literatur bereits an mehreren ähnlichen Biofluid- oder Lebensmittelmatrices angewandt wurden (Le Gall *et al.*, 2003; Fatma *et al.*, 2012; Mannina *et al.*, 2012; Beckonert *et al.*, 2007; Consonni *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2008). Als bestes Extraktionsgemisch für die Probenaufarbeitung und -vermessung von weißem Spargel eignet sich eine Kombination aus deuteriertem Methanol und einem deuterierten Kaliumhydrogenphosphatpuffer (100 mM im Gemisch) im Verhältnis 1:2. Die Zugabe von Methanol- d_4 zur Denaturierung der in Lösung befindlichen Proteine erfolgt zuerst, worauf ein Extraktionsschritt (BeadRuptor 24) folgt; sodann wird die Pufferlösung hinzugefügt und zwei weitere Extraktionsschritte werden angeschlossen. Weiterhin stellt das Methanol- d_4 eine sehr gute Lösungsmittelwahl dar, da es eine äußerst effektive Extraktion ermöglicht (Punkt 5.1.3.1.1). Mit Hinblick auf die Spektrenauswertung liefert der Einsatz von Methanol- d_4 den Vorteil, dass es nur zwei Signale hervorruft: das Signal der Hydroxygruppe, welches unter dem Signal des Wassers liegt sowie ein Quintett bei 3.3 ppm. Die Wahl des Puffers fiel auf einen Kaliumhydrogenphosphatpuffer, da dessen Puffer-Bereich im neutralen Bereich (pH 6-8) liegt und somit für die meisten *Metabolomics*-basierten Studien mit entsprechenden pH-Bereichen anwendbar ist. Hinsichtlich der Vergleichbarkeit von NMR-Spektren in *Metabolomics* Datenbanken kann dies auf lange Sicht von Vorteil sein. Weiterhin ermöglicht der Puffer eine sehr hohe Stabilität der Probenextrakte. Als Additive werden dem Puffer

1 Zusammenfassung / Abstract

Natriumazid zur Verhinderung des biologischen Verderbs und TMSP als Referenzierungsreagenz hinzugefügt.

Die optimierte Extraktionsmethode erweist sich als eine schnelle, effiziente, einfache und reproduzierbare Methode für die Anwendbarkeit probenzahlintensiver *Metabolomics*-basierter Studien, wenn auch Anpassungen in Abhängigkeit von der Probenmatrix notwendig sein können. Durch die Abtrennung der Proteine im ersten Extraktionsschritt mit Hilfe des zusätzlich konservierend wirkenden Lösungsmittels Methanol und aufgrund des Natriumazid-Zusatzes sind die Proben bis zu zwei Tage lagerbar, bevor sie vermessen werden. Diese Vorteile kommen insbesondere der Routineanalytik in stark ausgelasteten Laboratorien zugute.

The method development for Metabolomics-based research of white asparagus using nuclear magnetic resonance spectroscopy includes sample acquisition, sample preparation and sample extraction. Special attention was paid to the development and optimization of the sample extraction method to achieve the best possible extraction results and to meet the NMR-associated requirements.

The method optimization is based on individual methods that have already been applied to a number of similar biofluid or food matrices in the literature (Le Gall et al., 2003; Fatma et al., 2012; Mannina et al., 2012; Beckonert et al., 2007; Consonni et al., 2009; Wu et al., 2008). The best extraction results achieved were obtained using a combination of deuterated methanol and a deuterated potassium hydrogen phosphate buffer (100 mM in mixture) in a ratio of 1:2. For protein precipitation methanol-d₄ is added first followed by an extraction step (BeadRuptor 24), then the buffer solution is added and two further extraction steps are applied. Methanol-d₄ not only serves as a very good solvent as it allows an extremely effective extraction (5.1.3.1.1); with regard to full spectra analysis the use of methanol-d₄ has also the advantage showing only two signals: the signal of the hydroxy group which is covered by the water signal and a quintet at 3.3 ppm. A potassium hydrogen phosphate buffer was chosen due to its neutral buffer range (pH 6-8) why it is applicable for most Metabolomics-based studies with the respective pH ranges. Consequently, this is an advantage regarding comparability of NMR spectra in Metabolomics databases. Furthermore, the buffer allows high stability of the sample extracts. Sodium azide was added to the buffer to prevent biological spoilage and TMSP was added as reference substance.

The optimized extraction method proves to be a fast, efficient, simple and reproducible method suitable for the application of a high-throughput Metabolomics-based study, though minor changes might be necessary depending on the investigation matrix. Resulting from the precipitation of the proteins during extraction using the preservative solvent methanol and due to the addition of sodium azide the samples can be stored for up to two days before they are

measured. These advantages are especially beneficial for routine analysis in laboratories with high workloads.

1.2 Statistische Auswertung / statistical analysis

Die statistische Auswertung der 279 Spargelproben wurde im Wesentlichen mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse (PCA) sowie zweier Klassifikationsmodelle, der PLS-DA und *random forest*, durchgeführt.

Zur Unterscheidung von Spargel aus unterschiedlichen Gebieten innerhalb Deutschlands wurden die nord- und süddeutschen Spargelproben untersucht. Die biologische Diversität dieser beiden Gruppen infolge klimatischer Unterschiede wurde am höchsten eingeschätzt und sollte der Präzisierung und Erhöhung der Aussagegenauigkeit der Ergebnisse dienen; darüber hinaus standen hier die größten Probengruppen zur Verfügung, was die statistische Aussagekraft unterstützt. Die Trennungsfrage nord- und süddeutscher Spargelproben musste aufgrund der noch unzureichenden Genauigkeit (*explained variance* der PCA: 42.5 %; *accuracies* der PLS-DA und der *random forest* Klassifikation: 88.2 % und 83.8 %) verfeinert werden. Erst nach schrittweiser Eliminierung einzelner Einflussfaktoren (Erntejahr und Sorte) konnte die Trennung der beiden Gruppen verbessert werden. Die Klassifikation mittels PLS-DA erreichte eine *accuracy rate* von 95.0 % bei Einbezug der nord- und süddeutschen Spargelproben der Sorte *Gijnlim* aus dem Erntejahr 2015. Aus mathematischer Sicht stellt dies in Anbetracht der limitierten Probenanzahl ein sehr gutes Ergebnis dar; das Ergebnis kann in der Graphik der PLS-DA gut verbildlicht werden (Abbildung 42).

Nach der Auswertung der Proben auf nationaler Ebene folgte selbiges Vorgehen auf internationaler Ebene. Die Länder-Differenzierung ließ mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse bereits sehr gute Ergebnisse zu. Der Zusammenhang der externen Bedingungen eines Anbaugesbietes (Klima, Bodenbeschaffenheit und -zusammensetzung, pH-Wert, der Gebrauch von Düngern und Pflanzenbehandlungsmittel, etc.) und der graphischen Trennbarkeit kann um die Vermutung erweitert werden, dass sich Regionen mit größerer geographischer Distanz auch in der statistischen Analyse einfacher unterscheiden lassen. Mit Hilfe der Klassifizierungsmodelle wurden der Separierungserfolg und die Qualität der Vorhersagemethoden erhöht. Mit einer 100 %igen Vorhersagegenauigkeit in der *random forest* Klassifizierung der Gruppe „Oversea“, einer *accuracy rate* von 97.2 % deutscher Spargelproben gegenüber den Probengruppen „Neighbours“, „Mediterranean“ und „Oversea“ und einer Gesamt-*accuracy* von 91.1 % dieser vier Probengruppen (DE, NB, MT, OS) konnten sehr gute Ergebnisse erzielt werden. Bei der Unterscheidung deutscher und ausländischer Spargelproben wird eine 92.4 %ige Vorhersagegenauigkeit des Gesamtmodells mittels

1 Zusammenfassung / Abstract

random forest erreicht. Die Werte können als verlässliche Nachweise für das Funktionieren der Methode und die korrekte Herangehensweise interpretiert werden. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Statistical analysis of 279 asparagus samples was primarily performed using principal component analysis (PCA) and the classification models PLS-DA and random forest.

In order to distinguish asparagus from different areas within Germany, the northern and southern German asparagus samples were investigated. The biological diversity of the two groups was estimated to be the highest due to the largest climatic differences which was intended to result in more precision and to increase the accuracy rate; furthermore, these groups represent the largest sample group which supports the statistical power. The separation of northern and southern German asparagus samples had to be refined due to insufficient accuracy rates (explained variance of PCA: 42.5 %; accuracies of PLS-DA and random forest classification: 88.2 % and 83.8 %). After elimination of influencing factors such as harvest year and variety the separation of the two groups could be improved. Classification using PLS-DA achieved an accuracy rate of 95.0 % including northern and southern German asparagus samples of the variety Gijnlim from the harvest year 2015. From a mathematical point of view, this is a very good result considering the limited number of samples, results can be illustrated well in the PLS-DA (Figure 42).

After evaluation of samples at national level the international level was investigated. Country differentiation allowed very good results using principal component analysis. The correlation between external conditions of a cultivation area (climate, soil properties and composition, pH-value, the use of fertilizers and plant protection products, etc.) and the statistical separability can be extended. It can be assumed statistical separation to be easier with increasing geographical distances of two regions. Using the classification models separation results improve and the quality of the prediction methods increase. With a 100 % prediction accuracy in the random forest classification of the group "Oversea", an accuracy rate of 97.2 % German asparagus samples compared to the sample groups "Neighbors", "Mediterranean" and "Oversea" and a total accuracy of 91.1 % of these four sample groups (DE, NB, MT, OS), very good results were achieved. For the differentiation of German and foreign asparagus samples a 92.4 % prediction accuracy of the overall model using random forest classification was achieved. The values can be interpreted as reliable evidence for the functioning of the method and the correct approach. All results are summarized in Table 1.

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Klassifizierungsergebnisse von weißen Spargelproben unterschiedlicher Sorten, aus verschiedenen Anbauregionen und Erntejahren

Table 1: Comparison of the classification results of white asparagus samples of different varieties, from different growing regions and harvest years

Gegenüberstellung Comparison	random forest	PLS-DA
Nord/Süd-DE – alle Jahre, alle Sorten <i>North/South-DE – all years, all varieties</i>	83.8 %	88.2 %
Nord/Süd-DE – alle Jahre, nur <i>Gijnlim</i> <i>Northern/Southern-DE– all years, Gijnlim only</i>	76.2 %	78.2 %
Nord/Süd-DE – 2015, nur <i>Gijnlim</i> <i>Northern/Southern-DE– 2015, Gijnlim only</i>	85.0 %	95.0 %
Nord/Süd-DE – 2015, alle <i>Gijnlim</i> -Proben (inklusive 15-DE-SH-Saf-Gi-I bis IV) <i>Northern/Southern-DE – 2015, all Gijnlim samples (incl. 15-DE-SH-Saf-Gi-I to IV)</i>	96.7 %	96.7 %
Nord/Süd-DE – 2016, nur <i>Gijnlim</i> <i>Northern/Southern-DE – 2016, Gijnlim only</i>	80.0 %	85.0 %
DE/NL/PL/ES/GR/PE, 2015/16 <i>DE/NL/PL/ES/GR/PE – 2015/2016</i>	88.6 %	77.6 %
DE/NB/MT/OS, 2015/16 <i>DE/NB/MT/OS – 2015/2016</i>	91.1 %	91.5 %
DE/AUSL, 2015/16 <i>DE/Foreign Countries – 2015/2016</i>	92.4 %	93.2 %

1.3 targeted Analyse / targeted analysis

Die Herangehensweise zur statistischen Identifizierung chemischer Markersubstanzen konnte ausgehend von einer *random forest* Vorhersage über den *importance plot*, den *boruta plot* und den *box plot* veranschaulicht werden. Anhand dieser Werkzeuge lässt sich sehr gut veranschaulichen, welche *buckets* für die Trennung von besonderer Relevanz sind, ob sie miteinander korrelieren und mit welcher Signifikanz sich eine Gruppe von den übrigen Gruppen anhand dieses/r *buckets* unterscheidet. Zwei *buckets*, welche für die *targeted* Analyse beispielhaft untersucht wurden, konnten identifiziert werden (6.84 ppm, 7.17 ppm); sie scheinen von besonderer statistischer Relevanz zu sein und sind auch aus chemischer Sicht für die Trennungsfrage deutscher und peruanischer Proben spezifisch genug.

1 Zusammenfassung / Abstract

Auf analytischer Ebene finden sich mit Hilfe der Informationen aus dem Protonenspektrum (Kopplungskonstanten, chemische Verschiebung, Peakformen), dem J-RES-Experiment (Aufspaltung der beobachteten Signale im Mischspektrum) und dem TOCSY-Spektrum (Korrelation verschiedener Kernsignale innerhalb eines Moleküls) wichtige Hinweise zur Aufklärung der gesuchten Struktur/en. Der Abgleich der statistisch ermittelten *buckets* bei 6.84 ppm und 7.17 ppm konnte spektroskopisch nachvollzogen, Korrelationen untereinander nachgewiesen und anhand von Datenbanken (HMDB) eine vermutete Struktur abgeglichen werden. Der postulierte Analyt L-Tyrosin, eine Aminosäure, welche in höheren Konzentrationen in peruanischem Spargel vorzukommen scheint und daher für diese Gruppe spezifisch ist, konnte in einem Dotierungsexperiment nachgewiesen werden. Eine erste Erklärung für die höhere Konzentration des Stoffes könnte die Adaption der peruanischen Pflanzen an die intensivere Sonneneinstrahlung aufgrund der Höhenlage der Anbaugelände sein. Diese Vermutung wäre in einer weiterführenden Arbeit näher zu untersuchen.

Statistical identification of chemical markers was conducted using a random forest-based importance plot, a boruta plot and a box plot. Using these tools, buckets of particular relevance for separation can be illustrated very well, also whether they correlate with each other or how strong a group differs from other groups based on this/these bucket(s). Two buckets which were exemplarily examined for targeted analysis could be identified (6.84 ppm, 7.17 ppm); they seem to be of particular statistical relevance and are also specific enough for separation of German and Peruvian samples from a chemical point of view.

On the analytical level, the information from the proton spectrum (coupling constants, chemical shift, peak shapes), the J-RES experiment (splitting of the observed signals in the mixed full spectra) and the TOCSY spectrum (correlation of different nuclear signals within a molecule) provide important hints elucidating the structure(s) sought. Spectroscopical assignment of the statistically determined buckets at 6.84 ppm and 7.17 ppm could be conducted, correlations among each other could be proven and a suspected structure could be matched by means of databases (HMDB). The postulated analyte L-tyrosine, an amino acid which seems to occur in higher concentrations in Peruvian asparagus and is therefore specific for this group, could be detected and assigned in a spike-in-experiment. A first explanation for the higher concentration of the substance could be the adaptation of Peruvian plants to the more intense solar radiation due to the altitude of the growing areas. This assumption should be investigated in detail in a further work.

2 Einleitung und allgemeine Grundlagen

Das Bewusstsein vieler Verbraucher/innen über den Nahrungsmittelkonsum sowie das Bedürfnis, qualitativ hochwertige Lebensmittel zu sich zu nehmen, steigt mehr und mehr. Immer häufiger wird mit produktionsassoziierten Qualitätsprädikaten wie „frisch vom Feld“, „Bio“, „naturbelassen“ oder auch bezüglich der Herkunft mit Aussagen wie „aus Deutschland“, „aus Italien“ oder „nur echt aus dem Schwarzwald“ geworben. Diese Lebensmittel werden oft mit einem höheren Standard in der Qualitätssicherung und somit auch höheren Kosten – im Vergleich zur konventionellen Herstellung – produziert, um den höheren Qualitätsansprüchen, die die/der Verbraucher/in mit diesen Lebensmitteln verknüpft, gerecht zu werden. Die Verbraucher/innen sind daher auch bereit, höhere Preise für diese Lebensmittel zu zahlen (GfK, 2014; Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, Qualitätskontrolle, 2005). Dies wiederum führt nicht selten zu Verfälschungsversuchen durch kriminell motivierte Händler, insbesondere auf Wochenmärkten, auf denen die Rückverfolgbarkeit der angebotenen Waren oft nur erschwert möglich ist. Derartige Irreführungen der Verbraucher sind nach Art. 13 Abs. 2 und 3 VO (EU) Nr. 1151/2012 nicht zulässig (Deutsches Patent- und Markenamt, 2012; Herrmann *et al.*, 2008).

Dem Schutze dieser Produkte sollen sogenannte „geschützte Herkunftsbezeichnungen“ dienen, welche durch die europäische Kommission nach einer aufwändigen Prozedur vergeben werden, die die/den Antragssteller/in und dessen Produkt überprüft. Auch bei der Antragsstellung und –gewährung entstehen der/m Erzeuger/in Kosten, welche das geschützte Produkt preislich meist von konventionellen Produkten abheben. So besitzt solch ein Herkunftssiegel auf der einen Seite die Funktion der eindeutigen Herkunftsdeklaration; auf der anderen Seite liefert es aufgrund der damit verbundenen höheren Kosten den Verfälschern einen weiteren Anreiz, diese Siegel zu kopieren und ihre Waren unter Angabe falscher Produktherkünfte zu vertreiben. (Deutsches Patent- und Markenamt, 2012; Herrmann *et al.*, 2008)

2.1 Geschützte Herkunftsbezeichnungen der europäischen Kommission

Die geschützten Herkunftsbezeichnungen lassen sich in drei Gruppen gliedern: Zum einen gibt es die „geschützte Ursprungsbezeichnung“, auch g. U. genannt oder zu Englisch „Protected Designation of Origin“, abgekürzt PDO. Diese Auszeichnung beschreibt all diejenigen Produkte, die alle Schritte der „Erzeugung, Verarbeitung und Herstellung eines Erzeugnisses in einem bestimmten geografischen Gebiet nach einem anerkannten und

2 Einleitung und allgemeine Grundlagen

festgelegten Verfahren“ durchlaufen haben. Das hierfür verwendete Symbol ist in Abbildung 1 zu sehen. (European Commission, 2020a)



**Abbildung 1: Europäisches Gütezeichen für eine geschützte Ursprungsbezeichnung (g. U.)
(European Commission, 2020a)**

Das Gütezeichen in Abbildung 2 beschreibt ein Produkt mit einer sogenannten g. g. A., einer „geschützte geografische Angabe“, zu Englisch PGI, „Protected Geographical Indication“. Dieses Siegel wird einem Produkt verliehen, sobald eine „enge Verbindung der landwirtschaftlichen Erzeugnisse und Lebensmittel mit dem Herkunftsgebiet“ vorliegt und „mindestens eine der Produktionsstufen – also Erzeugung, Verarbeitung oder Herstellung – im Herkunftsgebiet durchlaufen wird“. (European Commission, 2020a)



**Abbildung 2: Europäisches Gütezeichen für eine geschützte geografische Angabe (g. g. A.)
(European Commission, 2020a)**

Letztlich kommt auch der „garantiert traditionellen Spezialität“, kurz g. t. S. oder zu Englisch „Traditional Speciality Guaranteed“ (TSG) eine besondere Bedeutung zu. Demnach wird hier eine „traditionelle Zusammensetzung des Erzeugnisses“ oder ein „traditionelles Herstellungs- und/oder Verarbeitungsverfahren“ vorausgesetzt. Das Siegel ist in Abbildung 3 dargestellt. (European Commission, 2020a)



**Abbildung 3: Europäisches Gütezeichen für eine garantiert traditionelle Spezialität (g. t. S.)
(European Commission, 2020a)**

Allgemein bekannte Produkte mit einer geschützten Herkunftsbezeichnung sind beispielsweise Bordeaux-Wein, Champagner, Parmesan oder Fetakäse. Einige Produkte, welche den Schutz der europäischen Gütezeichen genießen, haben auch ihren Ursprung in Deutschland. So gibt es zum Beispiel Schwarzwälder Kirschwasser, Salzwedeler Baumkuchen oder aber auch Spargel, welcher insgesamt sechs Mal in Deutschland mit dem Siegel „g. g. A.“ versehen wird. Diese Bezeichnungen sind für folgende Anbauggebiete zugelassen: Bornheim und Walbeck in Nordrhein-Westfalen, Franken, Abensberg, Schrobenhausen in Bayern und Beelitz in Brandenburg. (European Commission, 2020b)

2.2 Verfälschungsproblematik des Spargels

Spargel gilt in Deutschland als Edelgemüse, weshalb Verbraucher/innen dazu bereit sind, hohe Preise für die regionalen Erzeugnisse zu zahlen (GfK, 2014; Schlicht *et al.*, 2006). Dies erhöht den Anreiz zur Verfälschung dieser Produkte im Allgemeinen, insbesondere aber des kostspieligeren Spargels aus den geschützten Anbaugebieten. Um den hohen Eigenbedarf an weißem Spargel decken und auch außerhalb der ca. sieben- bis achtwöchigen Saison frischen Spargel anbieten zu können, bezieht Deutschland Importe aus dem Ausland, vorrangig aus Griechenland, Spanien, Peru sowie aus den Nachbarländern Polen, den Niederlanden oder Frankreich. Laut Statistischen Bundesamt wurden in Deutschland im Jahr 2018 133,020 t Spargel angebaut (Statista, 2020c). Davon wurden 4,083 t in andere Länder exportiert und zusätzlich 24,464 t aus dem Ausland importiert (Statista, 2020e). Einige dieser Importländer, wie beispielsweise Polen, Griechenland oder Peru, vertreiben Spargel sehr günstig. Insbesondere auf Wochenmärkten, auf denen lose Waren ohne Banderolen oder sonstigen Etiketten zur Rückverfolgbarkeit angeboten werden, besteht häufig der Verdacht, dass der teure, deutsche Spargel mit günstigerem, ausländischem Spargel gestreckt oder gänzlich ersetzt wird. Die Deklaration der Waren ist leicht fälschbar und Rückverfolgbarkeitspapiere sind nur selten einsehbar.

2 Einleitung und allgemeine Grundlagen

Aufgrund der immer präsenter werdenden Verfälschungsproblematik von Lebensmitteln, bedarf es einer geeigneten analytischen Methode, welche in der Lage ist, die Authentizität dieser Lebensmittel festzustellen. Mit der zu entwickelnden Methode soll zukünftig eine schnelle Aufdeckung des Betrugs ermöglicht und die damit einhergehenden finanziellen Einbußen regionaler Händler minimiert werden. Das Ziel dieser Doktorarbeit ist es, ein analytisches Nachweismodell zur Herkunftsbestimmung von weißem Spargel, als Basismodell für die Anwendung auf andere polare Matrices, mit Hilfe der NMR-Spektroskopie zu erstellen.

2.3 Projektidee und Umsetzung

Wie aus Punkt 2.2 hervorgeht, gestaltet es sich als schwierig, die Authentizität des hochpreisigen Gemüses rein visuell oder anhand von Dokumenten zu überprüfen. Bisher existiert eine Methode, welche auf der Isotopenverteilung von Sauerstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel im Gemüse basiert – die Stabilisotopenmethode (IRMS – Isotope Ratio Mass Spectrometry). Die Unterschiede zwischen Proben verschiedener geographischer Herkunftsgebiete liegen mitunter in den klimatischen Bedingungen vor Ort begründet. So spielt der Niederschlag eine entscheidende Rolle, da sich die Wolken von Norden nach Süden abregnen. Es finden sich oftmals ähnliche Isotopenverhältnisse in den Böden und in der Pflanze wieder, wenn die Herkunftsgebiete keine allzu große Entfernung zueinander aufweisen, auf ähnlichen Breitengraden liegen und einem vergleichbaren Klima ausgesetzt sind, wie beispielweise Polen und Deutschland. Die Elementprofile können daher oft nicht vollständig differenziert werden (CVUA-MEL, 2009).

Die Stabilisotopenmethode wird in den amtlichen Untersuchungsbehörden schon seit Langem eingesetzt. Sie weist die oben beschriebenen Schwachstellen auf, was dazu führt, dass das Verfahren oft nicht als gerichtstauglich anerkannt wird (Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, Qualitätskontrolle, 2005). Die Genauigkeit der Vorhersagemodelle unbekannter Proben muss für eine gerichtsfeste Beurteilung erhöht werden.

In der Hamburg School Of Food Science (HSFS) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Markus Fischer (Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg) und Herrn Dr. Thomas Hackl (Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg) in Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe unter Herrn Prof. Dr. Oliver Kohlbacher (Institut für Bioinformatik, Universität Tübingen) entstand daher folgende Projektidee: Auf Grundlage verschiedener Messtechniken soll ein Analysenmodell etabliert werden, welches eine möglichst eindeutige Aussage über die Herkunft einer unbekanntes Spargelprobe liefert.

2 Einleitung und allgemeine Grundlagen

Dieses Projekt wurde unterstützt von der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF 18349 N). Dabei wurden zum einen die kernmagnetresonanzspektroskopische Untersuchung (NMR, vorliegende Doktorarbeit) und zum anderen die massenspektrometrische Analyse nach vorangegangener Flüssigkeitschromatographie (LC-MS) in einer weiteren Doktorarbeit durchgeführt (Creydt *et al.*, 2018).

Zur Bestimmung ihrer Leistungsfähigkeiten, wurden die im Rahmen dieses Projektes entwickelten Methoden mit Methoden der Herkunftsbestimmung, die dem aktuellen Stand der Technik entsprechen (IR-MS), gesetzt (Klare *et al.*, 2020). Hierzu wurden von ausgewählten Spargelproben die Isotopenverhältnisse von Wasserstoff, Sauerstoff, Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel im Rahmen eines externen Dienstleistungsauftrags (Agroisolab GmbH, Jülich) vermessen. Für den Vergleich der statistischen Analyse der kernresonanzspektroskopischen und Stabilisotopen-basierten Ergebnisse wurde mit dem Institut für Bioinformatik unter der Leitung von Prof. Dr. Oliver Kohlbacher (Universität Tübingen) zusammengearbeitet.

Zusätzlich wurden zur Begleitung des Projekts AiF 18349 N im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit die Stoffwechselprodukte mittels Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS) sowie die Elementzusammensetzung des Spargels und des Bodens mittels induktiv-gekoppeltem Plasma und nachfolgender Massenspektrometrie (ICP-MS) untersucht (Richter, Rurik *et al.*, 2019; Richter, Gurk *et al.*, 2019).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit werden die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Methodenentwicklung und der statistischen Auswertung der erfassten Daten dargestellt.

3 Theoretischer Teil

Im folgenden Kapitel sollen die theoretischen Grundlagen und der aktuelle Kenntnisstand über die verwendete Versuchsmatrix und die Analysemethoden vermittelt werden, um den Kontext, die Arbeitsschritte und die Aus- und Bewertung der Ergebnisse nachvollziehbar zu gestalten.

3.1 Gemüsespargel (*Asparagus officinalis* L.)

Die verwendete Versuchsmatrix dieser Doktorarbeit stellt der weiße Gemüsespargel dar. Das Lebensmittel wurde aus mehreren Gründen ausgewählt:

Zum einen sollte ein wirtschaftliches Interesse hinter dem Untersuchungsobjekt stehen; das heißt die Problematik der gefälschten Herkunft, welche insbesondere den regionalen Herstellern des kostspieligen Gemüses präsent ist, bildet einen der Hauptargumente für die Wahl dieses Lebensmittels. Zum anderen sollte der aktuelle Forschungsstand auf diesem Gebiet Raum für die unter Punkt 2.3 beschriebene Projektidee lassen. Hinsichtlich dieses Argumentes eignete sich der Gemüsespargel sehr gut, da im Rahmen der *Metabolomics*-basierten Herkunftsbestimmung von Spargel zu Projektbeginn noch keine nennenswerte Forschungsarbeit veröffentlicht worden ist. Schließlich galt es, eine Methode zu entwickeln, welche sich aufgrund der wasserreichen Gewebematrix leicht auf andere stark wasserhaltige Lebensmittel übertragen lässt. Auch diese Bedingung erfüllte das Lebensmittel.

3.1.1 Wortherkunft und Botanik

Der botanische Name des Gemüsespargels *Asparagus officinalis* L. deutet auf die frühere heilkundliche Verwendung (*officinalis* = heilkräftig) des Spargels hin. Die genaue Bedeutung des botanischen Namens ist bislang ungeklärt. So kann „asparagus“ von dem griechischen Verb „sparago“ (die Sprossen) oder aber vom griechischen Wort „apartos“ (ungesät) abgeleitet werden.

Die einkeimblättrige Staudenpflanze gehört der Familie der Spargelgewächse (Asparagaceae) an, zu welcher etwa 300 Arten gehören. Hierbei ist nur die Art *Asparagus officinalis* L. sowohl in kultivierter als auch in wildwachsender Form in Deutschland anzufinden. (Löbell, G., Löbell, E., 2000; Strobl, 2015)

Die mehrjährige Pflanze, welche aus Rhizom, Spross und Blättern besteht, ist zweihäusig, das heißt es gibt sowohl weibliche als auch männliche Pflanzen. Aus den weiblichen Samen werden in Saatzuchtbetrieben die für die Spargelanlagen benötigten Setzlinge gezogen. Aus den männlichen Pflanzen können die Setzlinge als Hybride für den Spargelanbau verwendet

3 Theoretischer Teil

werden. Sie weisen eine höhere Beständigkeit und damit einhergehend eine höhere Lebensdauer und einen größeren Ertrag auf. (Löbell, G., Löbell, E., 2000)

3.1.2 Popularität und Nährstoffzusammensetzung

Schon in der Antike galt Spargel durch seine Heil- und Ernährungsfunktion als „göttliche Speise“. Seit dem 16. Jahrhundert wurde es als Luxusgemüse an verschiedenen Königs- und Fürstenhöfen verzehrt. Bedingt durch die Rarität aufgrund der kurzen Saison sowie die individuellen Ansprüche beim Anbau erzielte der Spargel damals bereits hohe Preise. Im Zuge der Industrialisierung im 19. Jahrhundert wurde der Spargelanbau durch die Anlage von Spargelfeldern revolutioniert. Auch in normalerweise weniger gut geeigneten Gegenden wurde der Anbau durch die Behandlung großflächiger Felder möglich. Der Transport von Gütern im großen Maßstab konnte mit Hilfe der Eisenbahn bewerkstelligt werden und überregionale Märkte mit Spargel versorgt werden. Der Spargelanbau entwickelte sich zu einem wichtigen Wirtschaftsfaktor. (Löbell, G., Löbell, E., 2000)

Zur Zeit des Zweiten Weltkrieges kam dem wasserreichen Gemüse (ca. 93 % Wasser) aufgrund seines geringen Nährwertes kaum eine Bedeutung zu. Das Begehren nach weißem Spargel wuchs mit dem wiederkehrenden Wohlstand nach dem Krieg und er wurde aufgrund seines Geschmacks und seiner Exklusivität wieder als Edelgemüse gehandelt. Zudem entwickelte sich ein größeres Bewusstsein für gesunde Ernährung in dieser Zeit, weshalb die Popularität des Spargels aufgrund seines geringen Nährwertes wuchs. Ein Diagramm zur Aufschlüsselung der einzelnen Nährstoffe sei in Abbildung 4 dargestellt. Neben den Hauptbestandteilen des Spargels ist er reich an Saponinen und der Aminosäure Asparagin, die ihren Namen dem Spargel verdankt, vielen Vitaminen, Mineralstoffen und Spurenelementen, wie Calcium, Kalium, Magnesium, Phosphor und Eisen. (Löbell, G., Löbell, E., 2000)

Nicht nur aufgrund seiner Beliebtheit und saisonal begrenzten Verfügbarkeit hebt sich der Spargel preislich von den meisten anderen Gemüsearten ab; auch die intensive Pflege der Anlagen, die aufwändigen Erntemaßnahmen des Gemüses sowie die Einführung des Mindestlohns lassen heute den pro-Kilo-Preis stetig ansteigen. Je nach Handelsklasse, Schnittlänge, Anbauregion und -bedingungen kann der Preis pro Kilogramm stark variieren und insbesondere zu Beginn der Saison und / oder in den Regionen, welche geschützte Herkunftsbezeichnungen tragen, stark ansteigen.

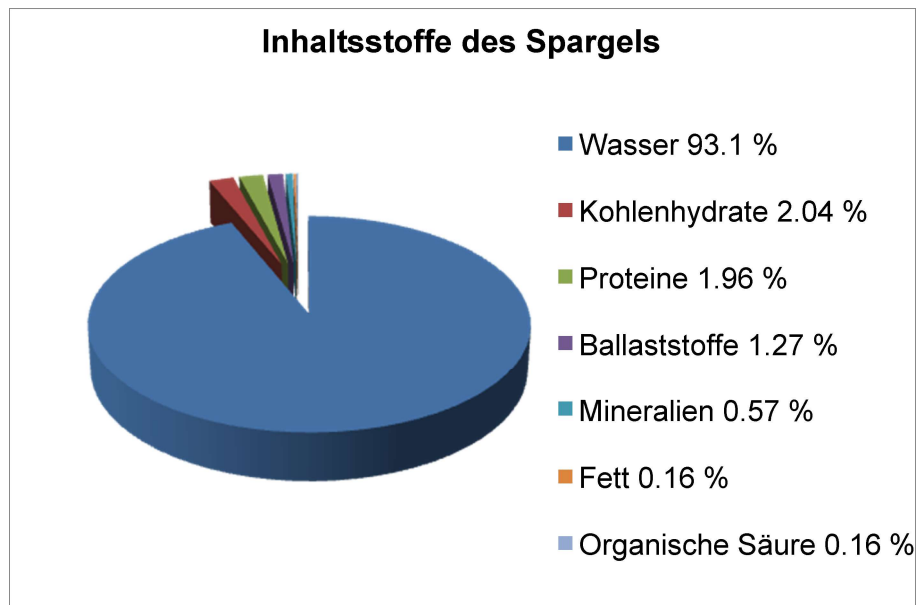


Abbildung 4: Die Inhaltsstoffe des Spargels (Souci et al., 2008)

3.1.3 Die Wertschöpfungskette

Bevor eine Spargelanlage bepflanzt werden kann, bedarf es einer zwei- bis vierjährigen Bodenvorbereitungszeit. Der Boden muss ausreichend gedüngt werden, sodass genügend Nährstoffe für die bis zu 12 Jahre genutzte Pflanze zur Verfügung stehen. Damit sich das Rhizom stabil im Boden ausbreiten kann, sollte der Boden frei von Steinen und wasserundurchlässigen Schichten sein. Die Pflanze bevorzugt warme Gegenden mit möglichst sandigem und humosem Boden. Für eine optimale Einwirkung der Sonnenwärme auf die Dämme sind offene, sonnige Südhänge von Vorteil. Das tiefliegende Wurzelwerk beginnt bei etwa 12 °C zu treiben und die Triebe der Wurzeln wachsen in die Höhe. Bei einer Bodentemperatur von 16 °C kann die Spargelernte beginnen. (Löbell, G., Löbell, E., 2000)

Nach der Vorbereitungszeit werden die einjährigen Setzlinge im Frühjahr gepflanzt. Die Dammanstände betragen (150-180) cm, die Dammbreite (35-40) cm, die Grabentiefe ca. 30 cm und die Pflanzdichte (30-35) cm. Der Pflanze wird sodann zwei Jahre zur Kräftigung des Rhizoms unter der Erdoberfläche gewährt. In dieser Zeit benötigt das Feld eine intensive Pflege und einen guten Pflanzenschutz. Nach weiteren zwei Jahren blüht der Spargel das erste Mal. Im April des dritten Jahres werden Erdwälle (auch Bifänge oder Dämme) mit Pflügen aufgehäuft, sodass die Stangen einen weiteren Weg bis zur erhöhten Erdoberfläche zurücklegen müssen, somit an Länge gewinnen und leicht geerntet werden können. Weiterhin wird somit dem Ergrünen der weißen Stangen durch UV-Strahlung vorgebeugt. Die Dämme werden glattgestrichen, um jede kleine Erhebung als Indiz einer hervorstrebenden Stange erkennen und diese ernten zu können, bevor sie die Erdoberfläche durchbricht. Ab dem vierten

3 Theoretischer Teil

Jahr kann für acht bis zehn Jahre der volle Ertrag erzielt werden. Danach erweist sich die Anlage zumeist aus wirtschaftlicher Sicht als nicht mehr ausreichend ertragreich. Die Pflanzen könnten mehrere Jahrzehnte alt werden, was in der Praxis eher unüblich ist. Nach etwa 10 Jahren werden die Pflanzen zur Regeneration des Bodens und Vorbereitung auf eine neue Bepflanzung entfernt. (Löbell, G., Löbell, E., 2000)

Je nach Witterung in den Anbauregionen beginnt die Spargelernte in Deutschland Mitte April bis Anfang Mai. Dabei sind aufgrund des Klimas die süddeutschen Spargelanlagen im Schnitt ca. zwei Wochen früher erntebereit als norddeutsche Felder. Der Einsatz von schwarz-weißen Taschenfolien, deren schwarze Seite die Wärme im Damm hält und somit die Keimung des Rhizoms vorantreibt, bewirkt einen verfrühten Erntebeginn. In diesem Fall muss die Ernte entsprechend früher beendet werden. (Löbell, G., Löbell, E., 2000)

In der Saison wird bis zu zwei Mal täglich geerntet. Hierzu werden die Sprosse mit Hilfe eines Stechmessers in ca. 25 cm Tiefe „abgestochen“ und die entstandenen Löcher mit einer sogenannten Glättkelle wieder geschlossen. Der frisch gestochene Spargel wird in die Betriebe transportiert, wo er einer Schockkühlung und einem Waschprozess unterzogen wird. Die Enden werden gleichmäßig abgeschnitten und letztlich wird der Spargel mit Hilfe einer Sortiermaschine nach Größe in unterschiedliche Klassen aufgeteilt. (Löbell, G., Löbell, E., 2000)

Dieser Schritt stellt einen Teil der Handelsklasseneinteilung dar, welche neben dem Durchmesser und der Länge noch weitere Kriterien, wie die Köpfchenbeschaffenheit, Beschädigungen, Form und Farbe berücksichtigt. Hierzu findet eine strenge Qualitätskontrolle nach EU-Richtlinien statt, welche den Spargel in drei Klassen „Klasse Extra“, „Klasse I“ und „Klasse II“ einteilt. (Löbell, G., Löbell, E., 2000)

Nun wird der Spargel in Bunde, Flachsteigen oder Spankörben abgepackt und entweder vor Ort direkt an die Verbraucher/innen oder nach dem Transport an Großabnehmer verkauft. (Löbell, G., Löbell, E., 2000)

Die Ernte endet in ganz Deutschland spätestens am 24. Juni, dem Johannistag. Die Pflanze kann ab diesem Zeitpunkt durch den Erddamm hindurchwachsen und ihre Sprossachse, Zweige und Fiederblättchen ausbilden (Abbildung 5); sie kann nun entsprechend der landwirtschaftlichen Redewendung „ins Kraut schießen“. Die Sprosse erreichen eine Höhe von ca. 1.50 m (Abbildung 6). Die Pflanze betreibt in dieser Zeit Assimilation und bevor die oberirdischen Kompartimente im Herbst absterben, können auf diesem Wege ausreichend Reservestoffe im Rhizom gespeichert werden. Der Wurzelstock ist somit überwinterrungsfähig und aufgrund seiner Tiefe im Boden bis zum nächsten Frühjahr kälteresistent. (Löbell, G., Löbell, E., 2000)

3 Theoretischer Teil

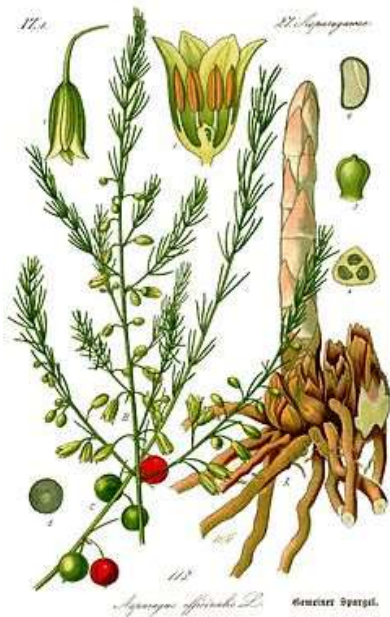


Abbildung 5: Rhizom, Blätter, Blüten und Früchte des weißen Spargels (Masclef, 1987)
Abbildung 6: Eine durchgewachsene Spargelpflanze (Quartier Christ, 2011)

3.1.4 Marktsituation und Anbauggebiete

In Deutschland ist im Vergleich zu anderen Ländern der Weißspargel gegenüber dem Grünspargel seit jeher marktdominierend. Aufgrund der immer noch notwendigen Handarbeit ist weißer Spargel weitaus kostspieliger. Grünspargel hingegen ist aufgrund des einfacheren Anbaus ohne Dämme und der weniger sensiblen Ernte günstiger in der Produktion. In vielen Ländern der Welt wird der Grünspargel deshalb, aber auch wegen seines intensiveren Geschmacks favorisiert. (Löbell, G., Löbell, E., 2000)

Die Gesamtspargelanbaufläche in Deutschland betrug 2018 23.408 Hektar und erbrachte 133.020 t Ertrag; die Tendenz für die Anbaufläche sowie auch die Jahresproduktion ist dabei steigend (Statista, 2020a; Statista, 2020c). Die größten Anbauggebiete bilden Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Brandenburg und Bayern, welche zusammen mehr als die Hälfte des deutschen Spargels produzieren (Statista, 2020d; LFL Bayern, 2016).

Deutschland deckt mit seiner eigenen Produktion je nach Erntejahr nur 50 % - 80 % des Eigenbedarfs ab und ist daher auf Importspargel aus dem Ausland angewiesen (Löbell, G., Löbell, E., 2000; Statista, 2020b; Statista, 2020d). Gemäßigte Klimazonen, wie Spanien und Griechenland, können schon vor Beginn der deutschen Saison Spargel ernten und gehören daher zu den größten Importeuren für den deutschen Markt. Aber auch die Niederlande exportieren ca. 40 % der Eigenproduktion ins Ausland. Peru baut weißen Spargel nahezu

3 Theoretischer Teil

vollständig für den Export an. Die häufigsten Spargelimporte nach Deutschland haben ihren Höhepunkt während des Frühjahrs (März-Juni) aus Spanien, Griechenland, den Niederlanden und Frankreich. Im Spätherbst bis Winter wird hauptsächlich aus dem zweitgrößten Weltproduktionsland Peru (Erntemenge 360,630 t / Jahr) importiert (Statista, 2020b). Vom Haupterzeuger China (Erntemenge 7,982,230 Mio. t / Jahr) werden hingegen vorrangig verarbeitete Produkte bezogen, d. h. meist bereits geschälte und tiefgefrorene Waren (Statista, 2020b). Aber auch deutscher Spargel wird zu einem geringen Anteil exportiert; im Jahr 2018 wurden ca. 4 t deutscher Spargel exportiert (Statista, 2020e). (Löbell, G., Löbell, E., 2000).

3.1.5 Sorten

In den Spargelbetrieben werden zum Anbau zumeist die männlichen Pflanzen der jeweiligen Sorte verwendet, da diese ertragreicher und robuster sind. Die weiblichen Pflanzen werden hingegen fast ausschließlich für die Sortenzucht verwendet.

Einige Sorten werden sowohl als Bleichspargel, als auch als Grünsparigel angebaut. In der folgenden Tabelle 2 sind einige Sorten, welche vorrangig für den Anbau von Weißspargel verwendet werden, mit ihren jeweiligen Eigenschaften zum Zeitpunkt der Ernte aufgeführt.

Tabelle 2: Sorten für den Anbau von Weißspargel (Strobl, 2015)

Sorte	Erntezeitpunkt	Eigenschaften zum Zeitpunkt der Ernte	Ertrag, Besonderheiten
<i>Avalim</i>	früh	mittelschwere Stangen	hoher Ertrag
<i>Backlim</i>	spät	schwere Stangen	hoher Ertrag
<i>Cumulus</i>	früh	mittelschwere Stangen	hoher Ertrag
<i>Gijnlim</i>	früh	mittelschwere Stangen	hoher Ertrag, früh einziehend
<i>Grolim</i>	sehr früh	sehr schwere Stangen	sehr hoher Ertrag, wenig anfällig gegen Blattpilzkrankungen
<i>Mondeo</i>	früh bis mittelfrüh	mittlere bis schwere Stangen	hoher Ertrag, weniger anfällig gegen Blattpilzkrankungen
<i>Ramada</i>	sehr früh	Kräftige, gleichmäßige Stangen	hoher Ertrag, weniger anfällig gegen Blattpilzkrankungen
<i>Rapsody</i>	mittelspät	Sehr gerade, gleichmäßige, weiße, kräftige Stangen	sehr hoher Ertrag

3 Theoretischer Teil

<i>Ravel</i>	früh	gut geschlossene Köpfe, mittleres Stangengewicht, glatte, gleichmäßige Stangen	hoher Ertrag
--------------	------	--	--------------

3.2 Metabolomics

Im Folgenden soll das theoretische Wissen über den Bereich *Metabolomics* sowie dessen Einordnung in die *Omics*-Kaskade vermittelt werden. Weiterhin wird auf die Entwicklungsgeschichte des Forschungsfeldes Bezug genommen.

3.2.1 Die *Omics*-Kaskade und der Begriff „*Metabolomics*“

Um das Zusammenspiel der verschiedenen exogenen Einflüsse mit der jeweiligen *Omics*-Disziplin erfassen zu können, werden die einzelnen Teilbereiche detaillierter beleuchtet.

3.2.1.1 Die *Omics*-Kaskade

Jedes Lebewesen ist durch seine genetischen Voraussetzungen, den daraus resultierenden Zellprozessen sowie durch exogen beeinflussende Umweltfaktoren geprägt. Die sogenannte *Omics*-Kaskade umfasst die einzelnen Teildisziplinen, welche die Erforschung aller Stufen des Genotyps bis hin zum Phänotypen eines Organismus beinhaltet. Diese Stufen sind durch ihre Umwelt jeweils in unterschiedlichem Maße veränderlich. Veranschaulicht werden soll dies in Abbildung 7.

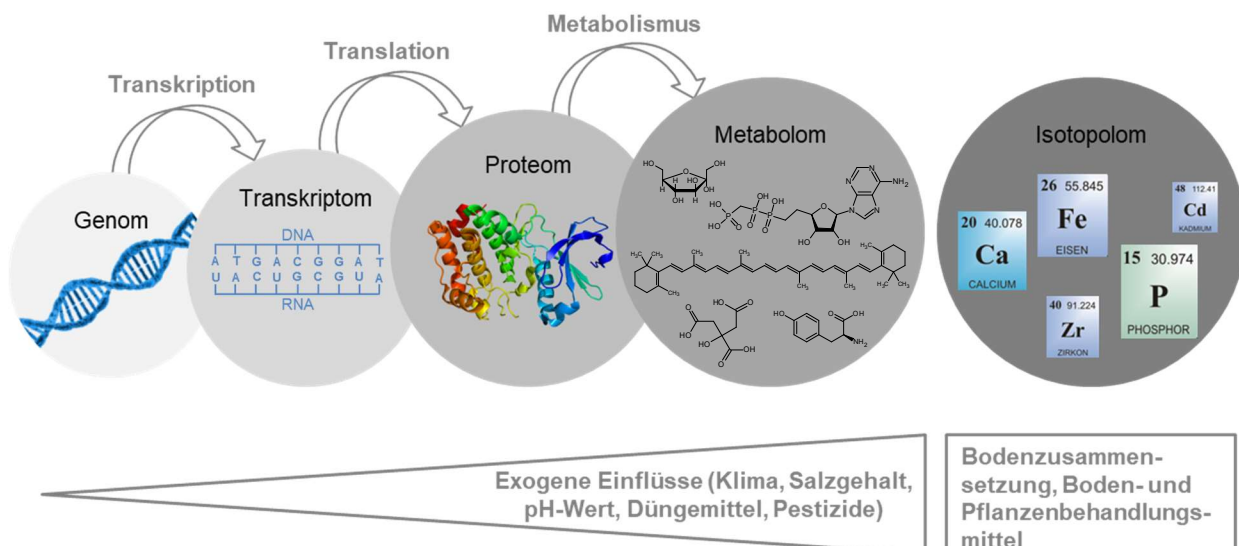


Abbildung 7: Die *Omics*-Kaskade und die Beeinflussbarkeit der einzelnen *Omics*-Disziplinen (Protein: Dambrot, 2014; Strukturen: ChemSketch, 2020; Elemente: CHEMISTRY GLOSSARY, 2020)

3 Theoretischer Teil

Das Genom

Das Erbgut eines jeden Organismus stellt den beständigsten Bereich der Kaskade dar. Das sogenannte Genom, die Gesamtheit aller Geninformationen (Richard, Louise, 2011), ist nur über sehr lange Zeitabstände hinweg aufgrund von Mutation und Evolution veränderbar. Die Untersuchung dieser *Omics*-Teildisziplin wird als *Genomics* bezeichnet. (Felbinger *et al.*, 2015)

Hierzu gehören auch die Teilbereiche *Functional Genomics* und *Structural Genomics*. Sie beschäftigen sich mit der Untersuchung der Funktion einzelner Gensequenzen, RNAs und Proteinen, bzw. mit der Genom-basierten 3D-Modellierung von Proteinen (Baker, Sali, 2001). Der Teilbereich *Epigenomics* beschreibt die Erforschung reversibler Modifikationen der DNA und der Genexpression, welche zu Veränderungen der Genfunktionen führen, jedoch nicht auf Rekombination oder Mutation zurückzuführen sind und dabei die Genomstabilität maßgeblich beeinflussen. Als die wohl wichtigsten epigenetischen Mechanismen sind die DNA-Methylierung, die Histon-Modifikation sowie der Abbau von Telomeren zu nennen. (Jones, Baylin, 2007)

Das Transkriptom

Einen Teilschritt der Genexpression stellt die Transkription, die Vervielfältigung von Genabschnitten, dar. Hierbei werden RNA-Sequenzen von der jeweiligen DNA erstellt. Die Gesamtheit aller Ribonucleinsäuren in einem Organismus beschreibt das Transkriptom; die Erforschung des Transkriptoms heißt entsprechend *Transcriptomics*. (Richard, Louise, 2011) Das Transkriptom besteht jedoch nicht nur aus den proteinkodierenden mRNAs, sondern auch und sogar hauptsächlich aus den nicht-kodierenden rRNAs, tRNAs, miRNAs, siRNAs, lncRNAs und vielen weiteren Transkriptionsprodukten. Die Funktionen der nicht-kodierenden RNA in einer Zelle sind dabei vielseitig und evolutionär betrachtet von enormer Relevanz. (Mattick, Makunin, 2006)

Weiterhin gehören auch jene mRNA-Sequenzen zum Transkriptom, welche nicht aus einer vollständigen mRNA bestehen, sondern durch alternatives Spleißen hervorgebracht werden. Somit ist die Proteinvierfalt bezogen auf die relativ geringe Menge an Genen in eukaryotischen Zellen enorm vergrößert und spielt hinsichtlich der Anpassung eines Organismus an seine äußere Umgebung eine wichtige Rolle. (Filichkin *et al.*, 2015; Graveley, 2001)

Aufgrund der Tatsache, dass der Bereich *Functional Genomics* sich nicht ausschließlich mit der Untersuchung der Funktionen von Genen, sondern auch mit jenen auf der Translations-, Transkriptions- und Protein-Ebene befasst, überschneiden sich die Forschungsgebiete *Genomics*, *Transkriptomics* und *Proteomics* an dieser Stelle (Baker, Sali, 2001).

3 Theoretischer Teil

Das Proteom

Bei der Translation werden anhand der RNA-Sequenzen in den Ribosomen der Zelle Aminosäuren zu Proteinen zusammengefügt. Sie stellen, aufgrund der Übersetzung eines Genabschnitts, die nächstkonstantere Ebene dar, solange keine stark abweichenden Einflüsse, wie die Temperatur, das Ionenverhältnis, der pH-Wert oder eingetragene zellaktive Stoffe (Kontaminanten, Rückstände von Pestiziden, Düngemittel, usw.) vorherrschen. Die Gesamtheit aller Proteine und Enzyme eines Organismus wird analog als das Proteom, die Analyse desselbigen als *Proteomics* bezeichnet. (Richard, Louise, 2011)

Neben den oben bereits genannten Proteinen, welche aufgrund von alternativem Spleißen entstehen, gehören auch jene Proteine zum Proteom, welche nach der Translation am Ribosom durch posttranslationale Modifikation gebildet werden. Modifizierungsgene werden gebildet und kodieren Proteine, um sich an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Aber auch ungewollte Modifikationen können durch die Anwesenheit von Streptomycin, den Mangel bestimmter Aminosäuren oder durch energiereiche Strahlung und daraus resultierenden Radikalen hervorgerufen werden. Die Proteine können bei der posttranslationalen Modifikation denaturiert, umgeformt oder an den N- oder C-terminalen Enden chemisch modifiziert werden. (Green, Gameau-Tsodikova, 2010)

Das Metabolom

Proteine steuern den Metabolismus einer Zelle, d. h. sie sorgen für den Aufbau, Abbau oder die Umsetzung von Stoffen, welche einer bestimmten Zellfunktion dienen, aufgenommen wurden oder wieder ausgeschieden werden sollen. Diese Stoffe werden als Metabolite (Stoffwechselprodukte) bezeichnet. Die Gesamtheit aller Metabolite innerhalb eines Organismus wird als Metabolom, die Untersuchung des Metaboloms als *Metabolomics* bezeichnet (Richard, Louise, 2011).

Im Gegensatz zum Proteom, Transkriptom und Genom ist das Metabolom in seiner Zusammensetzung sehr stark abhängig von äußeren Einflüssen. So produzieren Pflanzen bei starker Sonneneinstrahlung mehr Zucker oder bilden intensivere Farben durch die Synthese polyphenolischer Verbindungen; bei geringerer Sonneneinstrahlung werden mehr organische Säuren produziert und die Farbgebung ist weniger intensiv (Haller *et al.*, 2013). Zu den primären und sekundären Inhaltsstoffen eines pflanzlichen Organismus gehören jedoch weit mehr als die geschmacklich und visuell wahrnehmbaren Metabolite. Über 50,000 Metabolite konnten bislang in pflanzlichen Zellen aufgeklärt werden; die Schätzungen über die Anzahl tatsächlich existierender Metabolite im Pflanzenreich belaufen sich auf über 200,000 (Hall *et al.*, 2002).

3 Theoretischer Teil

Das Isotopolom

Einen weiteren Bereich, welcher ebenfalls von einigen exogenen Faktoren beeinflussbar ist, bildet das Isotopolom (Fischer, 2015; Weindl, 2015). Es ist durch diejenigen äußeren Bedingungen beeinflussbar, welche zu einem Eintrag, Austausch oder Herauslösen von Elementen aus einer Zelle führen. Solche Faktoren können die Bodenzusammensetzung oder der Einsatz von Dünge- und Pflanzenschutzmitteln sein. Die Gesamtheit aller Elemente eines Organismus wird als Isotopolom, dessen Analyse entsprechend als *Isotopolomics* bezeichnet (Richard, Louise, 2011).

Kontext zum Projekt – *Metabolomics* und *Foodomics*

Das Genom ist, wie oben beschrieben, nur über sehr lange Zeiträume durch exogene Faktoren beeinflussbar und bietet bei gleichbleibender Sorte kaum charakteristische Merkmale, welche zur Authentizitätskontrolle bezüglich der geographischen Herkunft beitragen würden. Da im Spargelanbau weltweit sehr viele unterschiedliche Sorten kultiviert werden, welche nicht zwangsläufig länderspezifisch angepflanzt werden, stellt die Herangehensweise mittels *Genomics* keine sehr erfolgsversprechende Methode dar.

Im Gegensatz dazu stellt die Untersuchung des weitaus beeinflussbareren Metaboloms eine durchaus aussichtsreichere Methode zur Herkunftsbestimmung von Pflanzen allgemein dar (siehe Punkt 3.2.2.4). Ursprünglich aus der *Metabolomics*-Forschung erwachsen, welche sich hauptsächlich mit der Charakterisierung botanischer Arten und Sorten befasste, wurde der neue Forschungszweig „*Foodomics*“ definiert, in dessen Rahmen sich auch diese Arbeit bewegt. Die *Foodomics*-Forschung beinhaltet die Untersuchung verschiedener Lebensmittel und ernährungsphysiologischer Fragestellungen anhand der *Omics*-Technologien. (Tomassini *et al.*, 2013; Wishart, 2008; Herrero *et al.*, 2011; Cifuentes, 2009)

Die gebräuchlichere Begrifflichkeit für das vorliegende Forschungsthema bleibt jedoch „*Metabolomics*“, weshalb dieser Begriff im Folgenden genauer definiert und – mit Hinblick auf diese Arbeit – in einen Zusammenhang mit der historischen Entwicklung des Forschungsfeldes gesetzt werden soll.

3.2.1.2 Begriffe

„*Metabolomics*“

Während Oliver *et al.*, 1998 den Begriff des „Metaboloms“ erstmals benutzten, sind heute in der Literatur verschiedenste Definitionen der Begriffe „Metabolom“ und „*Metabolomics*“ vorzufinden. Einige Definitionen des Begriffs „*Metabolomics*“ seien im Folgenden zitiert:

3 Theoretischer Teil

„Metabolomics is a non-biased identification and quantification of all metabolites in a biological system. This approach has emerged as an important tool in many different fields such as plant physiology, human disease and nutrition, drug discovery and also in food science. [...] The term “metabolome” introduced by Oliver et al. [...] refers to the quantitative complement of all of the low molecular weight molecules present in cells in a particular physiological or developmental state. The metabolome is made up of many thousands of metabolites which are the final result of the gene expression.” (Mannina et al., 2012)

„Metabolomics refers to comprehensive and non-selective analytical chemistry approaches aiming to provide a global description of small molecules called metabolites present in a biofluid at a given time.” (Tomita et al., 2015)

„Metabolomics is defined as the systematic identification and quantitation of multi-parametric response under pathophysiological stimuli or genetic modifications [...]. Metabolomics is one of the fast growing fields in the era of “omics” which deals with profiling of metabolites in the cells, bio-fluids, tissues, organs, etc. using various analytical methods. Metabolites are the biochemical components involved in metabolism, that either act as intermediates, precursors, changing or are incorporated into biochemical reactions along metabolic pathways.” (Bharti, Roy, 2014)

Wie aus den drei Ausschnitten hervorgeht, sind sich die Autoren bei der Definition des Begriffs „Metabolomics“ hinsichtlich der unspezifischen Erfassung kleiner Moleküle aus einer biologischen Matrix einig. Darüber hinaus wird die Identifizierung und Quantifizierung mittels verschiedener Analysemethoden sowie der daraus resultierenden Generierung eines einzigartigen Profils gleichermaßen als Definitionskriterium anerkannt.

Unbestimmt ist noch die genaue Masse, die solch ein „kleines Molekül“ besitzen darf oder ob die Gesamtheit aller Stoffwechselprodukte gemeint ist. Robert D. Hall *et al.* definierten beispielsweise das Metabolom als die Gesamtheit aller Verbindungen, die eine Größe von 1,500 Da nicht überschreiten (Hall, 2006).

Der Unterschied zwischen „Metabolomics“ und „Metabonomics“

Als missverständlich stellt sich oft die nahezu konvergente Nutzung der Begriffe „Metabolomics“ und „Metabonomics“ heraus. Beide Termini werden laut Literatur ähnlich definiert.

Feine Unterschiede kristallisierten Lindon *et al.* heraus: Die Technik „Metabonomics“ beinhaltet demnach die umfassende und gleichzeitig systematische Charakterisierung

3 Theoretischer Teil

mehrerer Metaboliten sowie deren zeitgleiche Veränderungen, die durch externe Einflussfaktoren hervorgerufen werden. Hierbei werden hauptsächlich Biofluide und Gewebe untersucht. Eine sehr ähnliche Bedeutung verbirgt sich hinter dem Begriff „*Metabolomics*“, wobei das Untersuchungsmaterial hauptsächlich aus pflanzlichen, aus *in vitro* oder mikrobiologischen Systemen stammt. (Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Homes, E., 2007)

McKay *et al.* betonen zur Unterscheidung der beiden Begrifflichkeiten, inwieweit das Metabolom und anhand welcher Analytik es untersucht wird: So wird mittels „*Metabonomics*“ die vollständige Metabolitbandbreite eines Organismus‘ aufgeklärt, während „*Metabolomics*“ die systematische Studie des metabolischen Fingerabdrucks, welcher durch spezifische biologische Prozesse hervorgerufen wurde, beschreibt. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal wird nach McKay *et al.* insbesondere in älteren Publikationen deutlich, da oftmals hinsichtlich der angewandten Analysetechniken unterschieden wird. Während in der NMR-Forschung zumeist von „*Metabonomics*“ gesprochen wird, verwenden die Forschungsbereiche der Chromatographie und Massenspektrometrie hauptsächlich den Begriff „*Metabolomics*“. (McKay, 2011)

In dieser Doktorarbeit wird entsprechend aktueller Tendenzen in der Literatur und zum Zwecke der Vereinfachung die Bezeichnung „*Metabolomics*“ genutzt.

3.2.2 Geschichte und Forschungsstand

In diesem Unterkapitel soll die Entwicklung und Etablierung des Forschungsfeldes *Metabolomics* dargestellt und dessen wichtigste Meilensteine sowie die Handhabung von *Metabolomics*-Daten in der Gegenwart erläutert werden. Weiterhin werden die Vorteile der Korrelation der beiden Messmethoden NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie sowie der Einsatz *Metabolomics*-basierter Technologien in der Forschung herausgestellt.

3.2.2.1 Geschichte und wissenschaftliche Meilensteine

Bereits im alten China vor ca. 3000 Jahren wurden Ameisen zum Nachweis von Diabetes Typ II aufgrund eines hohen Glucosespiegels im Urin verwendet. Eine ähnliche Herangehensweise pflegten die Hindus und Ägypter, indem sie ihre eigenen sensorischen Fähigkeiten oder aber Fliegen als Indiz hoher Zuckergehalte im Urin nutzten. (Gowda, Djukovic, 2015; Van Der Greef, Smilde, 2005; Benzie, Wachtel-Galor, 2011). In den 1940er Jahren entdeckte Roger Williams, dass sowohl pflanzliche als auch tierische Individuen ein metabolisches Muster besitzen, welches anhand seiner biologischen Flüssigkeiten bestimmbar ist. Er führte Studien verschiedenartig erkrankter Personengruppen durch, wie

3 Theoretischer Teil

beispielsweise von Alkoholikern, Schizophrenen und Geistesgestörten. (Gates, Sweeley, 1978)

Die technische Weiterentwicklung insbesondere chromatographischer Analysegeräte nahm ihren Lauf. Mit der stetigen Verbesserung der Trennleistung während der 1960er Jahre wurde auch die Quantifizierung interessanter Metabolite analytisch präziser. Während der 70er und 80er Jahre konnten insbesondere GC-MS-basierte Analysetechniken zur Metabolomuntersuchung von biologischen Flüssigkeiten weiterentwickelt werden. Im Jahr 1971 gelang es Horning *et al.*, ein metabolisches Profil mittels GC-MS-Analyse von menschlichem Urin und Gewebe darzustellen (Horning, Horning, 1971; Griffiths, Wang, 2009).

Auch in der NMR-Analytik war die Erforschung biologischer Matrices längst keine Neuheit mehr. 1974 gelang es Hoult *et al.* erstmals, mit Hilfe der ^{31}P -NMR-Analyse nachzuweisen, dass 90 % des zellulären ATP im unmodifizierten Muskelgewebe mit Magnesium komplexiert sind (Hoult *et al.*, 1974). Mit der Entwicklung höherer magnetischer Feldstärken wurde auch die Empfindlichkeit verbessert und 1984 gelang es letztlich Nicholson *et al.*, anhand des metabolischen Profils von menschlichen Blutseren, Plasma und Urin und mit Hilfe von NMR-Spektroskopie Diabetes mellitus zu diagnostizieren (Nicholson *et al.*, 1984). Die Einführung von 1D-, 2D-, 3D- und Festkörper-Experimenten kräftigte die Vorteile der NMR, wodurch die Messtechnik eine Schlüsselrolle in der Profilbeschreibung biologischer, insbesondere menschlicher Fluide und Gewebe erlangte (Kruk *et al.*, 2017). Um die Jahrtausendwende wurde der noch junge Forschungsbereich durch Oliver *et al.* als „*Metabolomics*“ definiert, welcher in der NMR-spektroskopischen Analytik schnell von großem Interesse wurde (Oliver *et al.*, 1998; Nicholson *et al.*, 2008; Fiehn, 2001).

Die steten Arbeiten zur Methodenentwicklung zeigen ein starkes Bestreben an der optimierten Hochdurchsatztauglichkeit von *Metabolomics*-Anwendungen. So konnten Sauer *et al.* 2015 erstmals ein Echtzeit-Metabolom mittels TOF-MS erfassen (Link *et al.*, 2015). 2017 gelang Nemkov *et al.* eine schnelle und hochauflösende Metabolombeschreibung wichtiger Kohlenstoff- und Stickstoff-Stoffwechselwege mittels UHPLC (Nemkov *et al.*, 2017).

Neben der sogenannten *non-targeted* (ungerichteten) und *targeted* (zielgerichteten) *Metabolomics*-Anwendung, findet zur Nachvollziehbarkeit metabolischer Wege vor allem auch die Isotopenmarkierung *in vivo* häufige Anwendung. Larive *et al.* zeigten 2015 die Vorteile des Verfahrens *ex vivo* auf; auf diesem Wege können die verschiedensten *Metabolomics*-Fragestellungen untersucht werden (Larive *et al.*, 2015). Ein NMR-aktives Isotop wird hierbei in eine Zielstruktur mit bestimmter funktioneller Gruppe eingebracht und diese wird selektiv derivatisiert; sowohl die Empfindlichkeit, als auch die Selektivität der NMR-Analyse werden erhöht und die spektralen Störkomponenten verringert (Shanaiah *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2009). Eine beispielhafte Anwendung ist Tayyari *et al.* gelungen: Das primäre Amin des Cholamins

3 Theoretischer Teil

wurde mit ^{15}N markiert, sodass anschließend eine selektive Derivatisierung der Carboxylgruppen durchgeführt werden konnte (Tayyari *et al.*, 2013).

Aber auch die *Metabolic Flux Analysis* (MFA) ist ein gängiges und stark wachsendes Verfahren in der Erforschung biologischer Systeme, was sich in verschiedensten Veröffentlichungen wiederfindet (Larive *et al.*, 2015; Sims *et al.*, 2013; Fernie, Morgan, 2013). Die Verwendung markierter Reagenzien ermöglicht die Nachverfolgung einzelner Metabolismuswege unter verschiedenen Bedingungen und in unterschiedlichen Gewebearten. Das wohl bedeutendste Forschungsziel dieser Anwendung dürfte in der Krebsforschung liegen. (Cheng *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013; Larive *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014)

3.2.2.2 Datenaustausch

Um weltweit einen Nutzen aus bereits durchgeführten *Metabolomics*-Forschungen ziehen zu können, bedarf es allgemein zugänglicher Datenbanken. Die Einführung solcher Datenbanken zur systematischen Sammlung bereits bekannter Metabolite rückt daher mehr und mehr in den Fokus. Im Jahr 2005 wurde die erste *Metabolomics* Webdatenbank (METLIN) erstellt, welche innerhalb der letzten Jahre stark anwuchs und mehr als 1,000,000 Metabolite und MS-Daten beinhaltet (METLIN, 2020). Insgesamt existieren heute (Stand: September 2020) mehr als 35 *Metabolomics* Datenbanken (Metabolomics Society, 2014). Das Human Metabolome Project (HMP) wurde 2005 mit dem Zweck der Katalogisierung aller bekannten humanen Metabolite unter Prof. Dr. David Wishart eingeführt (Wishart *et al.*, 2007). Im Jahr 2007 wurde im Rahmen des HMP ein erster Abriss eines menschlichen Metaboloms, welches etwa 2,500 Metabolite, 1,200 Arzneimittel und 3,500 Lebensmittelverbindungen aufwies, vorgestellt (Wishart *et al.*, 2007). Die Bereitstellung der HMP-Daten auf der Human Metabolome Data Base (HMDB) brachte einen Aufschwung verwandter *Metabolomics*-Projekte zu unterschiedlichen Pflanzenarten mit sich (HMDB, 2020; Wishart *et al.*, 2007; Wishart *et al.*, 2013; Wishart *et al.*, 2009). Aktuell (Stand September, 2020) listet die HMDB etwa 114,215 Metabolite, wovon bislang 21,828 Metabolite und weitere 18,192 metabolische Reaktionen identifiziert worden sind (Wishart *et al.*, 2018; Markley *et al.*, 2017; HMDB, 2020).

Weitere Datenbanken, welche kleine Moleküle aus biologischen Matrices listen, sind die BMRB, TOCCATA und COLMAR (BMRB, 2020; Bingol *et al.*, 2014; Bingol *et al.*, 2015; Markley *et al.*, 2017). Im *NIH Common Fund Center* werden Ergebnisse aus der *Metabolomics*-Forschung gesammelt und die COSMOS-Initiative (*Coordination of Standards in Metabolomics*) verwaltet den Datenaustausch von *Metabolomics*-Standards (Sud *et al.*, 2016; Salek *et al.*, 2015). Auf der Website <http://metabolomexchange.org> können Methoden und Standards eingesehen werden, die für populäre metabolische Phenotypisierungen

3 Theoretischer Teil

biologischer Flüssigkeiten eingesetzt wurden (Emwas *et al.*, 2016; Dona *et al.*, 2014). Standardarbeitsprotokolle für die verschiedensten *Metabolomics*-Anwendungen können auch bei der „*Standard Metabolic Reporting Structures (SMRS) Group*“ eingereicht werden, um experimentell erfolgreiche Ergebnisse zu veröffentlichen (Ioannidis *et al.*, 2016; Mannina *et al.*, 2012; SMRS, 2004). Eine ähnliche Plattform, ausgelegt insbesondere auf NMR-Daten, bietet das MVAPACK (Worley, Powers, 2014). Auf diese Weise soll die Reproduzierbarkeit gemessener Daten verglichen, überprüft und verbessert werden (Markley *et al.*, 2017).

Im Gegensatz zum medizinischen Bereich sind derartige Datenbanken im Lebensmittelbereich aufgrund der größeren Diversität des Metaboloms noch weniger etabliert (Mannina *et al.*, 2012). Ein Problem stellt auch die geringe Anzahl kombinierter Datenführungen von NMR- und MS-Daten dar, welche häufiger im medizinischen Bereich anzutreffen sind. Diese Herangehensweise ist hinsichtlich des immer stärker werdenden Interesses der kombinierten Anwendung der Analysemethoden von wachsender Bedeutung (Marshall, Powers, 2017). Darüber hinaus werden statistische Auswerteprogramme zur Korrelation von NMR- und MS-Daten benötigt, welche bislang nicht standardisiert werden konnten (Marshall *et al.*, 2015).

3.2.2.3 Vorteile der Korrelation von NMR- und MS-Daten

Der technische Fortschritt in der NMR-Analytik in den letzten Jahrzehnten führte zu einer Erhöhung der Anwendungsrate der Messtechnik im *Metabolomics*-Bereich (Marshall, Powers, 2017; Markley *et al.*, 2017). Automatisierte Datenprozessierungsinstrumente, Signalzuordnungsprogramme und die Durchführung von statistischen Datenanalysen gehören bereits zu Standardanwendungen. Dies zeigt eindeutig, dass die umfassende und präzise Aussagekraft sowie die Verlässlichkeit von NMR-basierten *Metabolomics*-Anwendungen stets zunehmen (Larive *et al.*, 2015; Esslinger *et al.*, 2014). Mit dem Einsatz ultra-hoher Feldstärken von 1,200 MHz, der Entwicklung schnellerer und multidimensionaler NMR-Experimente, bzw. gänzlich neuer Pulssequenzen sowie der Weiterentwicklung von Kryoprobeköpfen wird die Qualität, d. h. die Empfindlichkeit und die Auflösung der Spektren, signifikant verbessert. (Larive *et al.*, 2015; Barding *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2010; Markley *et al.*, 2017)

Obwohl die NMR-Analytik sowie die Massenspektrometrie routinemäßig und komplementär einsetzbar sind, wurden sie hinsichtlich der *Metabolomics*-Forschung lange Zeit getrennt angewandt (Marshall, Powers, 2017). Sie liefern jeweils eine Vielzahl an hilfreichen Informationen, wie z. B. die chemische Verschiebung, Kopplungskonstanten, Kopplungssignale über mehrere Bindungen hinweg, die molekulare Masse, Fragmentmassen und eine hypothetische Summenformel (Larive *et al.*, 2015; Fan, Lane, 2016; Gowda, Raftery, 2015).

3 Theoretischer Teil

In der Vergangenheit wurden bereits Kopplungen zweier Analysetechniken (*hyphenated methods*) angewandt (Hirschfeld, 1980; Yang, 2006; Zhang *et al.*, 2012; Přichystal *et al.*, 2016). Der simultane Einsatz der beiden Methoden NMR und MS wird dabei immer populärer, da sich die Messtechniken hinsichtlich ihrer analytischen Eigenschaften synergistisch ergänzen (Markley *et al.*, 2017). Aus der statistischen Korrelation NMR-spektroskopischer und massenspektrometrischer Daten ergibt sich eine verbesserte Übersicht über das Metabolom, eine größere Treffsicherheit und ein erhöhter Informationsgehalt über potentielle Zielmoleküle (Larive *et al.*, 2015; Marshall, Powers, 2017). Verschiedene Studien konnten bereits von der physikalischen, analytischen oder statistischen Kopplung von NMR- und MS-Methoden profitieren (Baker *et al.*, 2012; Tayyari *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Bingol, Bruschweiler-Li, *et al.*, 2015; Marshall *et al.*, 2015; Bingol, Bruschweiler, 2015a; Bingol, Bruschweiler, 2015b; Grauso *et al.*, 2019; Palaric *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019).

3.2.2.4 Anwendungsbereiche von *Metabolomics*-Studien

Im Bereich der NMR-basierten *Metabolomics*-Forschung war insbesondere in den letzten 10-15 Jahren ein rapider Anstieg an Publikationen zu verzeichnen (Abbildung 8) (Marshall, Powers, 2017). Auch die Kopplung mit chemometrischen Auswerteverfahren gewann mehr und mehr an Bedeutung (Hohmann *et al.*, 2014; Tomassini *et al.*, 2016).

3 Theoretischer Teil

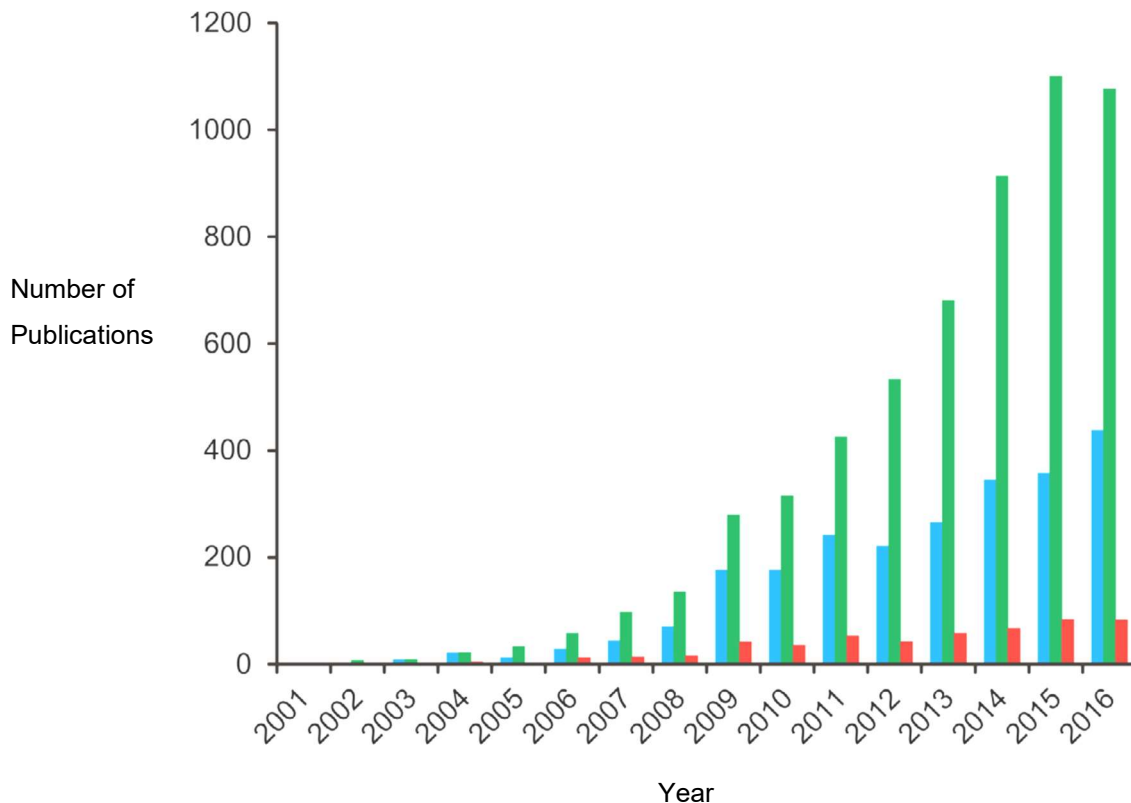


Abbildung 8: Anzahl der jährlichen Publikationen bei der Stichwortsuche im PubMed „NMR and metabolomics“ (blau), „MS and metabolomics“ (grün) und „NMR and MS and metabolomics“ (rot) (Marshall, Powers, 2017)

Erste Anwendung fand das Forschungsgebiet an biologischen Matrices aus dem medizinischen Bereich, wie beispielsweise an Blut, Plasma, Urin, Zellextrakten oder Geweben, aber auch im Bereich der Wirkstoffentwicklung (Hoult *et al.*, 1974; Gates, Sweeley, 1978; Nicholson *et al.*, 1984; Clayton *et al.*, 2006; Beckonert *et al.*, 2007; Nicholson, Lindon, 2008; Powers, 2009). In der Pflanzenphysiologie und in den Umweltwissenschaften hat sich die *Metabolomics*-Forschung ebenfalls stark etabliert (Holmes *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010; Fatma *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2016).

Da die Relevanz derartiger Studien oft auch mit der Frage nach der Authentizität und somit der Qualität und dem Preis eines Konsumgutes einhergeht, ist der Einsatz der Methodik im Bereich Ernährung und Lebensmittel leicht nachvollziehbar. Die meisten Studien beschäftigen sich im Wesentlichen mit der Echtheitsfrage hinsichtlich der geographischen oder botanischen Herkunft (Quellen siehe unten) sowie mit Qualitätsparametern (Ali *et al.*, 2011; Ferri *et al.*, 2015; Ordoudi *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015) und Verfälschungsproblematiken (Bertelli *et al.*, 2010; Mannina *et al.*, 2009; Consonni *et al.*, 2016) eines Lebensmittels.

3 Theoretischer Teil

Besonders der geographischen und botanischen Herkunft verschiedener hochwertiger Lebensmittel kommt eine große Bedeutung zu, wie zum Beispiel dem Honig (Sandusky, Raftery, 2005; Consonni, Cagliani, 2008; Lolli *et al.*, 2008; Beretta *et al.*, 2008; Donarski *et al.*, 2008; Schievano *et al.*, 2010; Boffo *et al.*, 2012; Kortensniemi *et al.*, 2016), Olivenöl (Sacchi *et al.*, 1997; Vlahov, 1999; Sacco *et al.*, 2000; Fauhl *et al.*, 2000; Mannina, Fontanazza *et al.*, 2001; Mannina, Patumi *et al.*, 2001; Rezzi *et al.*, 2005; D'Imperio *et al.*, 2010; Alonso-Salces, Moreno-Rojas *et al.*, 2010; Alonso-Salces, Héberger *et al.*, 2010; Mannina *et al.*, 2010; Mannina, Sobolev, 2011; Longobardi *et al.*, 2012), Wein (Du *et al.*, 2007; Viggiani *et al.*, 2008; Son *et al.*, 2008; Son, Hwang, Kim *et al.*, 2009; Son, Hwang, Ahn *et al.*, 2009; Anastasiadi *et al.*, 2009; López-Rituerto *et al.*, 2012; Godelmann *et al.*, 2013; Papotti *et al.*, 2013), Fruchtsaft (Spraul, Schütz, Humpfer *et al.*, 2009; Spraul, Schütz, Rinke *et al.*, 2009; Zielinski *et al.*, 2014; Tomita *et al.*, 2015; Sobolev *et al.*, 2015), Tomatenmark (Consonni *et al.*, 2009; Consonni *et al.*, 2010; Mallamace *et al.*, 2014), Tee (Lee *et al.*, 2010; Ohno *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015), Kaffee (Wei *et al.*, 2012; Arana *et al.*, 2015) oder anderen Produkten (Almeida *et al.*, 2006; Consonni, Cagliani, 2010; Capitani *et al.*, 2010; Capitani *et al.*, 2013; Hohmann *et al.*, 2014; Sciubba *et al.*, 2014; Tomassini *et al.*, 2016; Huo *et al.*, 2017).

3.3 NMR-Spektroskopie im Metabolomics-Bereich

Die Erhebung von *Metabolomics*-Daten kann auf verschiedenen analytischen Wegen erfolgen. Die gängigste Form der NMR-Analyse in der *Metabolomics*-Forschung ist die Anwendung von ¹H-NMR-Experimenten. Es werden Gemischtspektren (*full spectra*) aufgenommen, welche einen sehr hohen Informationsgehalt aufweisen, da eine große Bandbreite an Stoffgruppen detektiert werden kann. Der Hochfeldbereich umfasst aliphatische Kohlenwasserstoffe mit einer hohen Abschirmung und entsprechend kleiner chemischer Verschiebung bei (0.5 - 2) ppm, das heißt CH₃-, CH₂- und CH-Gruppen von Aminosäuren, Lipiden und anderen primären und sekundären Pflanzenstoffen. Etwas weiter tieffeldverschoben befinden sich Signale von Kernen, welche Anisotropieeffekte erzeugen, wie es z. B. bei Doppel- oder Dreifachbindungen der Fall ist. Diese Signale sind im Bereich von (1.5 - 2.5) ppm angesiedelt. Aliphatische Verbindungen mit Hydroxid- oder Aminogruppen wie z. B. Mono-, Di- und Trisaccharide oder sekundäre und tertiäre Amine sind im Bereich zwischen (2–5.5) ppm zu finden. Aromatische Stoffe mit oder ohne elektronenziehende/n Substituenten wie Halogen-, OH- oder NH₂- Gruppen besitzen eine geringere Abschirmung und befinden sich daher im Tieffeld bei höheren chemischen Verschiebungen zwischen (6.5 - 9) ppm. Diese Signale können zu Kernen aus aromatischen Aminosäuren, Sterolen oder anderen Polyphenolgerüsten aus sekundären Pflanzeninhaltsstoffen gehören. Noch weiter im Tieffeld

3 Theoretischer Teil

ab 9 ppm findet man die Carbonylgruppen-Signale von Aldehyden und organischen Säuren. Die große Diversität an erfassten Analyten birgt den Vorteil der ungerichteten, breitgestreuten Analyse des Metaboloms, ohne zuvor große Teile dessen zu diskriminieren und entsprechend nicht Gefahr zu laufen, mögliche chemische Marker nicht identifizieren zu können.

Um die aus dieser ungerichteten Analyse entstehenden großen Datensätze statistisch nutzbar zu gestalten, bedarf es eines ausreichend großen Datenpools. Weiterhin werden die Daten über große Zeitabstände hinweg, mitunter über Jahre und Jahrzehnte, akquiriert, weshalb die Notwendigkeit der Reproduzierbarkeit besteht. Ebenso von Wert für eine Standard-Methode, welche überall auf der Welt reproduzierbar sein soll, ist die Möglichkeit der Zugänglichkeit der Methode für andere Forschungsgruppen (siehe Punkt 3.2.2.2). Daher sind etablierte Standardarbeitsprotokolle sowie einheitliche, analytische und reproduzierbare Messverfahren von großer Wichtigkeit. (Markley *et al.*, 2017)

Die Standardisierung des Messverfahrens äußert sich zum einen hinsichtlich der Auswerteinstrumente und -programme, die zur Vergleichbarkeit identisch sein müssen, zum anderen bezüglich der verwendeten Messmethoden und Parameter. Die experimentellen Bedingungen müssen von der Aufarbeitungsmethode über die Wahl des NMR-Experiments und der spektralen Parameter bis hin zur Auswertung der Daten genau definiert sein. Um eine aussagekräftige Statistik zu erhalten, gibt es gewisse Anforderungen an eine *Metabolomics*-Studie im Bereich der NMR-Spektroskopie; diese lassen sich im Wesentlichen folgendermaßen zusammenfassen:

Das NMR-Spektrum soll zunächst einen hinreichend aussagekräftigen „Fingerabdruck“ der einzelnen Proben liefern. Weiterhin soll es über große Zeitabstände hinweg reproduzierbar sein. Für die statistische Aussagekraft ist eine erhebliche Probenmenge vonnöten – daher ist gleichzeitig eine kurze Analysendauer gewünscht (Spraul, Schütz, Rinke *et al.*, 2009). Darüber hinaus soll das Experiment zur vereinfachten Handhabung in einer automatisierten Messreihe mit einem konventionellen NMR-Spektrometer durchführbar sein. Für *Metabolomics*-Anwendungen im *Food*-Bereich hat sich diesbezüglich ein 400 MHz Spektrometer der Firma Bruker® etabliert, da es zu den am weitesten verbreiteten Spektrometertypen gehört. Das von der Firma Bruker® vorgegebene Programm *TopSpin* wird zur Steuerung des NMR-Spektrometers sowie zur Prozessierung und Auswertung der gemessenen Daten verwendet. Der Optimierungsbedarf der Messmethode soll weitestgehend gering gehalten werden; vor diesem Hintergrund hat sich das 1D-¹H-NOESY-Experiment als eine Standard-*Metabolomics*-Analysemethode etabliert (Giraudeau *et al.*, 2015; Beckonert *et al.*, 2007).

3.3.1 Das 1D-¹H-NOESY-Experiment

Im Folgenden soll begründet werden, weshalb das 1D-¹H-NOESY-Experiment für den vorliegenden Forschungsansatz am besten geeignet ist. Weiterhin wird die Funktionsweise der Pulssequenz dargelegt.

3.3.1.1 Begründung für die Wahl des Experiments

Herausforderungen der Messung und Probleme durch das Lösungsmittel- bzw. Wassersignal

Der Grund, wieso sich das 1D-¹H-NOESY-NMR-Experiment als Standard-Methode für *Metabolomics*-Anwendungen etabliert hat, sei im Folgenden erläutert: Für *non-targeted*, also ungerichtete, vielmehr aber für *targeted*, gerichtete, *Metabolomics*-Anwendungen werden stabile und reproduzierbare Spektrendaten benötigt, da statistische Auswertungen vorgenommen, Metabolitsignale identifiziert, zugeordnet und quantifiziert werden müssen. Insbesondere in biologischen Matrices sind stets große Anteile an im Probenmaterial natürlich enthaltenem (Rest-)Wasser enthalten. Ebenfalls werden für die Extraktion Lösungsmittel eingesetzt. Solche mengenmäßig-überrepräsentierten Komponenten beeinflussen bzw. erschweren die Quali- und Quantifizierbarkeit der Spektren.

Zwischen der Konzentration des Lösungsmittels eines Probenextraktes und der der interessanten Analyten existiert ein großer dynamischer Bereich. Dies führt zu Schwierigkeiten aufgrund von unterschiedlichen Einstellungsmöglichkeiten der Signalempfangeinheit (*receiver gain*): So würden Artefaktsignale und / oder nicht-lineare Basislinienoszillationen infolge einer Receiverüberlastung durch das Lösungsmittelsignal auftreten (*receiver gain* auf Metabolite eingestellt). Auf der anderen Seite werden kleine Metabolitsignale durch die Anwesenheit des großen Lösungsmittelsignals nicht detektierbar (*receiver gain* auf Lösungsmittel eingestellt), indem sie teils oder gänzlich überdeckt werden. Aber auch die Basislinie des Spektrums wird durch das *tailing* derart großer Signale beeinflusst, was zu Fehlern in der Auswertung führt, da insbesondere Metabolitsignale mit chemischen Verschiebungen in der unmittelbaren Nähe solcher großer Signale betroffen wären. (Giraudeau *et al.*, 2015)

Die Qualität der Spektren wäre somit deutlich verschlechtert, weshalb das enthaltene Lösungsmittelsignal im Spektrum selbst möglichst vollständig eliminiert werden muss. Wird das Lösungsmittel unterdrückt, verschiebt sich der dynamische Bereich und dessen oberes Limit ist nicht mehr Lösungsmittel-abhängig. Ist der *receiver gain* dann auf die stärksten Analytsignale eingestellt, so werden die geringer-konzentrierten Komponenten besser detektierbar und ihr Signal:Rausch-Verhältnis wird deutlich verbessert. Die selektive

3 Theoretischer Teil

Unterdrückung des Lösungsmittels ist daher von besonderer Wichtigkeit für die Identifizierung der Analyten und die statistische Auswertung der Datensätze. Hierfür wurden im Laufe der Zeit der NMR-Forschung verschiedene Signal-Unterdrückungs-Sequenzen entwickelt.

Eignung des 1D-¹H-NOESY-Experiments für *Metabolomics*-Anwendungen

Bei einfachen Signalsättigungsexperimenten, welche eine Wasserunterdrückung hervorrufen, kommt es aufgrund von störenden *faraway water* Effekten häufig zu Überlagerungen von Metabolitsignalen im Randbereich des verbleibenden Wasseranteils. Weitere Probleme birgen das WATERGATE-Experiment oder andere *excitation sculpting* Sequenzen, welche hauptsächlich in der Protein-NMR-Spektroskopie angewandt werden. Es wird eine große Bandbreite des Spektrums unterdrückt, bzw. erfolgt eine Inversion des unterdrückten Lösungsmittelsignals, welches um 180 ° phasenverschoben auf der „unteren“ Seite des Spektrums erscheint. Hierdurch werden in der Nähe befindliche Metabolitsignale stark verändert bzw. in ihrer Intensität beeinträchtigt und sind somit oft nicht mehr auswertbar. (Giraudeau *et al.*, 2015)

Bei dem 1D-¹H-NOESY-Experiment hingegen wird ein Spektrum mit einer sehr guten Lösungsmittelunterdrückung und einer sauberen Phase generiert. Weiterhin ist das unterdrückte Restsignal vergleichsweise schmal. Das heißt, auch die Signale jener in der Nähe des Lösungsmittelsignals befindlichen Analyten sind nur mit geringer Beeinträchtigung detektierbar, wie z. B. das anomere Proton der β-D-Glucose. Dieser Vorteil ist in der quantitativen Auswertung zu berücksichtigen.

Alle anderen erfassbaren Signale sind aufgrund der sauberen Phase und effektiven Lösungsmittelunterdrückung in der Regel sehr gut auswertbar. Grund hierfür ist die Kombination verschiedener Parameter in der Pulssequenz, welche das Messergebnis optimieren und unter Punkt 3.3.1.2 noch im Detail erläutert werden: die T1-Diskriminierung, die Dämpfung des *faraway waters* und des Interpuls Delays von nahezu 0 Sekunden zwischen den ersten beiden 90 ° Pulsen sowie die Phasenzyklisierung. Aber auch mit Hinblick auf mögliche Einflüsse infolge von *radiation dumping* (Punkt 3.3.1.2) sowie pH- oder Ionen-abhängige Signal-Shifts (von Bedeutung in Punkt 5.1.3.1.2) ist das 1D-¹H-NOESY-Experiment gut geeignet. (Giraudeau *et al.*, 2015)

All diese Faktoren führen zu einer optimierten Lösungsmittelunterdrückung, wobei die Störeffekte möglichst geringgehalten werden und die interessanten Metabolitsignale gut auswertbar bleiben. In Bezug auf die Optimierung der Messparameter ist das Messergebnis – verglichen mit anderen Unterdrückungssequenzen – in seiner Robustheit, Reproduzierbarkeit, Genauigkeit und Quantifizierbarkeit deutlich verbessert. Bei genauer Definition und Einhaltung

3 Theoretischer Teil

der experimentellen Parameter von der Probenvorbereitung bis hin zur Datenauswertung ist ein Spektrenvergleich und Datenbankaufbau möglich. Die umfänglichen Vorteile des Experiments sind demnach sehr wahrscheinlich der Grund dafür, weshalb die meisten NMR-*Metabolomics*-Forschungsgruppen sich zumeist dieses Experiments bedienen. (Le Gall *et al.*, 2003; Beckonert *et al.*, 2007; Giraudeau *et al.*, 2015; Allwood *et al.*, 2011; Trygg *et al.*, 2007)

3.3.1.2 Die Pulssequenz des 1D-¹H-NOESY-Experiments

Aufbau und Funktionsweise der Sequenz

Die Pulssequenz des 1D-Experiments findet zwar ihren Ursprung im entsprechenden 2D-Experiment, erfüllt für die vorliegende Fragestellung jedoch einen anderen Zweck: Es wird ein eindimensionales Protonenspektrum erzeugt, welches durch die drei aufeinanderfolgenden 90 °-Pulse eine selektive Unterdrückung des Lösungsmittelsignals erfährt. Die genaue Funktionsweise des Experiments sei ergänzend zu Abbildung 9 im Folgenden erläutert:

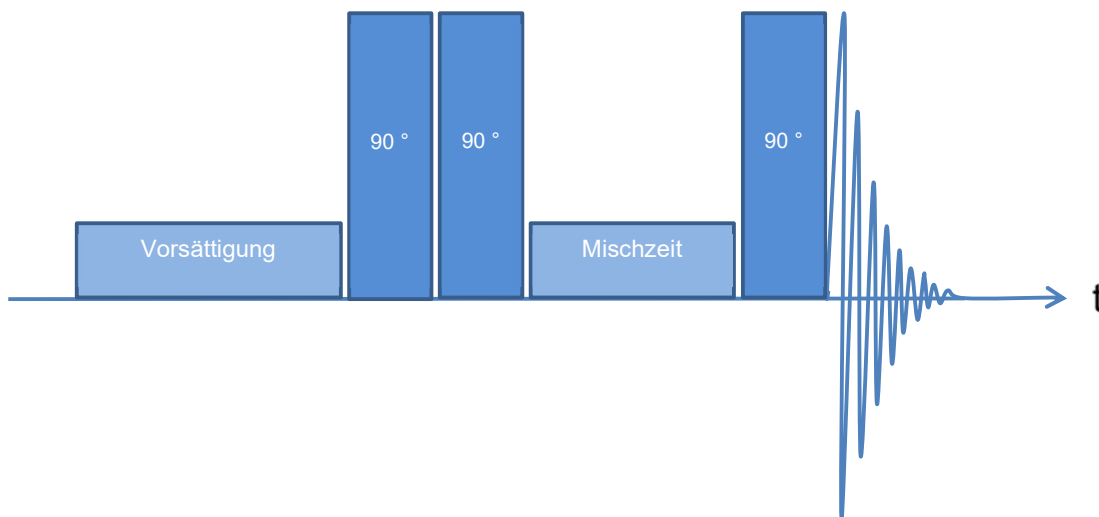


Abbildung 9: Pulssequenz des 1D-¹H-NOESY-Experiments

Zunächst werden ein „Delay“ zur Gleichgewichtseinstellung der Spins im Magnetfeld sowie ein langer, niederfrequenter Vorsättigungspuls vorgeschaltet, um die Selektivität der Lösungsmittelresonanz zu erhöhen. Ein Vorteil ist, dass dieser Puls die Analytsignale, welche mit ähnlicher Resonanz in der Nähe des zu unterdrückenden Lösungsmittelsignals liegen, kaum beeinflusst. (McKay, 2011)

Im Anschluss werden zwei unmittelbar aufeinanderfolgende 90 °-Pulse geschaltet, sodass sowohl die Analyt- als auch die Lösungsmittelsignale sich auf der -Z-Achse befinden. Die beiden 90 °-Pulse werden anstelle eines 180 °-Pulses, wie es in einer älteren Pulsfolge, dem WEFT (Water Eliminated Fourier Transform), der Fall war, verwendet, um sich die unabhängig

3 Theoretischer Teil

wechselnde Phasenzyklisierung zunutze zu machen (Erklärung s. u.). Die kurze Zeitspanne (4 μ s) zwischen den ersten beiden 90 °-Pulsen gibt die Möglichkeit des Richtungswechsels des ersten 90 °-Pulses zur Effekterzielung der Phasenzyklisierung. Die Entstehung der gemessenen Signale, insbesondere das verbesserte Signal:Rausch-Verhältnis sowie die Unterdrückung des Lösungsmittelsignals und technisch bedingter Artefakte, soll noch im Detail erläutert werden. (McKay, 2011)

In der darauffolgenden Mischzeit (ca. 10 ms) zwischen Puls 2 und 3 führt das Phänomen des „*radiation damping*“ zur zeitversetzten Relaxation der unterschiedlichen Spins. Durch den großen Magnetisierungsvektor des Lösungsmittelsignals, welcher sich gemeinsam mit den Analytkernspins zunächst auf der -Z-Achse befindet, wird ein entgegengesetztes elektromagnetisches Feld in der Empfängerelektronik induziert. Dieses Feld, welches nun dieselbe Frequenz wie das Lösungsmittel besitzt, beschleunigt dessen Relaxation um ein Vielfaches ($B_0 + B_{\text{Lösungsmittel}}$), sodass sich das Lösungsmittel wieder in Richtung der +Z-Achse bewegt. Währenddessen befindet sich der Magnetisierungsvektor der Analyten noch nahezu vollständig auf der -Z-Achse. Ältere Geräte (niedrigere Feldstärken) führten eine weitaus langsamere Relaxation des Lösungsmittels mit sich, da kein dem Auslenkungspuls entgegengesetztes Magnetfeld induziert werden konnte. Daher übte der Effekt des *radiation dumpings* damals einen nachteiligen Einfluss auf das Messergebnis aus. Für dieses Phänomen wurde bereits in den 70er Jahren der Begriff „T₁-Diskriminierung“ geprägt. Zwar handelt es sich bei dem Phänomen des *radiation dumpings* ebenfalls um ein Ungleichgewicht der Relaxationsgeschwindigkeiten zwischen Analytkernen und Lösungsmittelkernen, jedoch meint es heute ein umgekehrtes Verhältnis, nämlich, dass das Lösungsmittel nun schneller relaxiert. Der Begriff T₁-Diskriminierung ist laut Definition weiterhin zutreffend und wird für den Fall des *radiation dumpings* genutzt. (Hwang, Shaka, 1994; McKay, 2011)

Ein dritter 90 °-Puls lenkt im Anschluss der beiden 90 ° Pulse und der Mischzeit die auf der -Z-Ebene befindlichen Analytspins in die XY-Ebene, währenddessen sich die Lösungsmittelspins nicht oder kaum auf der Z-Achse befinden und deshalb nur marginal von diesem Puls erfasst werden. Der freie Induktionsabfall der Analytkernspins aus der XY-Ebene wird nun detektiert, mittels Fouriertransformation von der Zeit- in die Frequenzdomäne übertragen und in ein Signal umgewandelt. (McKay, 2011)

Volume selection und faraway water

Neben dem Phänomen des „*radiation damping*“ erleichtert auch die „*volume selection*“ die Unterdrückung des Lösungsmittels. Auch wenn die Proben als solche homogen sind, ist ihre Homogenität im Magnetfeld nicht zwangsläufig vollständig gegeben. Der Shim-Prozess, ein Vorgang, welcher jedem Experiment vorgeschaltet wird, sorgt dafür, dass das Magnetfeld im

3 Theoretischer Teil

Probenbereich überall homogen ist. Dies ist in der Praxis nicht zu 100 % realisierbar. Kernspins, welche sich genau im Zentrum der Empfängerspule befinden, erfahren die höchste Magnetfeldhomogenität, Kerne außerhalb dieses Zentrums befinden sich mit steigender Distanz in immer inhomogeneren Bereichen. In diesen Randbereichen werden die Pulslängen ungenauer und es resultieren breitere Linien, im Gegensatz zu den schmalen Signalen der zentral gelegeneren Kerne. Insbesondere Lösungsmittel sind diesem Effekt in den dezentralisierten Bereichen ausgesetzt. Das sogenannte „*faraway water*“ zeigt diesbezüglich einen stark ausgeprägten *volume selection*-Effekt. Die Protonen des deuterierten Wassers, welche sich am Rande des sensitiven NMR-Bereiches befinden, liefern breite Signale. Sie gehen zum Teil mit in die Basislinie über, sodass Signale von Interesse im Spektrum überdeckt oder derart beeinflusst werden, dass sie nicht mehr auswertbar sind. (McKay, 2011; Zheng, Price, 2010; Mo, Raftery, 2008a; Mo, Raftery, 2008b; Giraudeau *et al.*, 2015)

Die Phasenzyklisierung

Einen bisher noch nicht vollständig aufgeklärten Einfluss auf die Qualität des 1D-¹H-NOESY-Spektrums hat die oben bereits erwähnte Phasenzyklisierung, welche sich positiv auf das Signal:Rausch-Verhältnis des Spektrums auswirkt. Der Effekt der Phasenzyklisierung, welcher mittels Programmierung der Pulssequenz erzeugt wird, zeichnet sich im Allgemeinen durch eine automatisierbare Reduzierung / Eliminierung technisch bedingter Artefakte aus, währenddessen erwünschte Analytsignale verstärkt werden. Derartige Artefakte können durch eine leicht verschobene Ausrichtung des Receivers zu der Phase, in welche die Signale ausgelenkt werden oder durch die Ungenauigkeit der Pulse, der Pulsphasen sowie des Magnetfeldes entstehen. Im Detail werden laut McKay verschiedene Phänomene beschrieben, welche die Auslöschung unerwünschter Signale im Spektrum herbeiführen:

Die „*Cyclically Ordered Phase Sequence*“ (Cyclops) stellt die grundlegendste Art der Phasenzyklisierung dar. Durch die alternierende Umkehr sowohl des ersten 90 °-Pulses und des Receivers auf die +X- und -X-Achse löschen sich diese Artefakte aus, während die Lösungsmittelunterdrückung und Analytsignaldetektion fortwährend und unbeeinflusst durchgeführt werden. Das Prinzip des „*Exorcycle*“ beschreibt die mittels Phasenzyklisierung herbeigeführte Subtraktion ungewollter, aber realer Signale. Solche Signale entstehen aufgrund von Unstimmigkeiten vorheriger Zyklen, ungenauer Pulse oder durch Kernspins, welche von den Pulsen nicht ausgelenkt werden. Sogenannte „*Phantoms*“ entstehen bei ungenauen Phasen der beiden 90 °-Pulse. Auch dieses Phänomen kann durch die Subtraktion der FIDs reverser 180 °-Pulse verhindert werden. Weiterhin führt eine nicht perfekt ausgelenkte -Z-Magnetisierung zu sogenannten „*Ghost Peaks*“, da einige Spins von den

3 Theoretischer Teil

ersten beiden 90° -Pulsen nicht vollständig erfasst werden. Eine alternierende Phasenumkehr löscht diese Artefakte aus. Letztlich werden bei der „*Axial Suppression*“ mit Hilfe eines 32-Schritt-Zyklus, bei dem die Phasen in den Delays ($4 \mu\text{s}$) zwischen den ersten beiden 90° -Pulsen abwechselnd in die gegenüberliegende axiale Richtung gelenkt werden, ebenfalls Artefaktsignale ausgelöscht. Der Ersatz der beiden 90° -Pulse durch einen 180° -Puls bewirkt, entgegen der Erwartung (s. o. T_1 -Diskriminierung), eine schlechtere Lösungsmittelunterdrückung. (McKay, 2011)

Zusammenfassend werden bei der Phasenzyklisierung Artefakte, welche abhängig oder unabhängig von den Pulsen, der Phase oder dem Magnetfeld existieren, subtrahiert, während die FIDs der gewünschten Analytsignale jeweils in der Phase erfasst werden, in der der Receiver geschaltet ist. Betrachtet man die Abfolge der Pulssequenz mit Hilfe eines Vektormodells, so erfolgt die Auslenkung des Magnetisierungsvektors M_z durch den ersten 90° -Puls je nach Phase auf die $+X$ - (Fall a genannt) oder $-X$ -Achse (Fall b genannt). Der zweite 90° -Puls verläuft wiederum in beiden Fällen in die $+X$ -Richtung. Daher befindet sich M_z entweder auf der $-Z$ - (Fall a) oder $+Z$ -Achse (Fall b). Im letzteren Falle (Fall b) kommt es zu keiner Relaxation, da sich die Spins bereits im Gleichgewichtszustand befinden. Die Spins, welche sich auf der $-Z$ -Achse befinden, sollten nun während der Mischzeit t_{mix} zurück zur $+Z$ -Achse relaxieren. Aufgrund des oben beschriebenen Effekts des *radiation dampings* relaxieren hauptsächlich die Lösungsmittelspins, während sich die Analytkernspins noch nahezu vollständig auf der $-Z$ -Achse befinden, bevor der dritte und letzte 90° -Puls geschaltet wird. Dieser befördert nun sowohl die Spins auf der $+Z$ - als auch jene auf der $-Z$ -Achse in die transversale Ebene. Die Lösungsmittelspins sind aufgrund ihrer fehlenden Magnetisierung in der $+/-Z$ -Achse von dem letzten Puls nicht mehr betroffen. Je nachdem, in welcher Phase der Receiver geschaltet ist, werden nun die FIDs der erwünschten Signale detektiert, wobei die Lösungsmittelsignale nicht erfasst werden. Währenddessen werden durch Subtraktion der beiden Szenarien (Fall a und b) alle Artefaktsignale herausgelöscht. (McKay, 2011)

3.4 Statistische Auswertung

Die akquirierten NMR-Daten der Spargelprobenextrakte verschiedener Herkunftsregionen weisen größere und kleinere Unterschiede in ihrem Metabolom auf. Um diese Unterschiede in ein Verhältnis setzen zu können und sie nach Relevanz und Größe des Einflusses auf ein oder mehrere mögliche/s Unterscheidungsmerkmal/e einordnen zu können, bedarf es statistischer Auswerteverfahren. Diese Verfahren sollen eine komplexe Datenmatrix so reduzieren, dass die wesentlichen Unterschiede zwischen den Proben herauskristallisiert werden können. Bei einer Anzahl von 279 Spargelproben aus den Jahren 2014 bis 2016, jeweils einer Dreifachbestimmung und einer Anzahl von 32,000 Datenpunkten pro Spektrum, wird eine Datenmatrix mit 26,784,000 Datenpunkten erreicht.

Um die Vielzahl an Daten in eine übersichtlichere Matrix zu transferieren, wird eine Datenreduzierungsmethode angewandt, indem jedes Spektrum in viele kleine Teilintegrale, sogenannte „*buckets*“ oder „*bins*“, aufgeteilt wird. Dazu wird ein bestimmter Bereich integriert, d. h. es wird die Summe aller Intensitäten in diesem Bereich gebildet. Zwei verschiedene Methoden sind hierbei möglich: Zum einen können die *buckets* manuell generiert werden. Der Vorteil besteht im gezielten *bucketing* zusammenhängender Signale oder einzelner Peaks. Auf diese Weise bleiben die Signale weitestgehend „intakt“ und werden nicht randomisiert geschnitten. Dieser Prozess kann mit Hilfe entsprechender Algorithmen auch automatisiert werden. Zu den Nachteilen beim manuellen *bucketing* gehören die eventuell dadurch entstehende geringe Anzahl an *buckets*, aber auch der höhere Zeitaufwand. Zum anderen kann das *bucketing* automatisch in einem bestimmten Abstand (üblich sind 0.03 ppm) durchgeführt werden. Dieses *bucketing* ist weniger zeitintensiv, da der statistische Algorithmus diesen Prozess automatisch innerhalb weniger Sekunden steuert. Weiterhin ist die Auswahl der *buckets* weniger subjektiv festgelegt, was Fehler beim manuellen „Schneiden“ ausschließt. Von Nachteil kann das automatische *bucketing* bei der Prozessierung von Spektren mit starken pH-Shifts sein, wenn Signale beispielsweise über einen festgelegten *bucket* hinweg „shiften“. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die automatische Methode gewählt und das entstehende „*pattern*“ besteht aus 312 einzelnen Teilbereichen, welche jeweils eine Größe von 0.03 ppm besitzen. Diese Reduktion der Datenmatrix ist im Folgenden in Abbildung 10 entsprechend dargestellt:

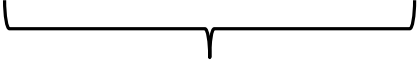
$279 \text{ Proben} \cdot 3 \text{ Bestimmungen} \cdot 32,000 \text{ Datenpunkte} = 26,784,000 \text{ Datenpunkte}$
$279 \text{ Proben} \cdot 3 \text{ Bestimmungen} \cdot 312 \text{ buckets} = 261,144 \text{ Datenpunkte.}$

<p style="text-align: center;">Absolute Probenanzahl Datenpunkte</p>

Abbildung 10: Zeile 1: Berechnung der Datenmatrix bestehend aus der Anzahl der Proben sowie deren Bestimmungen und den gemessenen Datenpunkten pro Probe; Zeile 2: Berechnung der Datenmatrix bestehend aus der Anzahl der Proben sowie deren Bestimmungen und der Anzahl der *buckets*

Die Datenpunkte wurden mit dieser Methode in etwa um den Faktor 100 reduziert und können nun mit Hilfe multivariater Datenanalyseverfahren vereinfacht ausgewertet werden.

3.4.1 Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis, PCA*)

Die Hauptkomponentenanalyse oder auch „*Principal Component Analysis*“ (PCA) stellt ein mathematisches Modell dar, welches komplexe Daten mit Hilfe von Linearkombinationen in weniger komplexe Hauptkomponenten reduziert. Die Vorgehensweise einer PCA soll im Folgenden veranschaulicht werden:

Bei der PCA handelt es sich um eine Dimensionsreduktionsmethode, bei der hochdimensionale Daten in einem niederdimensionalen Raum abgebildet werden, sodass ein Großteil der Gesamtvarianz erhalten bleibt. Die gemessenen Datenpunkte der Proben werden entlang ihrer größten Varianz, der Hauptkomponente 1 (PC1), graphisch aufgetragen. Die zweite Achse liegt orthogonal zur PC1 entlang der zweitgrößten Varianz (PC2) und beide PCs erklären oft einen großen Teil der Gesamtvarianz. Nicht selten erklären bereits die ersten vier PCs eine PCA sehr gut bis nahezu vollständig.

Die reduzierte Datenmatrix ist im Wesentlichen aus zwei Faktoren zusammengesetzt. Zum einen aus der Probenzahl und zum anderen aus der Anzahl der Datenpunkte oder *buckets*. Der kleinste der beiden Faktoren limitiert die Anzahl aller möglichen PCs. In dem vorliegenden Fall beträgt die maximale Anzahl an Hauptkomponenten 279, da dies die Anzahl an Proben ist (es wurden gemittelte Werte aus je einer Dreifachbestimmung verwendet). (Massart, Heyden, 2004)

Scaling

Zur Vermeidung von Fehlern in der statistischen Auswertung aufgrund von uneinheitlich skalierten Spektren mit unterschiedlichen Varianzen, müssen die Datensätze nach vorangegangener Normalisierung auf eine einheitliche Varianz skaliert werden („*scaling to unit variance*“). Dies verhindert den Einfluss von Signalen mit großen Intensitäten bei verhältnismäßig großen natürlichen Konzentrationsschwankungen der zugehörigen Verbindung(en). Der Einfluss dieser Komponenten wird somit relativiert. Hingegen kommt weniger intensiven Signalen mit entsprechend verhältnismäßig kleineren Konzentrationsschwankungen der zugehörigen Verbindung(en) mehr Bedeutung zu.

Für eine Aussage über die relative Gewichtung / den relativen Einfluss eines einzelnen *buckets* auf die gesamte Probengruppe in der statistischen Auswertung ist der Bezug auf ein Gesamtintegral vonnöten. Hierzu werden die Spektren bei der Erstellung des *bucket tables*, der resultierenden Datenmatrix, auf die Gesamtintensität skaliert („*scale to total intensity*“).

Scores plot und explained variance

Die graphische Gegenüberstellung der jeweiligen Hauptkomponenten wird als „*scores plot*“ bezeichnet (Abbildung 11), in welchem die Proben entsprechend ihrer Varianz gegeneinander aufgetragen werden. Wie groß der jeweilige Anteil einer Hauptkomponente an der Gesamtvarianz ist, zeigt die „*explained variance*“ (Abbildung 12). Generell gilt, dass der Varianzanteil mit steigender Hauptkomponentenordnung sinkt. So erklärt die erste Hauptkomponente den größtmöglichen Teil der Varianz und der Anteil jeder weiteren Hauptkomponente sinkt fortlaufend.

Um eine Vorstellung über die Aussagekraft der dargestellten PCA zu erhalten, werden die prozentualen Varianzanteile der verwendeten PCs addiert. Mit einer höheren erklärten Varianz bezogen auf die Summe der verwendeten Hauptkomponenten, aber auch der einzelnen PCs selbst, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die betrachtete PCA stabil ist. Zu beachten ist, dass die erklärte Varianz nur ein Indiz für die Aussagekraft der Hauptkomponentenanalyse ist. Ist die erklärte Varianz gering, so bedeutet es nicht automatisch, dass ein Trennmodell ungeeignet ist. Oder andersherum betrachtet: Beträgt die erklärte Varianz 90 % und die relevante Information steckt in den verbleibenden 10 %, so hat die erklärte Varianz keinen großen Aussagegehalt für die PCA. Sie ist vielmehr als ein Anhaltspunkt für die Aussagekraft einer PCA anzusehen; ein fester Grenzwert, nach dem die Zuverlässigkeit einer PCA bewertet wird, existiert nicht. (Kjeldahl, Bro, 2010)

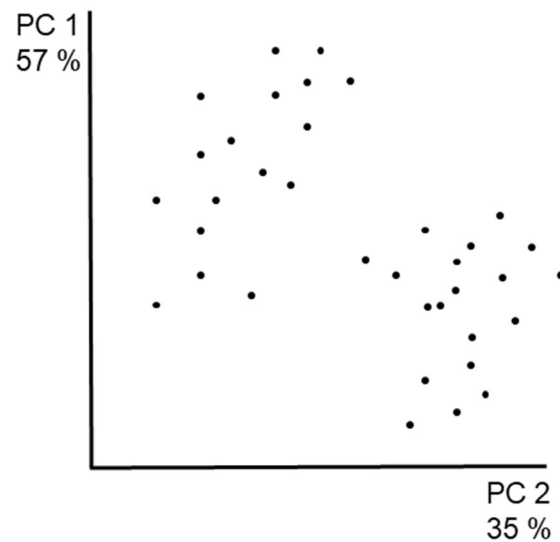


Abbildung 11: Scores plot einer Hauptkomponentenanalyse

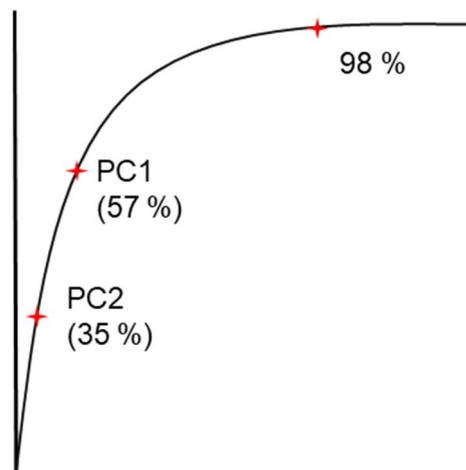


Abbildung 12: Explained variance einer Hauptkomponentenanalyse

Influence plot

Eine weitere Darstellungsform in der Hauptkomponentenanalyse liefert der „influence plot“ (Abbildung 13). Er gibt Aufschluss über den Einfluss der einzelnen Spektren in der graphischen Darstellung des scores plots. Hierbei ist der Datenmittelpunkt, im Gegensatz zum scores plot nicht der Nullpunkt des Koordinatensystems, sondern das untere linke Quartal. Alle Proben, welche über dem plot in diesem Quartal, d. h. oberhalb der x-Achse, liegen, besitzen eine Restvarianz und sind wahrscheinlich Ausreißer. Proben neben dem Quartal, also rechts von der y-Achse, besitzen hingegen nur einen gewissen Einfluss auf das Modell. Sie beeinflussen das Modell dahingehend, dass es besser auf sie selbst passt, müssen aber nicht zwingend gefährlich sein, wenn ihr Muster für die Variablen dem der Durchschnittsproben ähnelt. Eine Kombination dieser beiden Eigenschaften versammeln alle Proben, welche sich oberhalb der x- und rechts von der y-Achse befinden. Diese Proben sind als gefährliche

3 Theoretischer Teil

Ausreißer zu betrachten, da sie vom Modell zum einen schlecht beschrieben werden (Restvarianz) und zum anderen das Modell verzerren, um selbst besser hineinzupassen (Einfluss auf das Modell).

Zusammenfassend bedeuten also in sich konsistentere Spektren mit ähnlichen Mittelwerten die Konzentrierung innerhalb des *plots* unterhalb der x-Achse und links der y-Achse. Weist eine Probe starke Abweichungen auf, so bewirkt diese einen erhöhten Einfluss auf den *scores plot*, was die Identifizierung von Ausreißern erleichtert. (Marini, 2013)

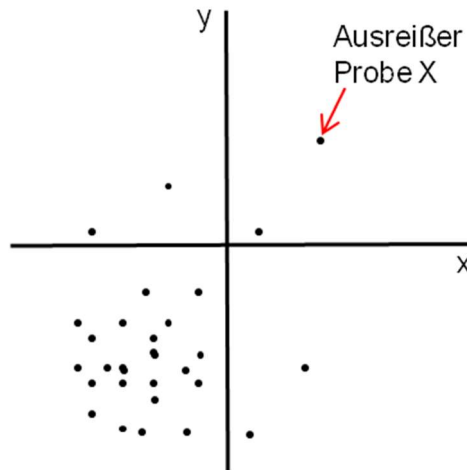


Abbildung 13: *Influence plot* einer Hauptkomponentenanalyse

Loadings plot

Mit Hilfe des „*loadings plots*“ wird der Einfluss eines bestimmten *buckets* auf die einzelnen Hauptkomponenten und damit auf die Trennung der betrachteten Probengruppen dargestellt (Abbildung 14). Der Einfluss eines *buckets* ist umso größer, je weiter es vom Nullpunkt entfernt liegt. Nahe beieinander liegende *buckets* haben einen ähnlichen Einfluss. Der *loadings plot* ist als eine Art Schablone für relevante *buckets* in der graphischen Darstellung des *scores plot* zu verstehen. Liegt ein *bucket* im *loadings plot* über einem Bereich des *scores plots*, in dem in besonderem Maße Proben einer Probengruppe vorzufinden sind, so ist davon auszugehen, dass dieses *bucket* einen großen Einfluss auf die Trennung dieser Gruppe von allen anderen Gruppen hat. Auf diesem Wege können Hinweise auf potentielle chemische Marker erlangt werden.

Darüber hinaus können mit Hilfe von sogenannten „*box plots*“ die relativen und absoluten Abweichungen der einzelnen *buckets* bezogen auf alle im Datensatz befindlichen Spektren dargestellt werden. Diese *box plots* ermöglichen die genaue graphische Darstellung über die statistische Verteilung des *buckets* in allen Spektren und Probengruppen. Insbesondere bei chemischen Markern, die in nur sehr geringen Konzentrationen vorliegen, können die

3 Theoretischer Teil

ausschlaggebenden Unterschiede durch die Darstellung der relativen Varianz der *buckets* verbildlicht werden. (Massart, Heyden, 2004; Massart *et al.*, 2005; Neidig, 2004)

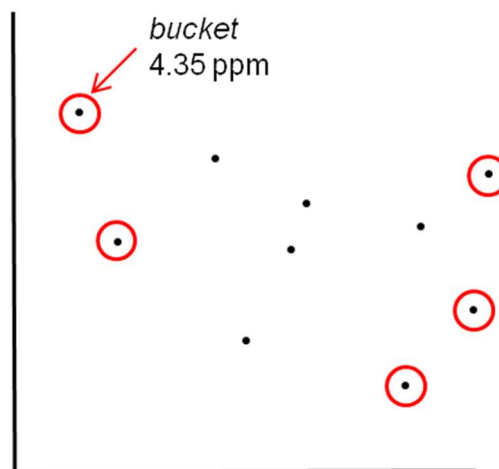


Abbildung 14: *Loadings Plot* einer Hauptkomponentenanalyse

3.4.2 *Partial Least Square Discriminant Analysis* (PLS-DA)

Im Gegensatz zur ungerichteten Hauptkomponentenanalyse gibt es auch verschiedene Verfahren zur Gruppentrennung anhand gerichteter Fragestellungen, die sogenannten Diskriminanzanalysen. Zum einen kann mit Hilfe von Linearkombinationen gruppenspezifischer Merkmale (Variablen) eine gerichtete Separation im Koordinatensystem erfolgen. Zu diesen Verfahren gehört auch die „*Partial Least Square Discriminant Analysis*“, kurz PLS-DA. Hierbei werden – nicht wie bei der PCA, bei der alle Proben unberührt von einer Gruppenzugehörigkeit im *bucket table* gleichbehandelt werden – die bekannten Proben ihren jeweiligen Gruppen zugeordnet. Eine andere Methode zur Durchführung einer Diskriminanzanalyse sei in diesem Unterkapitel unter dem Abschnitt „Klassifikationsmodell“ beschrieben.

Nach der Vorbereitung und Prozessierung der Daten im Rahmen der Hauptkomponentenanalyse (siehe Punkt 3.4.1) werden sie in ihre jeweilige Gruppe eingepflegt; es resultiert eine Zuordnungstabelle, welche als „*Y-table*“ bezeichnet wird. Am Beispiel dieses Forschungsthemas stellen solche Gruppen Herkunftsländer der verschiedenen Spargelproben dar. Es wird also nicht die größte Varianz aller Proben wie bei der PCA, sondern in Korrelation zu der vorgenommenen Gruppeneinteilung der Proben untersucht. War eine Trennung mittels PCA aufgrund eindeutiger Hauptkomponenten möglich, so ist die erfolgreiche Trennung mit denselben Hauptkomponenten in der PLS-DA sehr wahrscheinlich, aber nicht garantiert. Eine Besonderheit in der gerichteten Varianzanalyse ist die Tatsache, dass auch Hauptkomponenten höherer Ordnung häufig zu einer Trennung von

3 Theoretischer Teil

Probengruppen führen können. Solche Varianzen können einerseits auf systematischen Unterscheidungsmerkmalen beruhen (im Rahmen dieser Arbeit wären das z. B. Metabolomunterschiede, welche zunächst als weniger relevant eingestuft wurden); andererseits können auch zufällige Fehler der Grund hierfür sein, womit die Trennung fälschlicherweise als positiv gedeutet werden könnte; die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Trennungen aufgrund zufälliger Fehler sinkt mit steigender Probenanzahl pro Gruppe. Die graphische Darstellung einer PLS-DA wird, wie auch bei der PCA, als *scores plot* bezeichnet.

Klassifikationsmodell

Um die Herkunft einer unbekannt Probe ermitteln zu können, kann man sich eines Vorhersagemodells bedienen. Während die PLS-DA nur anhand von Linearkombinationen berechnet und graphisch dargestellt wird, muss bei der linearen Diskriminanzanalyse (LDA) ein Klassifikator mit verschiedenen Algorithmen trainiert werden, sogenannten linearen Diskriminanzfunktionen (LDF). Dabei werden einem System bestimmte Variabilitäten aus Datensätzen in algorithmischer Form „angelernt“ – hieraus ergibt sich die Begriffsherkunft für maschinelles Lernen oder „*machine learning*“.

Für die Klassifikation muss eine ausreichend große Probenmenge gegeben sein. Der *Y-table* aus der PLS-DA bildet die Grundlage für die Vorhersage – ein zufällig gewählter Teil der Proben wird nun seinen jeweiligen Gruppen zugeordnet. Diese Proben bilden das „*Trainings-Set*“. Es dient im Wesentlichen einer Kalibrierung der jeweiligen Probengruppe. Über die LDF wird das Modell erstellt und mit Hilfe des RSMEC-Werts („*root mean square error of calibration*“) (Zuordnung der Zahlenwerte „0“ oder „1“) bewertet, ob es für eine zuverlässige Vorhersage mit einem Prozentsatz X geeignet ist. Es wird indirekt ein Fehlerbereich des *Trainings-Sets* berechnet.

Eine Kontrollgruppe, der sogenannte „*Test-Set*“, stellt eine Menge an Proben dar, deren Gruppenzugehörigkeiten bekannt sind und soll das *Trainings-Set* validieren. Die Proben der Kontrollgruppe werden anhand der vordefinierten LDF aus dem *Trainings-Set* ihren errechneten Gruppen zugeordnet. Der Anteil, zu wieviel Prozent die Vorhersage korrekt ist, gibt Aufschluss über die Genauigkeit und Zuverlässigkeit des Modells und wird als „*accuracy rate*“ bezeichnet (Miller, Miller, 2010; Neidig, 2004). Auf der Grundlage des *Test-Sets* wird wiederum ein RSMEP-Wert („*root mean square error of prediction*“) generiert, welcher Aufschluss über seine Zuverlässigkeit und die indirekte Fehlerwahrscheinlichkeit gibt. (Miller, Miller, 2010; Neidig, 2004)

Bei einer großen Übereinstimmung zwischen tatsächlicher und vorhergesagter Gruppenzugehörigkeit ist das Modell für die Bestimmung unbekannter Proben geeignet; in der Literatur gibt es keine prozentualen Anhaltspunkte, ab welcher Genauigkeit ein Modell als

3 Theoretischer Teil

valide zu betrachten ist, da die Bewertung eines Modells immer von verschiedenen Faktoren abhängt. Auf Grundlage der LDF des *Trainings-Sets* können nun unbekannte Proben einem Zahlenwert um „0“ oder „1“ und somit auch einer Gruppe zugeordnet werden und zur Aufklärung, beispielsweise ihrer geographischen Herkunft, herangezogen werden. Je nach Fragestellung kann bis zu einer gewissen Abweichung von dem jeweiligen Zahlenwert die Vorhersage der Probe als zuverlässig oder unzuverlässig angesehen werden. (Miller, Miller, 2010; Neidig, 2004)

3.4.3 random forest

Wie bei der Gruppenklassifikation mittels PLS-DA basiert das Modell „*random forest*“ auf einer ähnlichen Herangehensweise. Bei einem *random-forest*-Klassifikator wird ein Ensemble von unabhängigen Entscheidungsbäumen trainiert. Jeder einzelne Entscheidungsbaum besitzt viele verschiedene Verzweigungen, im Folgenden Knoten genannt. Dabei betrachtet jeder Knoten nur ein zufällig gewähltes „*feature*“ (entspricht einem *bucket*). Für die Wahl der Anzahl der betrachteten *features* wird oft ein Standardwert verwendet, welcher sich aus der Wurzel der Gesamtzahl der verfügbaren *features* berechnet. Anhand der betrachteten *features* wird die Gruppenzuweisung durch diesen Entscheidungsbaum bestimmt. Ein Hilfskriterium zur Auswahl und Bewertung der entscheidenden *features* liefert der „Gini-Index“. Dieser Index stellt einen Koeffizienten dar, welcher Ungleichverteilungen anzeigt und aus der Lorenz-Kurve abgeleitet wird; er bewegt sich zwischen 0 und 1. Bei hoher Ähnlichkeit eines Merkmals einer Probe im Vergleich zur Gruppe nähert er sich dem Wert 0 an, bei Ungleichheit steigt er und bei einem absoluten Individualmerkmal nimmt er den Wert 1 an. Beide Gruppen sollen nach der Trennung sowohl in sich möglichst homogen, als auch gut voneinander getrennt sein. Zur Homogenität und Trennung der beiden Klassen kann neben dem *feature* selbst auch dessen Intensität beitragen. (Breiman *et al.*, 1984)

Nach der ersten Trennungsaufgabe am Knotenpunkt A wird dieselbe Prozedur mit jeweils wechselnden *features* an allen folgenden Knoten B, C, usw. vorgenommen. Ist die letzte Ebene des Baumes erreicht, wird eine Klasseninformation für diesen einen Baum generiert. Diese Information kann sich aus mehreren komplexen Kriterien zusammensetzen, welche eine Aussage über die jeweilige Klasse liefern (Bsp: Intensität des *buckets* $A > 1$, *bucket* $B < 2$ und *bucket* $C > 3$ bedeutet, dass die Probe der Klasse 1 angehört). Dieser Prozess wird für alle weiteren Entscheidungsbäume durchgeführt. Die Anzahl an Bäumen wird im Vorfeld festgelegt; mehr als 1,000 Entscheidungsbäume führen aus statistischer Sicht keine weitere Verbesserung herbei.

3 Theoretischer Teil

Die Klassifikation mit Hilfe eines *Trainings-Sets* und der anschließenden Validierung am *Test-Set* erfolgt schematisch analog, wie in Punkt 3.4.2 beschrieben: das *Trainings-Set* stellt den Entscheidungsbäumen die exakten Gruppen-*features* als Information zu Verfügung, anhand derer die Daten aus dem *Test-Set* zugeordnet und das System überprüft wird. Das Maß für die Zuverlässigkeit der Vorhersage richtet sich nach dem prozentualen Betrag der korrekt vorhergesagten Proben aus dem *Test-Set* und wird als „*accuracy rate*“ bezeichnet (Miller, Miller, 2010; Neidig, 2004).

Die Zuordnung eines Datensatzes unbekannter Klassenzugehörigkeit erfolgt anhand der trainierten Entscheidungsbäume. Jeder der 1,000 trainierten Bäume durchläuft mit einem Datensatz alle Knotenpunkte und sagt unabhängig von den übrigen Entscheidungsbäumen eine Klasse voraus. Das Gesamtergebnis der Entscheidungen führt zur endgültigen Klassifizierungsentscheidung.

3.4.3.1 Confusion matrix

Ein Mittel, um die Ergebnisse eines Klassifikationsmodells mit mehreren Gruppen zu verbildlichen, stellt die *confusion matrix* dar. In dieser Matrix werden auf der linken Seite in den Zeilen die jeweiligen Gruppen angegeben (*actual* oder *true*), auf der Kopfseite in den Spalten sind die Zuordnungsgruppen (*predicted*) angezeigt.

In der Matrix werden alle Gruppen-spezifischen *accuracies*, die falsch-negativen und richtig-positiven Zuordnungsergebnisse dargestellt. In der Diagonalen einer solchen *confusion matrix* lässt sich das Ergebnis der TP (*true positive*)-Zuordnungen als absolute und relative Werte ablesen. In Abbildung 15 sei ein Beispiel einer *confusion matrix* aufgeführt.

3 Theoretischer Teil

Confusion matrix

Output class	1	24 12.4%	0 0.0%	3 1.6%	5 2.6%	0 0.0%	0 0.0%	75.0% 25.0%
	2	0 0.0%	33 17.1%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	100 0.0%
	3	0 0.0%	2 1.0%	24 1.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	92.3% 7.7%
	4	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	23 11.9%	0 0.0%	0 0.0%	100% 0.0%
	5	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	25 13.0%	9 4.7%	73.5% 26.5%
	6	12 6.2%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	7 3.6%	26 13.5%	57.8% 42.2%
		66.7% 33.3%	94.3% 5.7%	88.9% 11.1%	82.1% 17.9%	78.1% 21.9%	74.3% 25.7%	80.3% 19.7%
	1	2	3	4	5	6		
	Target class							

Abbildung 15: Confusion matrix einer Lungenkrebsstudie (rot = Falschzuordnungen; grün = Korrektzuordnungen) (Adetiba, Olugbara, 2015)

Oversampling

Im Falle von zu unterschiedlichen Klassengrößen und somit häufiger Falschzuordnungen kann mit Hilfe des „Oversamplings“ entgegengewirkt werden: *Oversampling* wird bei kleinen Probenmengen innerhalb einer Gruppe vorgenommen. Es dient der statistischen Zuverlässigkeit und somit Tragbarkeit einer Gruppe. Proben mit demselben durchschnittlichen Muster der realen Proben werden künstlich nachmodelliert und der Probengruppe hinzugeführt. Dies führt im besten Fall zu einer Stabilisierung der Datenmatrix, im schlechtesten Fall werden die wenigen Proben einer Gruppe anhand ihrer Merkmale „über- oder fehlspezifiziert“ („*Overfitting*“), sodass ein unreales und/oder verschobenes Gruppenmuster entsteht. Somit ergänzt sich ein ohnehin schwaches Gruppenmuster um zwar stabilisierende, aber auch eventuell unrealistische Proben. Daher ist das Generieren neuer, nicht-realer Daten stets differenziert zu betrachten.

3.4.3.2 Importance, boruta und bar plots

Nach erfolgter *random forest* Vorhersage kann anhand der einzelnen *features* eine bestimmte Gruppe von einer oder mehreren anderen Gruppe/n separiert werden. Mit Hilfe der prozentualen Treffsicherheiten der *features* kann darüber hinaus ein Ranking erstellt werden. Solch ein Ranking ist auf verschiedene Art und Weise darstellbar:

3 Theoretischer Teil

Zum einen zeigt der sogenannte „*importance plot*“ die aus dem Datensatz gemittelte Relevanz jedes einzelnen *buckets* verteilt über das gesamte Spektrum aller Datensätze. Besonders auffällige *buckets* können auf diese Weise einfach den spektralen Regionen und somit möglichen Strukturen oder Substanzklassen zugeordnet werden. In Abbildung 16 ist ein *importance plot* zur Darstellung der Relevanzverteilung der *buckets* von deutschen Spargelproben abgebildet; die Daten wurden zur beispielhaften Darstellung gewählt und haben an dieser Stelle keine Bedeutung für das Ergebnis dieser Arbeit.

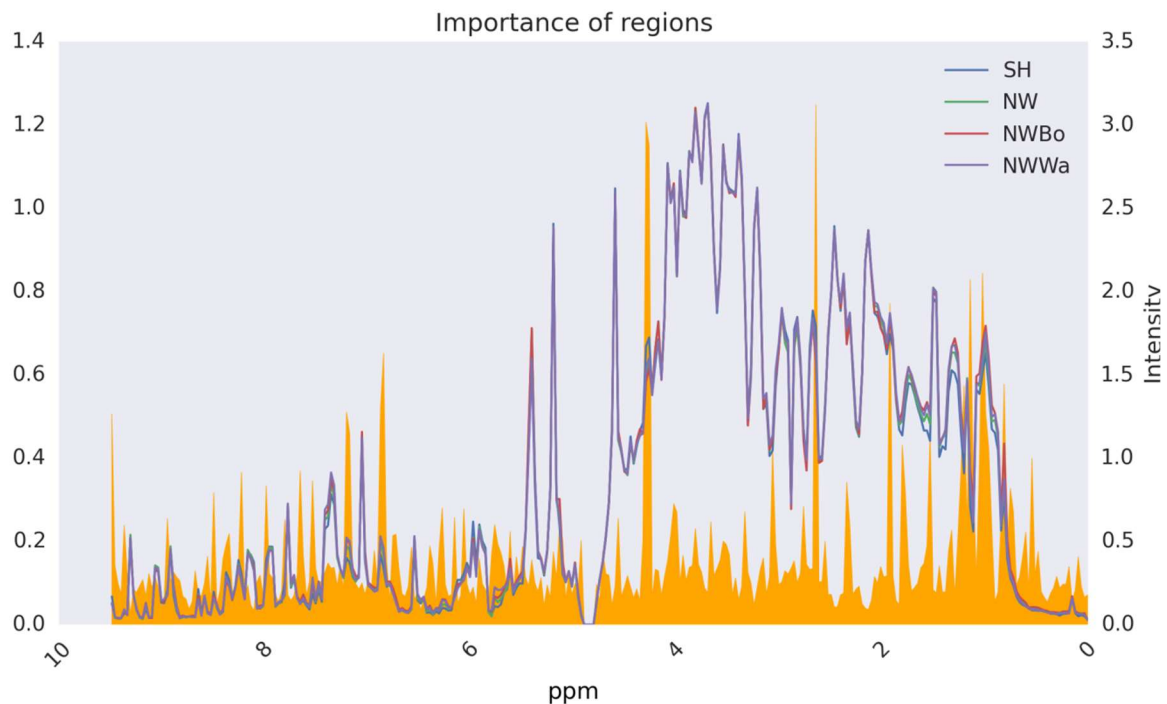


Abbildung 16: *importance plot* deutscher Spargelproben (orange = importance; violett, grün, rot, blau = Spektren aus unterschiedlichen Bundesländern)

Eine andere Möglichkeit bietet die Darstellung mit Hilfe des *boruta plots*, welcher ebenfalls auf den *random forest*-Ergebnissen aufbaut. Es wird ein *feature selection* Algorithmus verwendet, der die *buckets* nach deren Wichtigkeit für die Trennung von Gruppen sortiert sowie deren Varianz über den gesamten Datensatz anzeigt. Dabei werden *features* systematisch und iterativ ausgeschlossen, welche weniger relevant sind. Dadurch werden zufällige falsch-negative Korrelationen sowie die Gefahr des *overfittings* reduziert. Ein Beispiel eines *boruta plots* folgt in Abbildung 17. (Chang *et al.*, 2017)

3 Theoretischer Teil

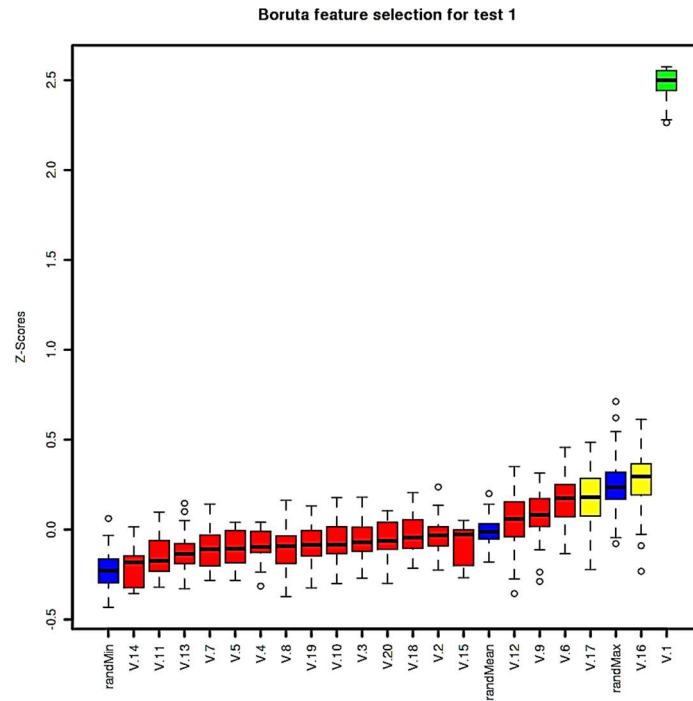


Abbildung 17: *boruta plot* eines Testdatensatzes mit 20 Variablen (Engelhardt, 2010)

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit einer erweiterten Darstellung einzelner *buckets* bezüglich ihrer logarithmierten Intensitäten in den jeweiligen Gruppen des gesamten Datensatz. Die in Punkt 3.4.1 im Unterabschnitt „*Loadings plot*“ bereits beschriebene Darstellungsmöglichkeit des *box plots* birgt den Vorteil, dass die *buckets*, welche von Interesse sind, separat betrachtet und direkt verglichen werden können. Es lassen sich der Mittelwert, die Streuung sowie eventuelle Ausreißer für die unterschiedlichen Gruppen über den gesamte Datensatz in einem *plot* abbilden, wie beispielhaft in Abbildung 18 zu sehen ist.

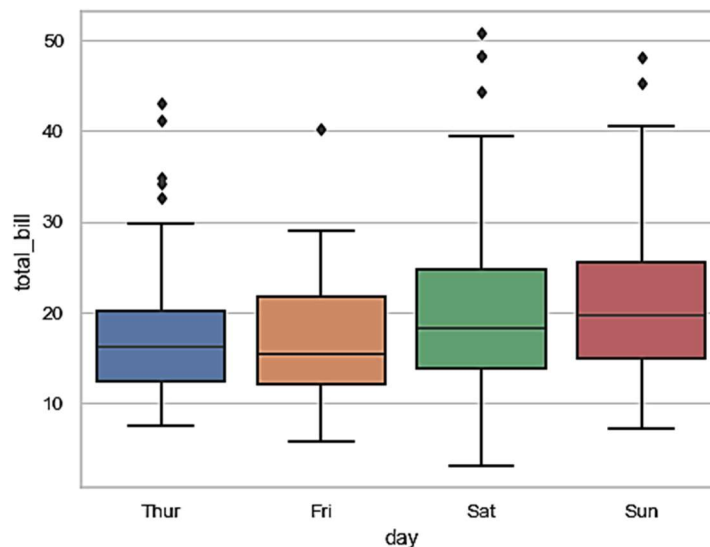


Abbildung 18: *box plot* eines Testdatensatzes mit vier unterschiedlichen Gruppen (Seaborn, 2020)

3.4.4 Kreuzvalidierung

Wie zuverlässig ein Vorhersagemodell für die Zuordnung unbekannter Proben in definierte Klassen ist, kann mit Hilfe einer Kreuzvalidierung überprüft werden. Die Kreuzvalidierung ermöglicht eine bessere Beurteilung der Vorhersagegenauigkeit eines bereits trainierten Vorhersagemodells (Wollschläger, 2015). Ein solches Validierungsmodell kann sowohl für *random forest*, als auch für die *support vector machine* (SVM) oder eine lineare Diskriminanzanalyse (LDA) angewandt werden. Zunächst muss, wie üblich, das *Training* des Klassifikators vorgenommen werden.

Üblicherweise wird die Validierung mehr als ein Mal durchgeführt, weshalb mehrere Teilgruppen des Datensatzes benötigt werden. Die Gesamtgruppe wird in k gleichgroße Teilgruppen empirisch partitioniert. Dabei können die einzelnen Proben ihre Zugehörigkeit zu dem *Trainings-* oder *Test-Set* k -mal wechseln, woher der Name *Kreuzvalidierung* rührt. Empfohlene, gängige Werte für die Anzahl der Durchführung einer Kreuzvalidierung sind 5 oder 10, um die bestmöglichen Ergebnisse zu erreichen (Dietzsch, 2012). Höhere Werte als 10 bedürfen eines größeren rechnerischen Aufwands insbesondere bei stark probenreichen Modellen.

Die Vorgehensweise des Modells soll anhand der Zehnfach-Kreuzvalidierung im Folgenden erläutert werden: Zunächst wird der gesamte Probensatz empirisch in zehn gleichgroße Teile geteilt. Anschließend wird ein Teil (90 %), das *Trainings-Set*, auf dessen Gruppeneigenschaften trainiert und der restliche Teil (10 %), das sogenannte *Test-Set*, auf Grundlage dieses Trainingsmodells validiert. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis jede Teilgruppe einmal dem *Test-Set* und neun Mal dem *Trainings-Set* angehört hat. Würden alle Daten zum Trainieren verwendet werden, so gäbe es kein unabhängiges *Test-Set*, welches zum Evaluieren der Trainingsleistung herangezogen werden kann.

Im *Test-Set* kann das Programm mittels automatisierten Entfernens jedes einzelnen Spektrums aus dem gesamten Datensatz – je nach Grad der Änderung, die das Entfernen eines Spektrums herbeiführt – einen Ausreißer identifizieren. Wurde der Datensatz dem Testverfahren für ein bestimmtes Vorhersagemodell unterzogen, liegt eine Aussage über die Zuverlässigkeit der Vorhersagegenauigkeit dieses Modells vor.

4 Zielsetzung und Problemstellung der Arbeit

Der steigende Handelspreis des Edelgemüses Spargel in Deutschland animiert kriminelle Händler immer häufiger zur Angabe qualitätsbezogener Prädikate bei der Vermarktung gewöhnlichen, zumeist ausländischen Spargels. Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Methode zur Lösung des Verfälschungsproblems von deutschem Spargel (siehe Punkt 2.2) unter Anwendung der Kernresonanzspektroskopie entwickelt werden.

Aus 13 verschiedenen Anbauregionen in Deutschland sowie aus dem für den Spargelanbau relevanten Ausland (Polen, Niederlande, Spanien, Griechenland und Peru) soll eine möglichst hohe Anzahl an Spargelproben gesammelt werden. Um eine Aussage über die verschiedenen äußeren Einflussfaktoren, welche das Metabolom einer Pflanze beeinträchtigen können, treffen zu können, sollen Proben verschiedener Sorten sowie über mindestens drei Erntejahre hinweg bezogen werden.

Für die Entwicklung einer Standardarbeitsanweisung (SOP) zur Vorbereitung, Extraktion und Messung der Proben wird auf verschiedene Literaturquellen zurückgegriffen. Die bestehenden Methoden zur NMR-spektroskopischen Metabolomanalyse von pflanzlichen Lebensmitteln sollen auf die Matrix Spargel und mit besonderem Augenmerk auf die Stabilität der Proben sowie auf die Reproduzierbarkeit der Daten an die Fragestellung der Herkunftsanalyse angepasst und optimiert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit zur Vermessung der Proben herangezogene Analysenmethode ^1H -NMR-Spektroskopie bietet verschiedene Vorteile: Viele Metabolite können bei einmaliger, nicht-destruktiver Messung schnell und einfach erfasst werden, da keine Fraktionierung vonnöten ist. Weiterhin wird sowohl ein hoher Probendurchsatz, als auch eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Daten gewährleistet (Fatma *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2010; Ward *et al.*, 2010; Mannina *et al.*, 2012). Durch die geringe Selektivität der Messtechnik und die Möglichkeit hoher Auflösungen können verschiedenste Verbindungen mit diversen Eigenschaften erfasst werden. Das bedeutendste NMR-Messexperiment für herkunftsassoziierte *Metabolomics*-Fragestellungen stellt das 1D- ^1H -NOESY-Experiment dar. Die Vorteile in der Lösungsmittelunterdrückung sowie der Reproduzierbarkeit des Experiments wurden bereits in Punkt 3.3.1.1 beschrieben.

Die generierten Daten sollen mit Hilfe multivariater Analysemethoden, wie der Hauptkomponentenanalyse und verschiedener Klassifizierungsmodelle (PLS-DA, *random forest*) ausgewertet und ein Modell zur Differenzierung der Proben aus unterschiedlichen Herkunftsländern entwickelt werden. Schließlich soll auf Basis der Ergebnisse und mit Hilfe geeigneter 1D- und 2D-NMR-Experimente die Identifizierung chemischer Marker dargestellt werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit befassen sich mit der NMR-spektroskopischen Analyse der Stoffwechselprodukte von weißem Spargel, um mit Hilfe statistischer Auswerteverfahren eine Aussage über die geographische Herkunft zu erlangen. Es wurden ungerichtete, also *non-targeted* Analysen des Metaboloms von 279 deutschen und ausländischen Spargelproben durchgeführt. Anhand dieser Daten wurden mittels statistischer Datenanalyseverfahren individuelle Profileigenschaften identifiziert, welche es erlauben, Proben unbekannter Herkunft zu bestimmen und einer Probengruppe zuzuordnen. Eine anschließende Identifikation eines Metaboliten, welcher für eine bestimmte Gruppentrennung verantwortlich sein könnte, wurde im Zuge einer *targeted* Analyse durchgeführt.

Mit dem $1D\text{-}^1\text{H-NOESY}$ -Experiment werden die Protonen eines Stoffgemisches kernresonanzspektroskopisch detektiert, welches einen Überblick über die einzelnen chemischen Substanzgruppen im Probenmaterial liefert (siehe Punkt 3.3). Ein repräsentatives Spektrum einer deutschen Spargelprobe aus dem Erntejahr 2015 sei in Abbildung 19 dargestellt.

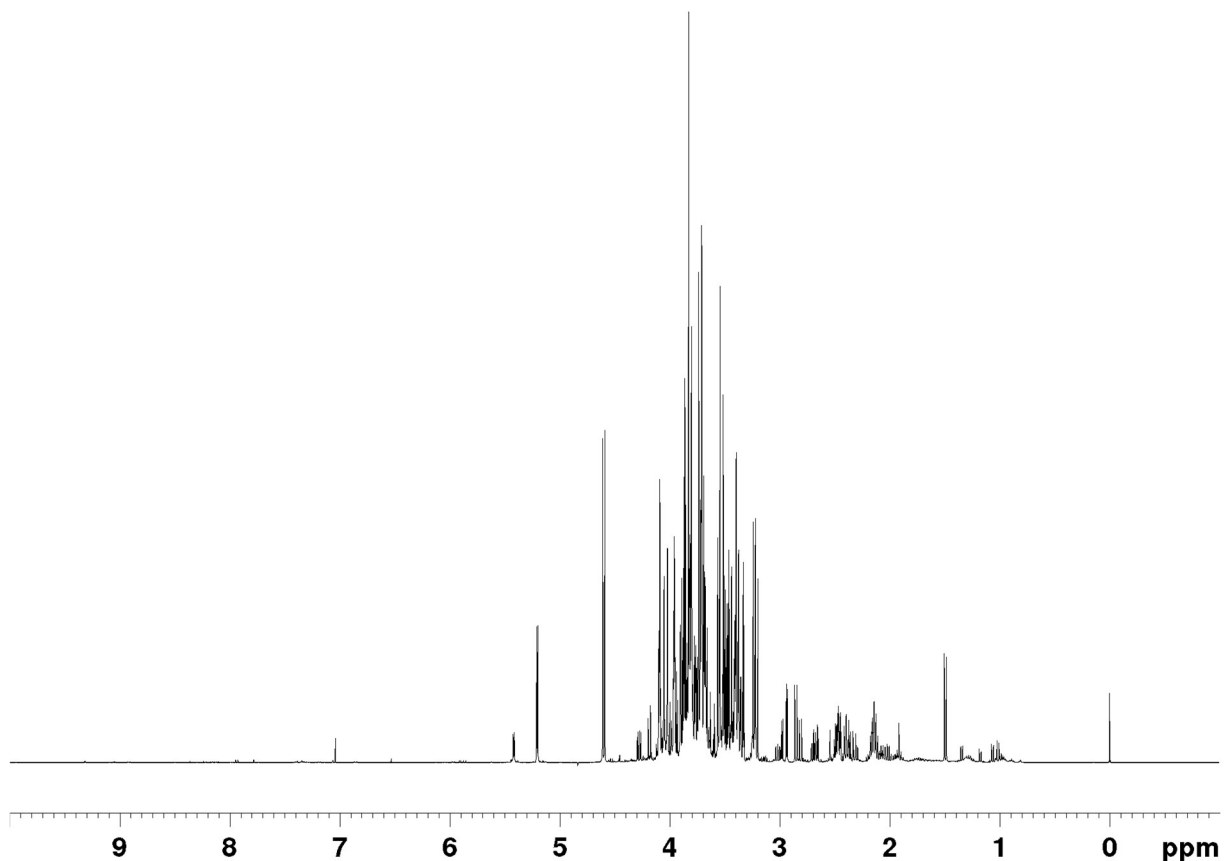


Abbildung 19: 1D-¹H-NOESY-Spektrum einer deutschen Spargelprobe (15-DE-RP-Sul-Gi-3); Anwendung der Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31)

Um eine Vorstellung über einen ungefähren Konzentrationsbereich zu erlangen, wurde die Konzentration der Saccharose mit Hilfe des Natriumtrimethylsilylpropionat-Signals bestimmt. Die Strukturformel des TMSP ist in Abbildung 20 dargestellt.

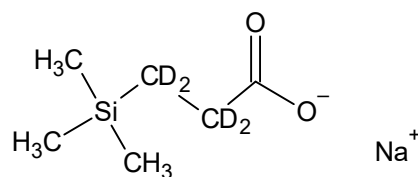


Abbildung 20: Strukturformel von Natriumtrimethylsilylpropionat (TMSP) (ChemSketch, 2020)

Das Integral 6 der bekannten TMSP-Konzentration (0.25 mM) kann auf die Integrale anderer enthaltener Komponenten bezogen und somit die Konzentration dieser Verbindungen bestimmt werden. Die Signale der einzelnen Saccharose-Protonen sind über einen breiten Frequenzbereich hinweg im Spektrum von etwa 3 ppm bis 6 ppm angesiedelt. Die größte Aussagekraft hinsichtlich einer Konzentrationsabschätzung haben jedoch diejenigen

5 Ergebnisse und Diskussion

Protonen, die von anderen störenden / überlappenden Signalen und auch vom Lösungsmittelsignal möglichst isoliert liegen. Die Basislinienbeeinträchtigung infolge der Lösungsmittelunterdrückung kann – wie in Punkt 3.3.1.1 erläutert – einen Einfluss auf die Intensität der benachbarten Signale besitzen. Daher wurde die Abschätzung der Saccharose-Konzentration anhand des Integrals 1 (Proton am α -anomeren C1 der Glucopyranose) bei etwa 5.41 ppm vorgenommen. Die Werte der Integrale sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Integrale der Saccharose- und TMSP-Signale eines 1D-¹H-NOESY-Spektrums einer deutschen Spargelprobe (15-DE-RP-Sul-Gi-3)

Objekt	Integral [abs]	Integral [rel]	ν (F1) [ppm]
Integral 1	27,760,270.75	25.1934	5.4078
Integral 6	9,916,995.31	9.0000	0.0015

Die Berechnung erfolgt mit Hilfe der Formel 1; in Tabelle 4 sind alle verwendeten Größen erläutert:

Formel 1: Berechnung der Analytkonzentration anhand des TMSP-Referenzsignals im Extrakt

$$C_{\text{Analyt/Ex}} = C_{\text{TMSP/Ex}} / N_{\text{H/TMSP}} \cdot N_{\text{H/Analyt}}$$

Tabelle 4: Erläuterung der Größen aus Formel 1

Variable	Einheit	Beschreibung
$C_{\text{Analyt/Ex}}$	mM	Konzentration des zu quantifizierenden Analyten im Extrakt
$C_{\text{Sac/Ex}}$		Saccharose-Konzentration im Extrakt
$C_{\text{TMSP/Ex}}$	mM	TMSP-Konzentration im Extrakt = 0.25 mM
$N_{\text{H/TMSP}}$	-	Integral 6 von TMSP (auf 9 referenziert, da 9 Protonen)
$N_{\text{H/Analyt}}$	-	Integral 1 des Analyten

Berechnung der Saccharose-Konzentration im Extrakt nach Formel 1:

$$C_{\text{Sac/Ex}} = 0.25 \text{ mM} / 9 \cdot 25.1934 = 0.7 \text{ mM}$$

Die Konzentration von Saccharose im Extrakt beträgt etwa 0.7 mM, gemessen am Integral 1. Um einen prozentualen Gehalt in den eingewogenen 75 mg Spargellyophilisat abschätzen zu können, ist das Volumen von 1.5 mL zu berücksichtigen und die molare Masse einzurechnen – siehe hierzu Formel 2 sowie Tabelle 5:

5 Ergebnisse und Diskussion

Formel 2: Berechnung des Saccharose-Gehalts im Spargellyophilisat

$$G_{\text{Sac/Lyo}} = C_{\text{Sac/Ex}} \cdot V_{\text{Ex}} \cdot M_{\text{Sac}} \cdot 100 / \text{EW}$$

Tabelle 5: Erläuterung der Größen aus Formel 2

Variable	Einheit	Beschreibung
$G_{\text{Sac/Lyo}}$	%	Prozentualer Massenanteil Saccharose im Spargellyophilisat
$C_{\text{Sac/Ex}}$	M bzw. mol/L	Saccharose-Konzentration im Extrakt = 0.0007 mol/L
V_{Ex}	L	Volumen des Extraktes = 0.0015 L
M_{Sac}	g/mol	Molare Masse von Saccharose = 342.30 g/mol
EW	g	Einwaage = 0.075 g

Berechnung des Saccharose-Gehalts im Spargellyophilisat nach Formel 2:

$$G_{\text{Sac/Lyo}} = 0.0007 \text{ mol/L} \cdot 0.0015 \text{ L} \cdot 342.3 \text{ g/mol} \cdot 100 \text{ g} / 0.075 \text{ g} = 0.48 \%$$

Der Gehalt an Saccharose im Lyophilisat beträgt laut Berechnung mit Hilfe des Integrals 1 0.48 %. Geht man von einer 70-90 %igen Wasserentfernung während der Gefriertrocknung aus, so ist ein Verdünnungsfaktor von 0.1-0.3 zu verwenden, um den Gehalt im unbehandelten Spargel zu ermitteln. Das heißt der Saccharose-Gehalt ist auf (0.05-0.14) % im Spargel zu schätzen. In der Literatur sind Werte von Saccharose in weißem Spargel von 0.24 % zu finden (Souci *et al.*, 2008).

Der errechnete Wert stellt bei der verwendeten Extraktionsmethode (polar-mittelpolar) und der halbquantitativen Gehaltsbestimmung mittels NMR-Spektroskopie ein als realistisch zu bewertendes Ergebnis dar. Es liefert einen Anhaltspunkt für den Aussagegehalt und die Funktionstauglichkeit der Mess- und Quantifizierungsmethode. Diese Erkenntnis ist von großer Relevanz für die nachfolgenden Schritte der Methodenentwicklung, Probenvermessung und statistischen Auswertung. Sowohl aufgrund der Vielfältigkeit der metabolischen Substanzklassen, als auch wegen der leichten Veränderlichkeit des Metaboloms wird klar, von welcher Wichtigkeit eine vertrauenswürdige Messmethode, aber auch die sensible Handhabung der Proben ist. Die Behandlung der Proben (Probenakquise, -vorbereitung, -aufarbeitung) ist maßgeblich verantwortlich für den Erfolg des Gesamtergebnisses. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte von der Probenahme bis hin zur Messung sowie verschiedene weitere Untersuchungen zur Methodenentwicklung erläutert und diskutiert.

5.1 Methodenentwicklung

Die Güte der Untersuchungsmethode zur Herkunftsbestimmung von weißem Spargel mittels NMR-Spektroskopie wird hauptsächlich von drei Aspekten bestimmt: Zum einen von dem Maß destruktiver Einflüsse, wie z. B. Temperatureinwirkungen, Lagerungsdauer oder Eintrag von Kontaminationen, auf das sensible Metabolom, zum anderen von der Qualität der Daten bei der chemischen und statistischen Analyse; und schließlich von der logistischen Durchführbarkeit (Kosten-, Zeitaufwand bei hohem Probendurchsatz). Die Resultate der Untersuchungen sind in den folgenden Abschnitten erläutert.

5.1.1 Probenahme

Die Probenahme bei einer *Metabolomics*-basierten Herkunftsbestimmung pflanzlicher Produkte spielt eine wichtige Rolle, da bei diesem Schritt noch große Veränderungen in der Zusammensetzung der Stoffwechselprodukte eintreten können. Bei der Ernte der Sprosse werden Zellen zerstört, wodurch es zur Enzymfreisetzung und somit zur möglichen Umsetzung der Metabolite kommen kann. Auch eine erhöhte Temperatur kann die zersetzenden Zellprozesse begünstigen, da die Enzymaktivität mit steigender Temperatur heraufgesetzt wird. Daher sollten die Proben sobald wie möglich nach dem Stechen gekühlt werden, um die Stoffwechselaktivitäten zu unterbinden. Ein authentisches metabolisches Profil der Spargelproben kann nur gewährleistet werden, wenn die Bedingungen zur Behandlung der Proben möglichst konform zur Marktsituation gewählt werden.

5.1.1.1 Deutsche Proben

Für die deutschen Proben stellt die Beschaffung authentischen Probenmaterials aus logistischer Sicht keine Probleme dar. Die Spargelproben müssen hierzu direkt vor Ort von den landwirtschaftlichen Erzeugerbetrieben bezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 218 deutsche Spargelproben innerhalb der Jahre 2014 bis 2016 in 13 unterschiedlichen Spargelanbaugebieten an jeweils drei produzierenden Höfen gesammelt. Die Wahl der Anbauregionen richtete sich nach der Führung des Siegels „geschützte geographische Angabe“, dem jährlichen Ertrag und der Anbaufläche (siehe Punkt 2.1 und Punkt 3.1.4). Folgende Regionen wurden demnach beprobt: Nord-Baden-Württemberg (BWN) und Süd-Baden-Württemberg (BWS), Abensberg (BYAb), Schrobenhausen (BYSr), Franken (BYFr), Brandenburg (BB), Süd-Hessen (HE),

5 Ergebnisse und Diskussion

Niedersachsen (NI), Bornheim (NWBo), Walbeck (NWWa), Nordrhein-Westfalen (NW), Rheinland-Pfalz (RP) und Schleswig-Holstein (SH).

Waschprozess und Lagerung während des Transports

Um möglichst wenig Zeit nach dem Stechen des Spargels und der damit einhergehenden Zellzerstörung verstreichen zu lassen, wurde der Probenahmeschritt im Jahr 2014 noch direkt am Feld durchgeführt. Der oft noch sehr verschmutzte Spargel wurde sodann mit einer eindeutigen Etikettierung verpackt und direkt im Tiefkühltransporter bei -20 °C eingefroren. Es besteht der Verdacht, dass die Zellen bedingt durch den langsamen Gefrierprozess bei -20 °C im Transporter und der damit verbundenen Bildung großer Eiskristalle zerstört wurden und möglicherweise schon degenerative Zellprozesse begonnen haben.

Die Proben mussten während der Probenvorbereitung gründlich gewaschen werden. Dies erwies sich als unvorteilhaft, da die Erde, insbesondere der feine Sand, oft tief in die Fasern der Pflanze eingedrungen war und die Sprosse durch den erhöhten Zeitaufwand Gefahr liefen, aufzutauen. Diese Probleme sollten in den folgenden Jahren behoben werden.

Die Erfahrungen aus dem Erntejahr 2014 bezüglich der schlechten Reinigung der oft verschmutzten Spargelproben führten dazu, dass für die Jahre 2015 und 2016 möglichst jede Probe vor der Lagerung im Transporter gründlich gewaschen wurde. Somit konnte der spätere Probenvorbereitungsschritt erheblich vereinfacht werden. Für einen derartigen Feinwaschprozess der Spargelprobe(n) im Betrieb der Anbauer war es notwendig, den Arbeitsfluss zu unterbrechen, da der Spargel üblicherweise von allen Feldern eines Betriebes zusammen in die Maschinen eingebracht wird. Somit wäre es zu einer Vermischung der Sorten und Standorte gekommen. Im Jahr 2015 wurden alle Proben, die nicht direkt nach der Ernte gewaschen werden konnten, vor dem Einfrieren in den Laboratorien der Universität Hamburg gewaschen. Zur Vermeidung der Arbeitsunterbrechung im Betrieb wurde für das Jahr 2016 eine große, wasserdicht verschließbare Waschwanne mitgeführt, sodass die Probenehmer die Proben vor Ort in der Wanne waschen konnten, bevor sie verpackt wurden. Die Lagerung des Spargels erfolgte sodann im Kühltransporter bei 2 °C auf Scherbeneis in Plastikkisten mit eindeutiger Etikettierung, wie es auch bei handelsüblicher Ware aus dem In- und Ausland der Fall ist.

Um die Eiskristallbildung während des langsamen Einfrierens zu umgehen, wurden die bei 2 °C gelagerten Proben zunächst in den Laboratorien der Universität Hamburg in flüssigem Stickstoff (-196 °C) schockgefroren, bevor sie in Tiefkühltruhen langfristig gelagert wurden.

Probenspektrum

Während im Erntejahr 2014 von jedem der 39 Höfe mit wenigen Ausnahmen je nur eine Probe bezogen wurde, sollte das Probenspektrum für die kommenden Jahrgänge stark ausgeweitet werden, um möglichst viele verschiedene Sorten von einem Standort zu erhalten. Aufgrund der großen Diversität der angebauten Sorten, galt es, sich auf bestimmte Sorten für die Probenahme zu beschränken. Für dieses Forschungsprojekt wurden ab dem Jahrgang 2015 vier Spargelsorten ausgewählt, welche sowohl die gesamte Saison abdecken, gute Erträge erzielen, daher häufig angebaut werden und sich durch ihre hohe Beliebtheit bei den Verbrauchern/innen auszeichnen. Die vier Sorten *Gijnlim*, *Backlim*, *Grolim* und *Cumulus* wurden im Rahmen dieser Arbeit standardmäßig beprobt, sofern sie vorhanden waren. Wurden diese Sorten vom Spargelerzeugerbetrieb nicht angebaut, so wurden auch andere Sorten, wie *Avalim*, *Herkolim*, *Rafaelo*, *Ramada*, *Ramires*, *Rapsody* oder *Ravel* verwendet. (Strobl, 2015)

Probenahmezeitraum

Der Zeitraum für die Probenerfassung eignet sich erfahrungsgemäß am besten in den letzten zwei Maiwochen, da hier noch alle für das Projekt interessanten Sorten verfügbar sind und somit ein möglichst großes Probenspektrum abgedeckt werden kann.

In diesem Zuge wurde für den Probenahmejahrgang 2015 der Versuch unternommen, einen möglichen Unterschied im Metabolom aufgrund des Erntezeitpunktes innerhalb einer Ernteperiode ausfindig zu machen. Hierzu wurde vier Mal im dreiwöchigen Rhythmus eine *Gynlim*-Probe von einem Landwirt aus Schleswig-Holstein eingeholt (15-DE-SH-Saf-Gi-X). Dieses Experiment diente der Berücksichtigung von kürzerfristig wirksamen, externen Einflüssen wie z.B. den klimatischen Schwankungen, der Bodentemperatur oder dem Wuchsverhalten der Pflanze über die Ernteperiode hinweg. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind unter Punkt 5.2.1.4 nachzusehen.

5.1.1.2 Ausländische Proben

Im Gegensatz zur Vor-Ort-Probenahme in Deutschland stellten sich die Probenahmen ausländischer Spargelproben als schwieriger heraus. Aufgrund des großen Aufwands und der hohen Kosten, welche bei der Beschaffung authentischen Probenmaterials vor Ort entstanden wären, wurden die Proben zum größten Teil im Groß- und Einzelhandel in Deutschland, hauptsächlich in Hamburg, kommerziell erworben.

Es wurden Proben aus den Ländern Polen, den Niederlanden, Spanien, Griechenland und Peru zur Untersuchung herangezogen. Die meisten Proben aus Polen und den Niederlanden

5 Ergebnisse und Diskussion

konnten, aufgrund der örtlichen Nähe und einer zusätzlichen Tour durch die Nachbarländer im Rahmen der Probenahmetour, direkt vom Hof bezogen werden. Die Authentizität der übrigen ausländischen Proben lässt sich ausschließlich über die Deklaration auf den Handelsetiketten belegen. Eine Sorteninformation oder weitere Metadaten konnten oft nicht erlangt werden.

Nach Erwerb der Proben wurden sie in Styroporboxen auf Scherbeneis gekühlt und zum Schockgefrieren und Langzeitlagern bei -20 °C in die Laboratorien der Universität Hamburg transportiert. Eine Vorreinigung der meist verkaufsfertigen Proben ist nicht nötig gewesen.

Der Zeitraum der Probenahme richtete sich jeweils nach den entsprechenden Importzeiten des Herkunftslandes, weshalb die Proben hauptsächlich im Frühjahr, während der deutschen Spargelsaison oder zum Jahresende (Import peruanischen Spargels) akquiriert worden sind.

5.1.2 Probenvorbereitung

Bevor die Spargelproben im Labor aufgearbeitet und analytisch vermessen werden können, muss eine Probenvorbereitung erfolgen, um den Zustand des metabolischen Profils der Proben mit den zur Verfügung stehenden Mitteln bestmöglich zu erhalten. Das Metabolom ist maßgeblich abhängig von den enzymatischen Aktivitäten eines Organismus. Die Stoffwechselverbindungen können durch freiwerdende, aktive Enzyme umgesetzt werden. Die Enzymaktivität wiederum ist stets von der Umgebungstemperatur abhängig. Aber auch Mikroorganismen, welche noch auf dem Probenmaterial haften, können bedingt durch geeignete Temperaturen und bei einer entsprechenden Menge verfügbaren Wassers (a_w -Wert) die Metabolite verstoffwechseln. Um das Metabolom des wässrigen und somit sehr anfälligen Produktes möglichst in seiner ursprünglichen Form beizubehalten, als auch zur Standardisierung aller Proben, wurde der Spargel zunächst lyophilisiert, das heißt gefriergetrocknet. Der Gefrietrocknung ist ein Wasch- und Mahlprozess voranzustellen, sodass ein repräsentatives Aliquot der homogenisierten Probe entnommen werden kann.

Erntejahr 2014

Nach der Probenahme (Punkt 5.1.1) im Jahr 2014 wurden die deutschen Proben in den Tiefkühltruhen in den Laboratorien im Institut für Lebensmittelchemie an der Universität Hamburg bis zur Probenaufarbeitung gelagert. Der Spargel wurde zur Probenvorbereitung zunächst in Flüssigstickstoff tiefgefroren, da auf diese Weise eine ausreichende Ausgangskälte erreicht wurde. Dieser Schritt diente dazu, dass die Stangen bei dem folgenden Waschprozess nicht auftauten. Der anschließende Waschprozess im Eisbad lässt eine Eisschicht um die sehr kalte Oberfläche des Spargels bilden, welche sodann samt einem Großteil der Verschmutzungen entfernt werden konnte. Die Waschmethode birgt den Vorteil,

5 Ergebnisse und Diskussion

dass die Proben während der Säuberung weiterhin kalt gehalten und dabei einer verhältnismäßig guten Reinigung unterzogen werden konnten. Der Nachteil besteht im großen zeitlichen Aufwand durch den Vorfrierprozess im Stickstoffbad und darin, dass die Proben noch geringe Mengen an Sand tief im Gewebe aufwiesen. Anhaftender Schmutz würde das Trockengewicht (also nach der Gefriertrocknung) erhöhen und somit den organischen Anteil und die Metabolite im Verhältnis reduzieren. Die Entfernung der Restverunreinigungen wäre nur in Verbindung mit einer weiteren Behandlung bei Raumtemperatur und der Beschädigung der Proben möglich. Dies galt es zu vermeiden, weshalb die Handhabung in den Jahren 2015 und 2016 geändert werden musste.

Nach dem Wasch- und Mahlvorgang, welcher zur fortwährenden Kühlung in einer 50:50-Mischung mit Trockeneis durchgeführt wurde, folgte die Gefriertrocknung einer Teilmenge (60 g) jeder Probe. Ein Filter zwischen dem Rundkolben und dem Stutzen des Trockenrechens verhinderte die Kontamination der Proben und der Gefriertrocknungsanlage beim Ziehen und Belüften des Vakuums. Zur Gewährleistung eines möglichst vollständigen Feuchtigkeitsentzugs musste während des Gefriertrocknungsprozesses nach 48 h umgerührt werden, sodass sich das Probenmaterial auflockerte. Nach insgesamt 72 h waren die Proben getrocknet und wurden mit einem Mörser und Pistill nochmals vermahlen. Zur Wahl der Gefriertrocknungsdauer soll unter Punkt 5.1.2.1 genauer berichtet werden. Die Lyophilisate wurden in Probengefäße (50 mL, Sarstedt AG & Co.) umgefüllt und zur längeren Haltbarkeit und zum Schutze vor Feuchtigkeit, in verschließbaren Plastiktüten gesammelt, in Tiefkühltruhen gelagert.

Erntejahre 2015 und 2016

Aufgrund der Erfahrungen aus dem Erntejahr 2014 bezüglich der schlechten Reinigung der Spargelproben wurden diese in den Jahren 2015 und 2016 während der Probenahme direkt gewaschen. Der Transport erfolgte nicht mehr bei -20 °C, sondern bei 2 °C auf Scherbeneis, da dies den handelsüblichen Transportbedingungen entspricht.

Nach Beendigung der Probenahmetour, dem Schockgefrieren und Einlagern des Spargels in Tiefkühltruhen in der Universität Hamburg musste er aufgrund des Vorwaschens während der Probenahme später im Probenaufarbeitungsprozess nur noch mit 5 °C kaltem, destilliertem Wasser rasch gespült werden. Dabei wurden alle sichtbaren Verunreinigungen vollständig entfernt sowie der im Jahr 2014 durch das Stickstoffbad bedingte Auftauprozess und die damit verbundene Verzögerung umgangen.

Alle Erntejahrgänge

Zur graphischen Veranschaulichung möglicher Unterschiede zwischen den Proben der drei Erntejahrgänge 2014, 2015 und 2016 wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. In Abbildung 21 sind alle deutschen Proben aus den drei Erntejahrgängen aufgetragen.

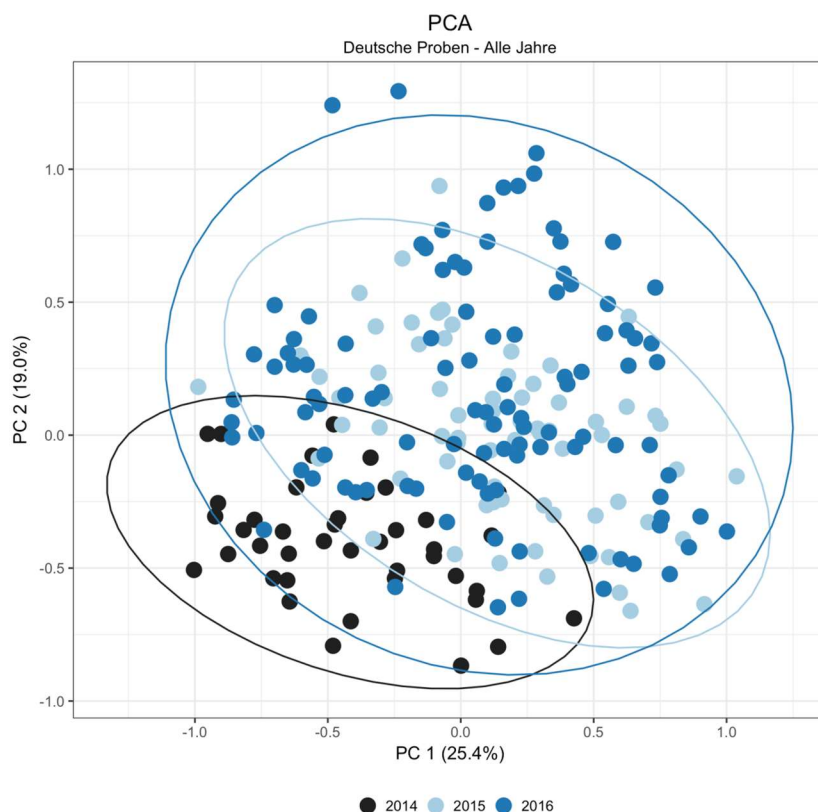


Abbildung 21: Zweidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2: deutsche Spargelproben aller drei Jahrgänge 2014 (schwarz), 2015 (hellblau) und 2016 (dunkelblau)

Dass sich ein Unterschied im metabolischen Profil der Spargelproben aus dem Jahr 2014 und den Jahren 2015 und 2016 bemerkbar machen würde, war zu erwarten. Diese Vermutung konnte anhand der Hauptkomponentenanalyse klar bestätigt werden. Es ist eindeutig zu sehen, dass sich die Proben aus dem Jahr 2014 von denen aus 2015 und 2016 abgrenzen. Dies mag in der abweichenden Lagerung und den Lagerungsbedingungen während der Probenahmetour im Jahr 2014 begründet sein. Hier wurden die Proben erntefrisch und größtenteils ungewaschen direkt bei -20 °C im Tiefkühltransporter eingefroren und später in den Laboratorien der Universität Hamburg bei derselben Temperatur aufbewahrt. Die Proben aus den Jahren 2015 und 2016 hingegen wurden, um möglichst authentisch an der Marktsituation zu arbeiten, bei 2 °C auf Scherbeneis transportiert. Die Metabolitzusammensetzungen der Proben haben sich mit hoher Wahrscheinlichkeit aus diesem Grund verändert, was sich im Spektrum und somit in der statistischen Auswertung widerspiegelt.

5 Ergebnisse und Diskussion

Möglich für eine Metabolomänderung wären aber auch unterschiedliche Wetterverhältnisse oder eine verfrühte oder verspätete Erntesaison zwischen den jeweiligen Jahren.

Dass einige Proben aus dem Jahrgang 2016 einen Bereich in der PCA ausfüllen, in dem die Proben aus dem Jahr 2015 nicht vorkommen, ist nicht zwangsläufig als Abweichung zu interpretieren. Bei diesen Proben handelt es sich zu ca. 80 % um Proben, welche aus dem Jahr 2015 nicht zur Messung zur Verfügung standen. Die Analyseergebnisse dieser Probenäquivalente aus den Erntejahren 2017 und 2018 im Vergleich zu den hier dargestellten Ergebnissen sind entsprechend abzuwarten.

Ausländische Spargelproben

Alle ausländischen Spargelproben wurden gemäß der Probenvorbereitungsmethode aus den Jahren 2015 und 2016 behandelt. Die SOP ist unter Punkt 7.2.2 in Tabelle 25 nachzulesen.

Die Probenahme- und Probenvorbereitungsmethode von weißem Spargel aus Deutschland und dem Ausland wurden im Laufe der drei Erntejahre 2014 bis 2016 fortwährend weiterentwickelt, sodass das Projekt in den folgenden Jahrgängen 2017 und 2018 von diesen optimierten Methoden profitierte.

5.1.2.1 Statistische Auswertung zur Untersuchung der Gefriertrocknungsdauer

Spargel ist ein stark wasserhaltiges Lebensmittel (95 %). Bei dem Mahlprozess während der Probenvorbereitung kommt es zur Zellzerstörung und somit auch zur Freisetzung von Proteinen und Enzymen aus den jeweiligen Zellen. Die Stoffwechselverbindungen der zerstörten Zellen werden von den Enzymen umgesetzt und abgebaut. Die Folge ist die Entstehung eines verfälschten Metabolitprofils des Organismus (Fingerabdruck). Daher ist es notwendig, den Zellen spätestens nach dem Vermahlen der Proben in der Kälte, das Wasser zu entziehen. So können die Zellprozesse auf ein Minimum reduziert werden.

Auch der Wasseranteil jeder Probe kann ein wenig variieren, was eine Verschiebung in der absoluten Konzentration der Metabolite hervorrufen würde. Wird der Probe das Wasser bis auf einen sehr geringen, einheitlichen Anteil entzogen, so führt dies zur Standardisierung der Proben und zur besseren Vergleichbarkeit. Die Proben können im getrockneten Zustand länger gelagert und äußeren Temperatureinflüssen gegenüber unempfindlicher behandelt werden. Aus diesen Gründen ist eine der Extraktion vorgeschaltete, ausreichend lange Gefriertrocknung des sehr fein vermahlenden Probenmaterials notwendig. Die Länge der Gefriertrocknungszeit, welche als „ausreichend“ anzusehen ist, muss zuvor ermittelt werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

Ausgangspunkt zur Optimierung der Trocknungsmethode im Rahmen der Probenvorbereitung für Spargel war die Herangehensweise aus einer vorangegangenen Forschungsarbeit: In dieser Arbeit wurde das Chloroplastengenom von Kakaoblättern sequenziert, welche hierfür ebenfalls zunächst lyophilisiert werden mussten. Das Probenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zermahlen und sodann an einer Gefriertrocknungsanlage mit Trockenrechen für 30 Stunden getrocknet (Herrmann, 2015). Mit Bezug auf den Rohstoff Spargel war diese Vorgehensweise nur teilweise möglich, da ein händisches Zermahlen aufgrund der großen Probenmengen und des hohen Wasser- bzw. Eisanteils praktisch unmöglich ist. Die Vermahlung mittels Messermühle zur Zerkleinerung des Probenmaterials erwies sich als die Methode der Wahl.

Bezüglich der Gefriertrocknung soll in diesem Versuch der Grad der „ausreichenden Trocknung“ ermittelt werden. Ziel dabei ist, dass die Restfeuchtigkeit des Lyophilisates in der darauffolgenden Aufarbeitung keine Auswirkungen auf das Metabolom und darüber hinaus auch nicht auf die statistische Auswertung besitzt. Um sowohl ein möglichst trockenes Produkt zu erhalten, als auch gleichzeitig einen zügigen Probenvorbereitungsprozess zu gewährleisten, wurden verschiedene Trocknungsmethoden (Tabelle 26) überprüft.

Die Proben wurden entsprechend der Tabelle 26 in Punkt 7.2.2.1 unterschiedlich lang lyophilisiert. Die Zeiten reichen von 48 Stunden bis hin zu 96 Stunden. Alle Probenreihen mit Trocknungszeiten zwischen 48 und 96 Stunden sind in der PCA in Abbildung 22 aufgetragen.

Dieser Versuch wurde lediglich mit der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) durchgeführt. Grund hierfür ist die zeitliche Abfolge der jeweiligen Versuche, d. h. die Entwicklung der Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) wurde erst nach der Untersuchung der Gefriertrocknungsmethoden durchgeführt. Es sollte davon auszugehen sein, dass die Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) aufgrund der guten Metabolomstabilität, wie aus den Punkten 5.1.4 und 6.2.8 deutlich hervorgeht, keine weiteren Fehlerquellen als die vorherige Methode birgt und deshalb die Aussage der Ergebnisse transferierbar ist.

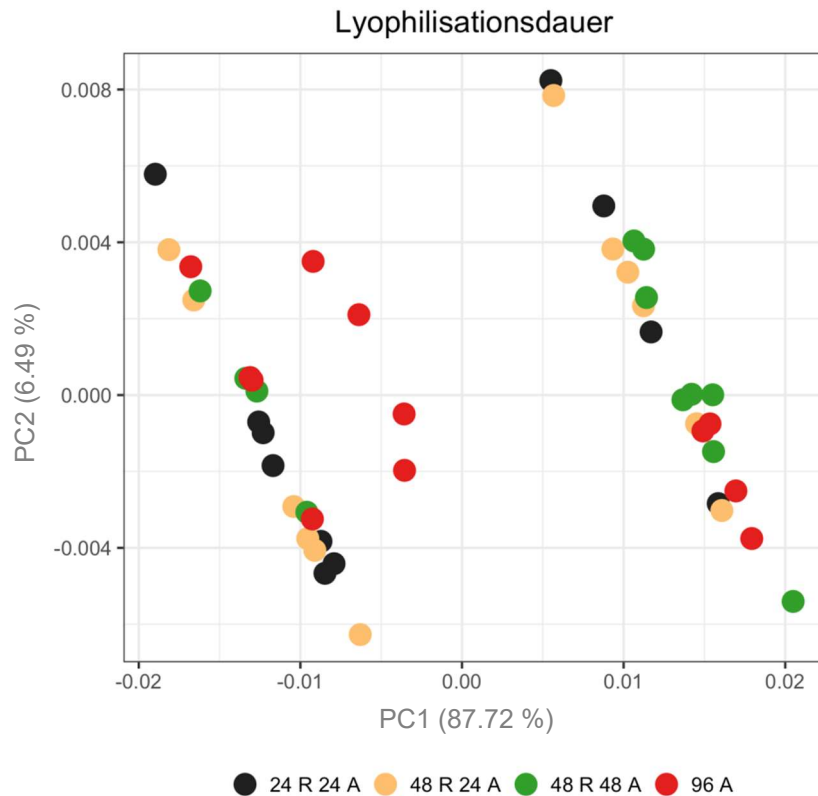


Abbildung 22: Zweidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2: Bestimmung der optimalen Gefriertrocknungsdauer des Spargels („24 R 24 A“ = schwarz; „48 R 24 A“ = blau; „48 R 48 A“ = grün; „96 A“ = rot). Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung angefertigt

Zunächst erweckt die PCA den Anschein, als würde eine Trennung der Proben in zwei Gruppen existieren. Betrachtet man den Maßstab (PC1 (-0.02) – 0.02; PC2 (-0.007) – 0.008), in dem die Proben variieren, wird klar, dass kaum Varianzen vorhanden sind (Vergleich siehe PCAs deutscher und ausländischer Spargelproben unter Punkt 5.2.2). Weiterhin ist ersichtlich, dass die Proben der verschiedenen Gefriertrocknungsmethoden in beiden Clusterwolken stark streuen. Es existiert kein Zusammenhang diesbezüglich und es kann daher auch keine Aussage darüber abgeleitet werden, welche der Methoden besser geeignet ist, d. h. welche Proben einer Methode am reproduzierbarsten in der PCA erscheinen. Auch kann keine Wertung über die Güte einer Position am Trockenrechen vorgenommen werden.

Somit kann festgehalten werden, dass die betrachteten Gefriertrocknungszeiten keinen Einfluss auf die statistische Auftragung der Proben besitzen. Die Probenreihe, welche insgesamt nur 48 Stunden lang lyophilisiert wurde, zeigte beim Abnehmen der Proben, dass die Masse aufgrund ihrer breiigen Konsistenz noch einen gewissen Wasseranteil aufwies; dieser Wasseranteil wurde nicht bestimmt, da die teigige Konsistenz bereits darauf schließen ließ, dass er zu hoch war. Diese Versuchsreihe wurde daher von der Option, sie für die endgültige Aufarbeitungsmethode zu verwenden, ausgeschlossen. Alle anderen drei

5 Ergebnisse und Diskussion

Methoden lieferten sehr ähnliche Beschaffenheitsmerkmale des Lyophilisates: feinkörniges, trockenes, mittelgelbes Pulver.

Da entsprechend keine statistischen Daten für die Auswahl einer Methode herangezogen werden können, fiel die Entscheidung auf die Zeit- und Wirksamkeits-effizienteste Trocknungsmethode „48 R 24 A“. In dieser Methode wird sowohl durch den Rührschritt nach 48 Stunden die Möglichkeit eingeschlossener Feuchtigkeit aufgrund von Klümpchenbildung umgangen, als auch eine ausreichende Trocknung bei möglichst geringem Zeitaufwand erreicht.

5.1.3 Probenaufarbeitung

Nachdem die Spargelproben von den Höfen der Landwirte/innen oder – im Falle der ausländischen Proben – aus dem Groß- und Einzelhandel akquiriert, gewaschen und lyophilisiert wurden, folgt nun die Probenaufarbeitung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Aufarbeitungsmethoden angewandt. Zunächst wurde die Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30), welche aus einer bereits etablierten Extraktionsmethode zur Aufarbeitung verschiedener Biofluide im *Metabolomics*-Bereich hervorging, angewandt (Le Gall *et al.*, 2003; Fatma *et al.*, 2012; Mannina *et al.*, 2012; Beckonert *et al.*, 2007; Consonni *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2008; Meiss *et al.*, 2016; Werner *et al.*, 2017). Im Verlauf der Untersuchungen wurde diese Methode aufgrund verschiedener Nachteile abgewandelt, woraus die Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) entstand.

Für einige Vorversuche (z. B. Punkt 5.1.2.1 und zum Teil Punkt 5.1.4) wurde die Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) verwendet; im späteren Verlauf der Arbeit, zur Vermessung der Spargelproben im Zuge der Proteingehaltsbestimmung sowie zur Herkunftsbestimmung (Punkt 5.1.5 und Punkt 5.2) wurde die Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) angewandt. Für jede Aufarbeitungsmethode wurde eine Metabolomstabilitätsuntersuchung (Punkt 5.1.4) angestellt.

Im Wesentlichen unterscheiden sich die Methoden hinsichtlich des Extraktionsmittels, der Methode zur Lösungsmittelentfernung und bezüglich des Puffersystems. Im Folgenden werden die jeweiligen Methoden, deren Vor- und Nachteile sowie die Methodenentwicklungsschritte hinsichtlich der Bestimmung eines geeigneten Extraktionsmittels und Puffersystems ausgehend von Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) hin zur Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) erläutert und diskutiert.

5.1.3.1 Vorgehensweise für die Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3)

Nach der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) wurde der lyophilisierte Spargel mit undeutertem Methanol extrahiert, dieses anschließend mittels Stickstoffstrom entfernt und der Extrakt schließlich in einem Natriumhydrogenphosphatpuffer aufgenommen, bevor die Lösung zentrifugiert und der Überstand zur Messung eingesetzt wurde. Anhand dieser Methode wurden verschiedene Parameter im Rahmen der Methodenentwicklung optimiert. Die entsprechenden Methodenentwicklungsschritte seien im Folgenden genauer erläutert.

5.1.3.1.1 Wahl des Extraktionsmittels und der Trocknungsmethode

Um ein möglichst breites Spektrum des Metaboloms analytisch erfassen zu können, wurden verschiedene NMR-gängige Lösungsmittel im polaren bis mittelpolaren Bereich als Extraktionsmittel in Erwägung gezogen. Der Einsatz eines organischen Lösungsmittels ist notwendig, da die Proteine, welche die Metabolite in der Anwesenheit von Wasser umsetzen oder abbauen können, durch Fällung entfernt werden müssen. Daher ist der Aufnahme in einem Puffer ein Extraktionsschritt mit einem organischen Lösungsmittel voranzustellen.

Einige der Lösungsmittel, wie beispielsweise Ethanol, wurden zur Vermeidung mehrerer störender Lösungsmittelsignale ausgeschlossen. Andere wiederum sind für diese Anwendung mit einem recht hohen Probendurchsatz, insbesondere in deuterierter Form, zu kostenintensiv, wie beispielsweise im Falle des Acetonitrils. In der Literatur wurden oft Extraktionsgemische aus Methanol oder Acetonitril und einem Puffer hergestellt und zur Messung eingesetzt (Le Gall *et al.*, 2003; Fatma *et al.*, 2012; Mannina *et al.*, 2012), weshalb die Extraktionsgüte hierfür weiter untersucht werden sollte.

Die Extraktion des Spargellyophilisates mit Methanol, Acetonitril und Gemischen daraus wurde untersucht, um bestimmen zu können, bei welcher Zusammensetzung der größte Extraktionserfolg zu verzeichnen ist. Für diesen Versuch wurden alle Lösungsmittel aus Kostengründen undeutert eingesetzt, vor der NMR-spektroskopischen Messung mittels Gefriertrocknung entfernt und der Rückstand mit einem ~240 mM Natriumhydrogenphosphatpuffer versetzt (Tabelle 27 und Gruppe A). Es wurde wie in Punkt 7.2.3.2 vorgegangen. Die Extraktion wurde unter Verwendung einer Mischprobe zu Vorversuchszwecken nach Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) vorgenommen.

Des Weiteren wurden drei verschiedene Methoden zur Entfernung des Extraktionsmittels untersucht: Die Trocknung im Metallblockthermostat sowie die Gefriertrocknung am Trockenrechen und auf Tellereinsätzen. In der Abbildung 23, Abbildung 24, Abbildung 25,

5 Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 26 und Abbildung 27 sind die $1D\text{-}^1\text{H-NOESY}$ -Spektren der verschiedenen Methanol- und Acetonitril-Extrakte bei unterschiedlichen Trocknungsverfahren dargestellt.

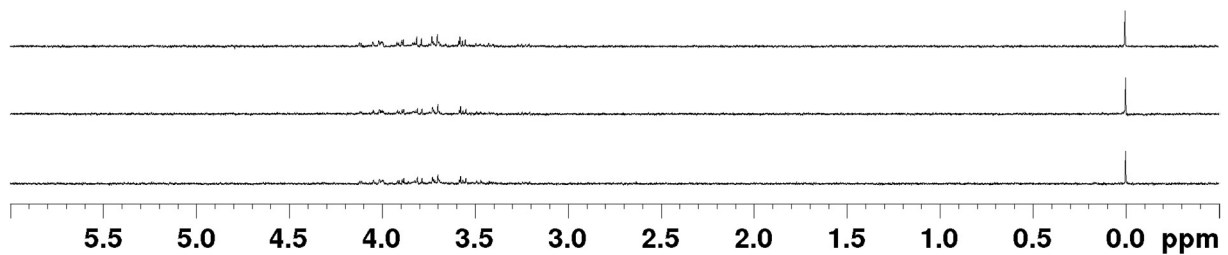


Abbildung 23: $1D\text{-}^1\text{H-NOESY}$ -Spektren der Spargeextrakte (aus einer Mischprobe) aus 100 % Acetonitril bei unterschiedlichen Trocknungsmethoden; von oben nach unten: Metallblockthermostat, Gefriertrocknungsanlage mit Tellereinsatz, Gefriertrocknungsanlage mit Trockenrechen

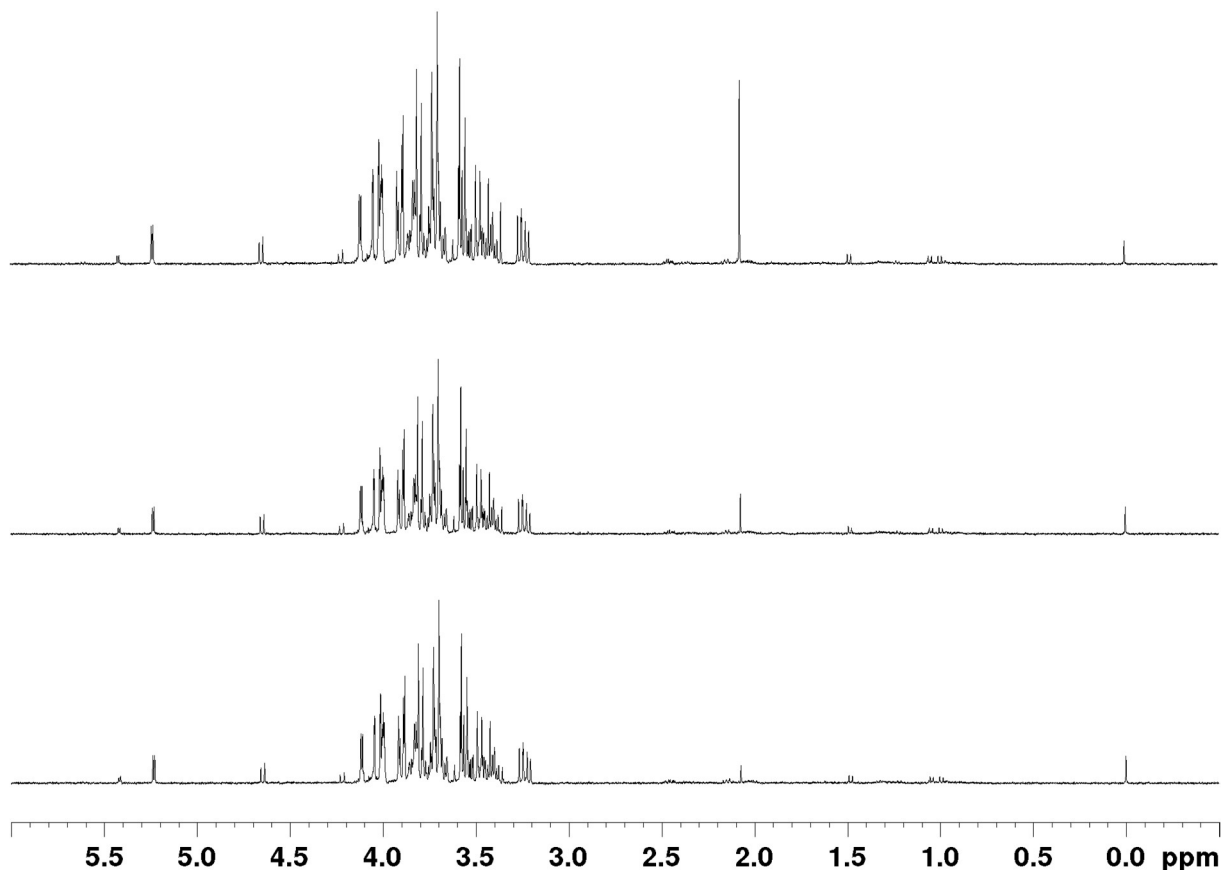


Abbildung 24: $1D\text{-}^1\text{H-NOESY}$ -Spektren der Spargeextrakte (aus einer Mischprobe) aus 66 % Acetonitril und 33 % Methanol bei unterschiedlichen Trocknungsmethoden; von oben nach unten: Metallblockthermostat, Gefriertrocknungsanlage mit Tellereinsatz, Gefriertrocknungsanlage mit Trockenrechen

5 Ergebnisse und Diskussion

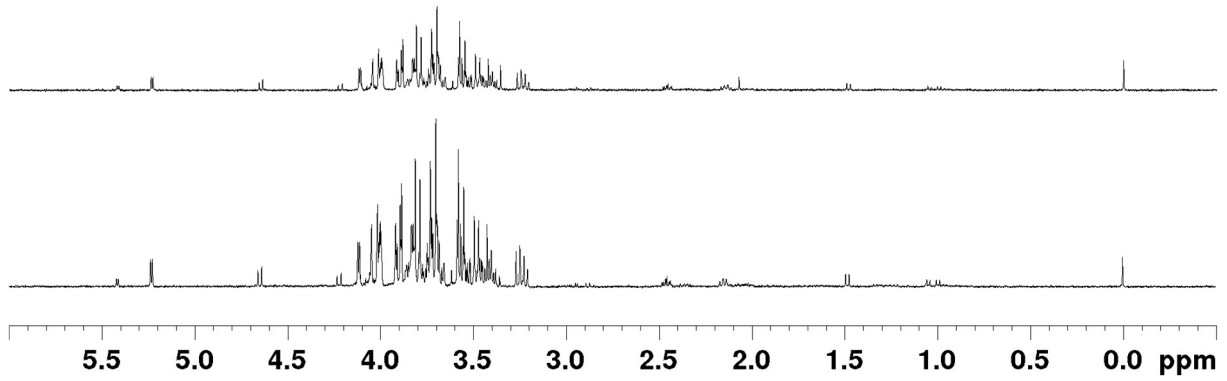


Abbildung 25: 1D-¹H-NOESY-Spektren der Spargelextrakte (aus einer Mischprobe) aus 50 % Acetonitril und 50 % Methanol bei unterschiedlichen Trocknungsmethoden; von oben nach unten: Gefriertrocknungsanlage mit Tellereinsatz, Gefriertrocknungsanlage mit Trockenrechen

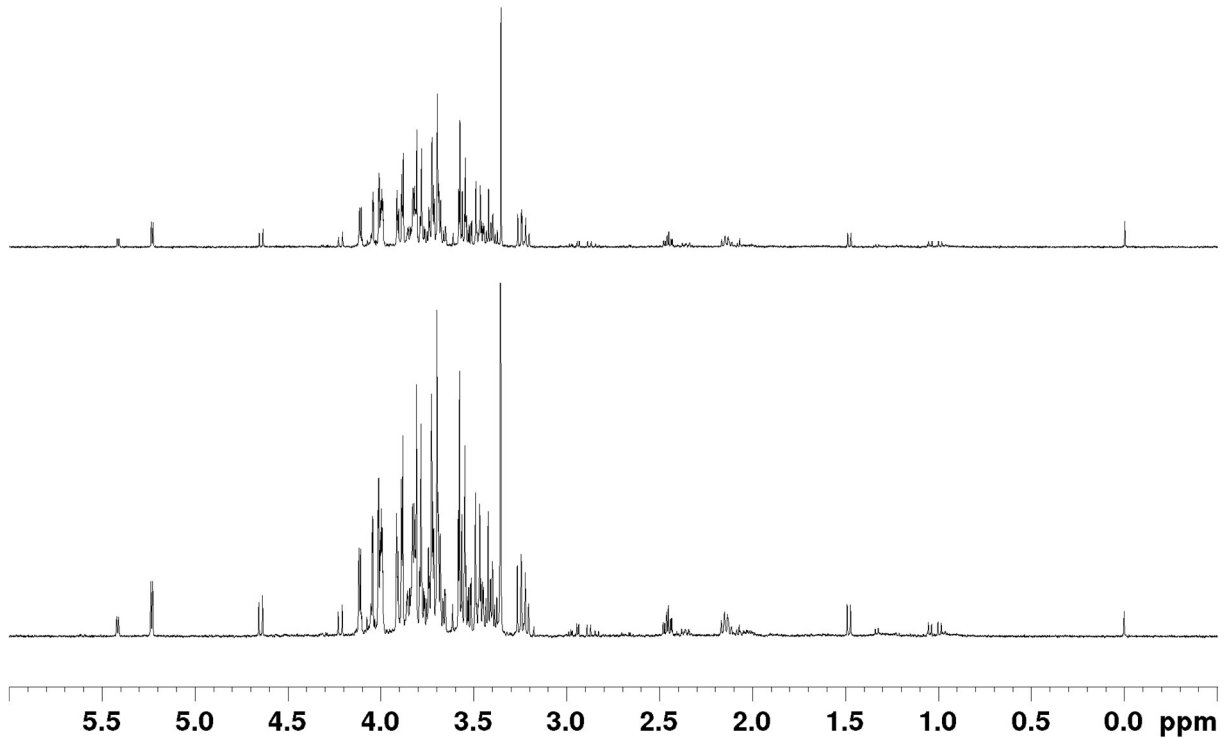


Abbildung 26: 1D-¹H-NOESY-Spektren der Spargelextrakte (aus einer Mischprobe) aus 33 % Acetonitril und 66 % Methanol bei unterschiedlichen Trocknungsmethoden; von oben nach unten: Gefriertrocknungsanlage mit Tellereinsatz, Gefriertrocknungsanlage mit Trockenrechen

5 Ergebnisse und Diskussion

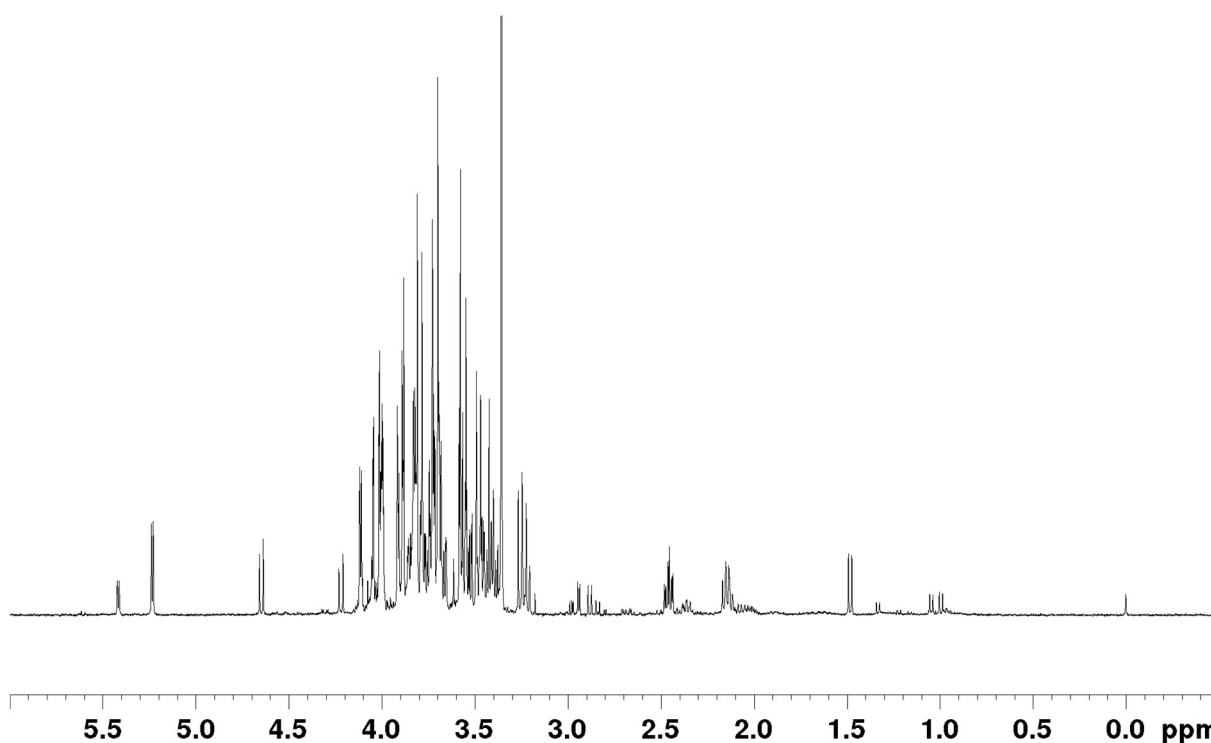


Abbildung 27: 1D-¹H-NOESY-Spektren der Spargelextrakte (aus einer Mischprobe) aus 100 % Methanol nach der Trocknung mittels Gefriertrocknungsanlage mit Trockenrechen

Wie in Abbildung 25, Abbildung 26 und Abbildung 27 zu sehen ist, konnten nicht alle Probenansätze durchgeführt und gemessen werden. Gründe hierfür waren z. B. Verflüssigungen der vorgefrorenen Extrakte oder die unvollständige Trocknung mittels Metallblockthermostat. Mit Bezug auf die Art der Trocknungsmethode werden somit bereits Einschränkungen deutlich. In Abbildung 28 ist zur besseren Veranschaulichung der Extraktintensitäten noch einmal der Vergleich der Extraktsspektren bei gleicher Skalierung unter Verwendung der Gefriertrocknungsanlage mit Trockenrechen abgebildet, da mittels dieser Methode alle Lösungsmittelmischungen praktisch durchführbar waren.

Zur analytischen Vergleichbarkeit der Versuche, soll der Saccharose-Gehalt der einzelnen Ansätze bestimmt werden. Die Berechnung in den jeweiligen Extrakten erfolgt anhand der Signalintensitäten des Integrals 6 des TMSP-Referenzsignals und des Integrals 1, welches das Proton am α -anomeren C1-Atom der Glucopyranose der Saccharose widerspiegelt. Die Puffer wurden nach Tabelle 27 Gruppe A zusammengesetzt, was bedeutet, dass die TMSP-Konzentration bei 0.5 mM lag. In Tabelle 6 sind die Integrale der Saccharose- und TMSP-Signale in den unterschiedlichen Extrakten der Lösungsmittelgemische gelistet; die Werte basieren auf der Trocknung mittels Gefriertrocknungsanlage und Trockenrechen, entsprechend Abbildung 28). Gemäß Formel 1 und Formel 2 kann auf den Saccharose-Gehalt im Extrakt sowie im unbehandelten Spargel geschlossen werden. Die errechneten Werte sind in Tabelle 7 in Verbindung mit Tabelle 8 nachzusehen.

5 Ergebnisse und Diskussion

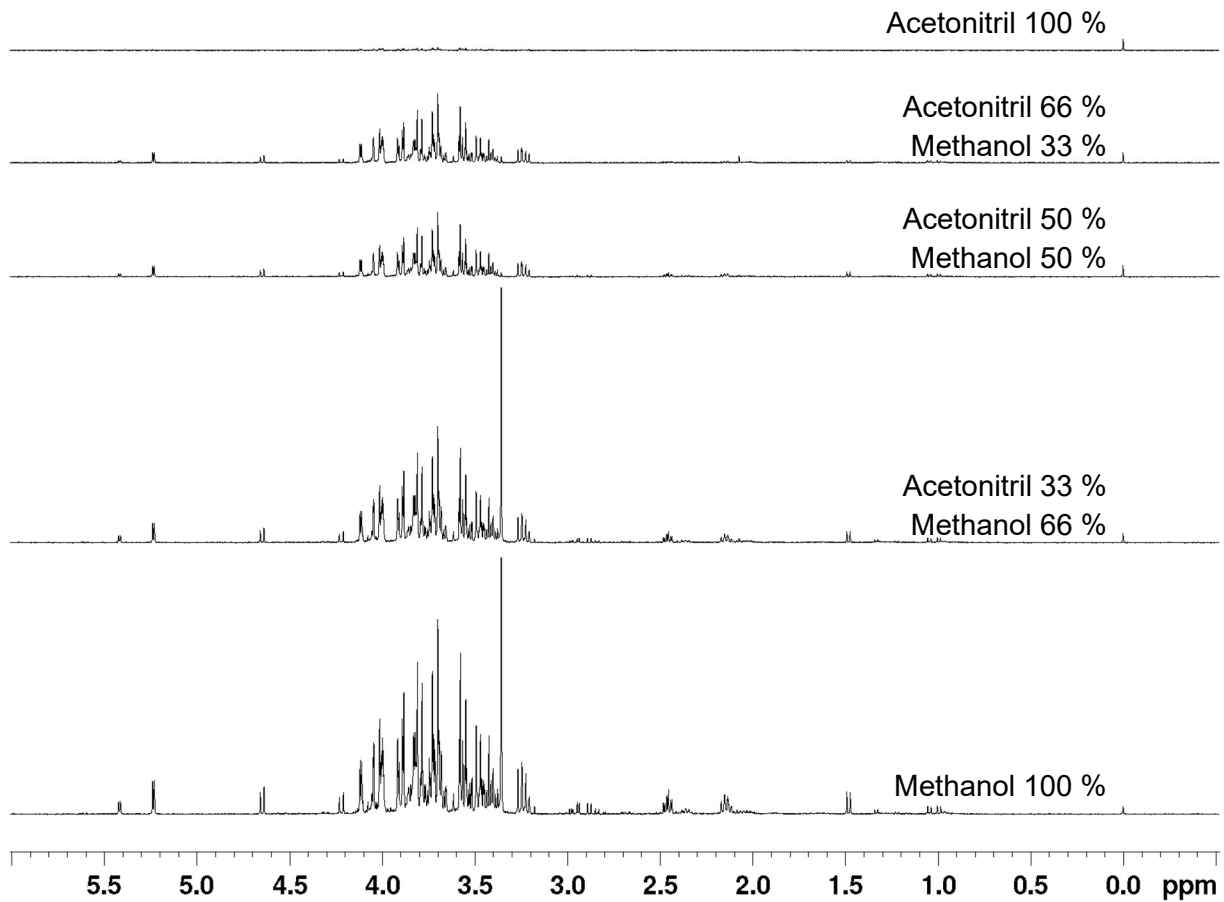


Abbildung 28: 1D-¹H-NOESY-Spektren der Spargelextrakte (aus einer Mischprobe) aus verschiedenen Lösungsmittelkombinationen bei der Trocknung mittels Gefriertrocknungsanlage und Trockenrechen (Anteil Acetonitril von oben nach unten sinkend / Methanol steigend)

Tabelle 6: Integral des C1-Signals der Saccharose und Integralsignal des TMSP eines 1D-¹H-NOESY-Spektrums einer Spargelmischprobe für die verschiedenen Lösungsmittelgemische

Lösungsmittel/-gemisch	Objekt	Integral [abs]	Integral [rel]	v (F1) [ppm]
Lösungsmittel 100 % Methanol	Integral 1	568,352.74	34.6680	5.4217
	Integral 6	147,547.59	9.0000	0.0002
Lösungsmittelgemisch 66 % Methanol und 33 % Acetonitril	Integral 1	311,064.12	18.1257	5.4192
	Integral 6	154,453.86	9.0000	0.0013
Lösungsmittelgemisch 50 % Methanol und 50 % Acetonitril	Integral 1	120,683.08	6.5301	5.4187
	Integral 6	166,329.58	9.0000	0.0001
Lösungsmittelgemisch 33 % Methanol und 66 % Acetonitril	Integral 1	104,411.85	5.6101	5.4238
	Integral 6	167,502.61	9.0000	0.0002
Lösungsmittel 100 % Acetonitril	Integral 1	12,353.74	0.6547	5.4059
	Integral 6	169,814.74	9.0000	0.0000

Tabelle 7: Saccharose-Konzentration im Extrakt, prozentualer Saccharose-Gehalt im Spargellyophilisat und im unbehandelten Spargel, errechnet aus den Integralen 1 (α -anomerer C1 der Saccharose) und 6 (TMSP-Referenzsignal), mit einer TMSP-Konzentration von 0.5 mM, basierend auf der Extraktion mit unterschiedlichen Lösungsmitteln und Gemischen daraus

Lösungsmittel/-gemisch	c _{Sac/Ex} [M]	G _{Sac/Lyo} [%]	G _{Sac} [%]*
100 % Methanol	0.00193	1.319	0.132-0.396
66 % Methanol, 33 % Acetonitril	0.00101	0.689	0.069-0.207
50 % Methanol, 50 % Acetonitril	0.00036	0.248	0.025-0.075
33 % Methanol, 66 % Acetonitril	0.00031	0.213	0.021-0.064
100 % Acetonitril	0.00004	0.025	0.002-0.007

* Ausgehend von einer Wasserentfernung zwischen (70-90) % während der Gefriertrocknung.

Tabelle 8: Erläuterung der Größen aus Tabelle 7

Variable	Einheit	Beschreibung
c _{Sac/Ex}	M bzw. mol/L	Saccharose-Konzentration im Extrakt = 0.00041 mol/L
G _{Sac/Lyo}	%	Prozentualer Massenanteil Saccharose im Spargellyophilisat
G _{Sac}	%	Prozentualer Massenanteil Saccharose im unbehandelten Spargel

5 Ergebnisse und Diskussion

Vergleicht man die Signalintensitäten in Abbildung 28, zeigen die Extrakte mit steigendem Methanolanteil eine höhere Extraktionsausbeute mit Bezug auf die polaren Metabolite, was die Wahrscheinlichkeit, Unterschiede im Metabolom verschiedener Probengruppen zu finden, deutlich erhöht. Darüber hinaus zeigt sich Methanol auch in der Literatur als übliches Lösungsmittel für *Metabolomics*-Anwendungen (Fatma *et al.*, 2012; Le Gall *et al.*, 2003).

Dies spiegeln ebenfalls die errechneten Werte aus Tabelle 7 wider: Die Saccharose-Konzentration im Extrakt ist mit 1.93 μM im reinen Methanol-Extrakt am höchsten und nimmt mit steigendem Acetonitril-Anteil stetig ab, bzw. ist bei der Extraktion mit 100 % Acetonitril kaum noch messbar (0.04 μM). Während bei der Extraktion mit reinem Methanol ein Saccharose-Gehalt im unbehandelten Spargel von 0.13 % bis 0.40 % (je nach Gefriertrocknungsgrad geschätzte Wasserentfernung zu (70-90) %) geschätzt werden kann und der Literaturwert von 0.24 % genau in dieser Spannweite liegt, erreichen alle anderen Extraktionsmodelle diesen Wert nicht im Entferntesten. Diese Werte sprechen sehr für die Verwendung von 100 % Methanol als Extraktionsmittel, um eine möglichst hohe Wiederfindung zu erlangen.

Da bei der Trocknung mittels Gefriertrocknungsanlage mit Tellereinsatz sowie mittels Metallblockthermostat unter einem Stickstoffstrom einige Versuche praktisch nicht durchgeführt werden konnten, wurden diese Proben entsprechend nicht gemessen. Begründet ist dies zum einen im zu langsamen Vakuumaufbau bei der Gefriertrocknung mit Tellereinsatz, weshalb sich Proben mit erhöhtem Acetonitril-Anteil in kürzester Zeit wieder verflüssigten. Zum anderen führte die geringere Flüchtigkeit des Methanols in der Mischung mit dem Lyophilisat (Bindung durch den Zucker) dazu, dass insbesondere die Stickstoff-Trocknung der Proben mit erhöhtem Methanol-Anteil eine sehr lange Trocknungsdauer benötigte.

Aus rein praktischer Sichtweise erwies sich zum damaligen Zeitpunkt die Trocknung unter dem Stickstoffstrom im Gegensatz zur aufwändigen Gefriertrocknung mit vorangehendem Tiefkühlprozess als die durchführbarste Methode, da dieser Prozess auch über Nacht stattfinden kann. Weiterhin zeigen insbesondere die Abbildung 24, Abbildung 25 und Abbildung 26, dass die Gefriertrocknungen mit Tellereinsatz keine logischen Extraktionsausbeuten aufzeigen, da die Metabolitintensität bei steigendem Methanolanteil zunächst sinkt und dann wieder steigt. Eine Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden.

Als die einfachste und reproduzierbarste Methodenkombination für die Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) stellte sich daher vorerst die Extraktion mit 100 % Methanol und die anschließende Trocknung mittels Stickstoffstrom heraus. Die

5 Ergebnisse und Diskussion

Untersuchungen aus Punkt 5.1.2.1 und teils Punkt 5.1.4 wurden mit Hilfe dieser Methode durchgeführt.

5.1.3.1.2 Wahl des Puffersystems

Wie zu Beginn des Ergebnisteils in Abbildung 19 bereits erwähnt, befindet sich eine Vielzahl unterschiedlichster chemischer Komponenten mit verschiedenen pKs-Werten in einem Pflanzenextrakt. Sowohl basische Verbindungen wie Amine, insbesondere aber die sauren Substanzen, wie Aminosäuren, organische Säuren und Fettsäuren, die im Spargel eine übergeordnetere Rolle spielen, können den pH-Wert des Gemisches beeinflussen. Die Zusammensetzung ist grundlegend abhängig von der Pflanzenart und -sorte und von exogenen Einflüssen während des Wachstums. Daher können Proben unterschiedlicher botanischer und geographischer Herkunft auch unterschiedliche pH-Werte aufweisen.

Weicht der pH-Wert zwischen unterschiedlichen Proben ab, so liegen auch mehr oder weniger Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen) zwischen den Analyten und den solvatisierten Ionen vor. Damit ändert sich wiederum die Elektronendichte von leicht-protonierbaren oder –deprotonierbaren funktionellen Gruppen. Die NMR-spektroskopisch detektierbaren Signale dieser pH-sensiblen Moleküle wie z. B. Verbindungen mit Carboxylgruppen sind daher auch Verschiebungen im Spektrum ausgesetzt, sogenannten pH-Shifts. Weiterhin besitzen Puffersalze wie Phosphate einen Anisotropieeffekt auf Moleküle mit Doppelbindungen, was zu spektralen Verschiebungen der Signale führen kann.

Darüber hinaus kann die Anwesenheit von Metallionen ausschlaggebend für variierende chemische Verschiebungen sein. Diese werden von mehrprotonigen Säuren komplexiert, wie z. B. Citronensäure, was dazu führt, dass die Elektronendichte und Konformation des Citrats verändert wird. Die Komplexbildung ist dabei auch abhängig von dem eingestellten pH-Wert sowie dem Ionenradius des Metallions. Schließlich kann es zur Schwächung des 90 °-Pulses aufgrund erhöhter Salzkonzentrationen kommen; dies kann sich auf die Intensitäten der Signale auswirken.

Bereits bei der Datenreduktion, dem *bucketing*, würden diese Signalschwankungen Fehler hervorrufen, welche sich in der gesamten statistischen Auswertung fortsetzen. Die Konstanz der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale ist deshalb grundlegend relevant für alle zu messenden Spargelproben und deren anschließende Datenanalyse.

Laut Literatur wurden für *Metabolomics*-basierte Anwendungen zumeist Phosphatpuffer gewählt, da zu Vergleichbarkeitszwecken der Daten insbesondere in der *Metabolomics*-Forschung an Humanproben im neutralen Bereich gearbeitet werden muss ($pK_s = 7.2 \rightarrow$ Pufferbereich = 6.2-8.2). In den Veröffentlichungen ähnlicher *Metabolomics*-

5 Ergebnisse und Diskussion

assoziierter Forschungsfelder an pflanzlichen und menschlichen Matrices wurden Natriumhydrogenphosphatpuffer mit Konzentrationen zwischen 100-600 mM verwendet. (Beckonert *et al.*, 2007; Consonni *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2008)

Aus diesem Grunde wurden zunächst erste Versuche zur Entwicklung einer geeigneten Probenaufarbeitungsmethode für die Extraktion von weißem Spargel mit dem Natriumhydrogenphosphatpuffer vorgenommen (Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) unter Verwendung des Puffersystems der Gruppe A unter Punkt 7.2.3.1). Die Konzentration wurde auf ~240 mM eingestellt und aufgrund des geringen Umfangs der Versuche mit dieser Aufarbeitungsmethode noch nicht optimiert. Allerdings konnten bei der NMR-spektroskopischen Vermessung bereits starke pH-Shifts beobachtet werden. Bei einer Konzentrationserhöhung zur Steigerung der Pufferkapazität kam es wiederum zur Auskristallisation der Salze (Löslichkeitsprodukt $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 77 \text{ g/L}$) (GESTIS-Stoffdatenbank, 2020). Daher wurde die Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) modifiziert und daraus die Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) entwickelt.

5.1.3.2 Vorgehensweise für die Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7)

Mit dem Fortgang der Arbeit stellten sich verschiedene Nachteile der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) heraus, wie z. B. die zeitintensive und nicht kontaminationsfreie Lösungsmittelentfernung mit Hilfe des Stickstoffstroms oder das Auftreten von pH-Shifts aufgrund eines instabilen Puffersystems. Daher wurde eine weitere Methodenoptimierung vorgenommen. Diese führte zur Entwicklung der Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31). Die finale Probenaufarbeitungsmethode wurde für die Vermessung der Spargelproben im Zuge der Herkunfts- und zur Proteingehaltsbestimmung sowie in Teilen zur Überprüfung der Metabolomstabilität (Punkt 5.2, teils Punkt 5.1.4 sowie Punkt 5.1.5) herangezogen.

5.1.3.2.1 Wahl des Extraktionsmittels und der Trocknungsmethode

Die Planung der Probenahme und damit das Bewusstsein über die Komplexität des Probenspektrums verlief in etwa zeitgleich mit der Methodenentwicklung. Eine derart große Probenanzahl wäre mit der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Punkt 7.2.4.1) unter dem Aspekt der Lösungsmittelentfernung mittels Stickstoffstrom für 24 h beim Einsatz eines undeuterten Lösungsmittels nicht realisierbar gewesen. Weiterhin bestand bei den offenstehenden Extraktionsgefäßen im Stickstoff-Trockenblock eine Kontaminationsgefahr durch Stoffe und Partikel in der Umluft des Abzugs.

5 Ergebnisse und Diskussion

Somit wurde für die Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) im späteren Verlauf der Methodenweiterentwicklung beschlossen, auf das zwar teurere, aber einfacher handhabbare, deuterierte Methanol zurückzugreifen, sodass der Trocknungsschritt mittels Stickstoffstrom entfällt.

5.1.3.2.2 Wahl des Puffersystems

Aufgrund der nachteiligen Handhabung des Natriumhydrogenphosphatpuffers (siehe Punkt 5.1.3.1.2) der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) wurde für die Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) vergleichend ein Kaliumhydrogenphosphatpuffersystem, einige Additive sowie die geeignetste Konzentration der Puffersysteme untersucht.

Puffersystem und Additive

Der Natriumhydrogenphosphat-, Kaliumhydrogenphosphatpuffer und ein Mischpuffer aus beiden Salzen wurden hinsichtlich ihrer Stabilität und ihres Einflusses auf die NMR-spektroskopischen Messergebnisse vergleichend überprüft. Als Mischpuffer wurde lediglich der $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O / NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$ -Puffer berücksichtigt, da das Salz Na_2HPO_4 ein sehr schwer-lösliches Salz (Löslichkeitsprodukt = 77 g/L) darstellt (GESTIS-Stoffdatenbank, 2020). Weiterhin wurden die Pufferlösungen mit einer Stammlösung des NMR-Standards Natriumtrimethylsilylpropionat (TMSP) versetzt, um ein Referenzsignal (0.0 ppm) in den Spektren zu erzeugen (Endkonzentration im jeweiligen Puffergemisch 5 mM).

Zum einen wurden lediglich Extrakte der reinen Puffer-TMSP-D₂O-Gemische und zum anderen wurden Gemische mit einem weiteren Additiv, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), hergestellt. EDTA besitzt Komplexbildungseigenschaften, was die Reproduzierbarkeit der Spektren erhöhen kann, da es Erdalkalimetallionen abfängt und diese somit für andere Analyten nicht mehr zur Verfügung stehen. Auf diese Weise kann der pH-Wert stabilisiert werden und starke pH-Shifts bei der Verwendung des Natriumhydrogenphosphatpuffers vermieden werden; weiterhin besitzt EDTA inhibierende Eigenschaften gegenüber enzymatischen Reaktionen. Die genauen Einwaagen des Puffers sind der Gruppe B aus Tabelle 27 unter Punkt 7.2.3.1 zu entnehmen.

In Abbildung 29 ist eine Gegenüberstellung von Spektren von Probenextrakten zu sehen, in denen die verwendeten Puffersysteme mit verschiedenen Additiven versetzt worden sind. Im Zuge der Entwicklung der Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) wurde für diese Untersuchung die Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) mit den erläuterten Abwandlungen verwendet.

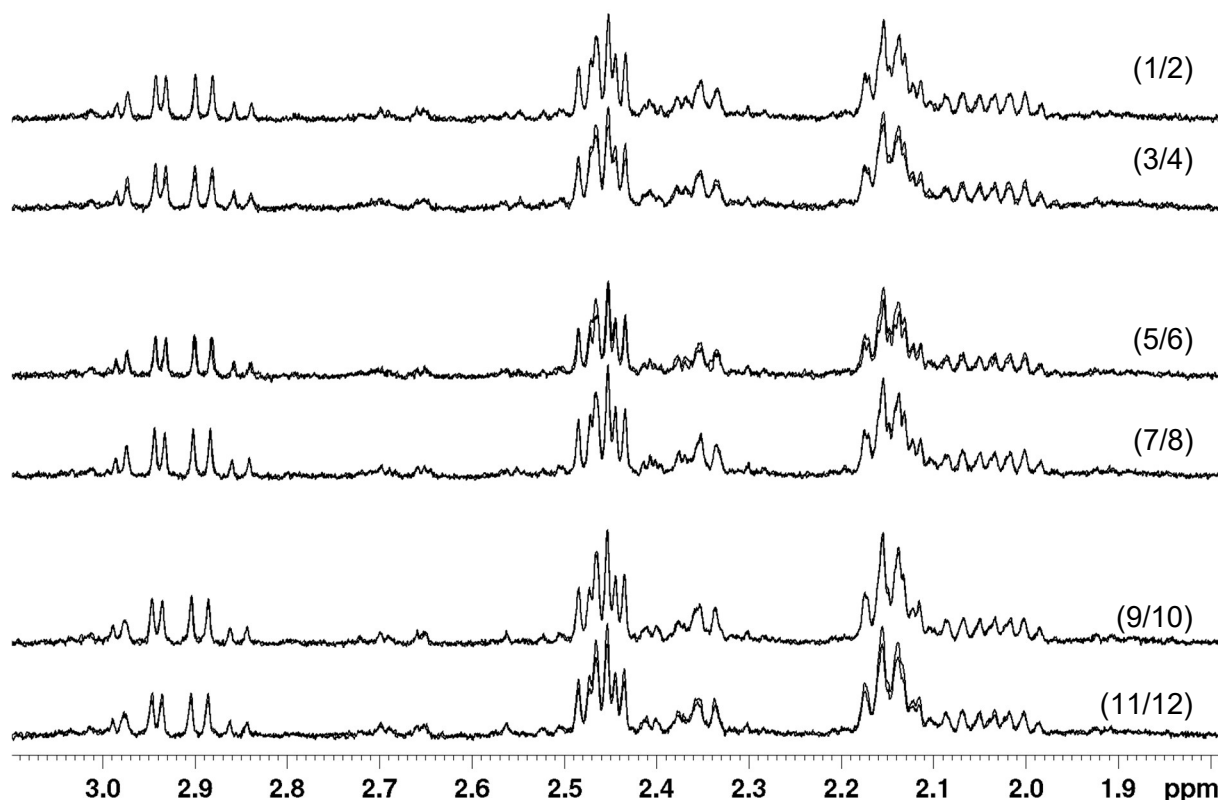


Abbildung 29: 1D-¹H-NOESY-Spektren der Extrakte einer Mischprobe mit sechs verschiedenen Puffersystemen; 1-4 Natriumhydrogenphosphat, 5-8 Kalium-Natriumhydrogenphosphat, 9-12 Kaliumhydrogenphosphat, 1/2 + 5/6 + 9/10 ohne EDTA, 3/4 + 7/8 + 11/12 mit EDTA

Der Vergleich der in Abbildung 29 dargestellten Spektren der Spargelextrakte zeigt keine signifikanten Unterschiede. Bei genauem Hinsehen sind jedoch leichte spektrale Differenzen in den Spektren, in denen Natriumhydrogenphosphat verwendet wurde, zu erkennen.

Für die Aufarbeitung wurden stets Aliquote der gleichen Probe verwendet (Mischprobe aus verschiedenen Spargelproben zu Vorversuchszwecken). Zunächst wurden nur zwei Variablen bei der Aufarbeitung verändert (Puffersystem, EDTA-Zusatz). Es konnte beobachtet werden, dass beide Komponenten keinen bedeutenden Einfluss auf die Stabilität der Metabolite in Lösung und damit einhergehend auf deren Konstanz in der chemischen Verschiebung besitzen. Beim Einsatz höherer Konzentrationen des EDTAs wäre mit zu großen, störenden Signalen des Moleküls selbst im Spektrum zu rechnen.

Da die bisher veränderten Parameter keinen signifikanten Einfluss auf die Spektren besitzen, wird im nächsten Versuch eine dritte Variable untersucht und es werden unterschiedliche Spargelproben verwendet. Es wird untersucht, ob die botanischen und geographischen Einflüsse, welche einen abweichenden pH-Shift (bis zu 0.015 ppm) in den Spektren verschiedener Proben hervorrufen, mit Hilfe eines bestimmten Puffersystems kompensiert werden können.

5 Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 30 ist ein Spektrenvergleich von sechs deutschen Spargelproben dargestellt. Die Extrakte wurden nach der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30; Puffersystem-Gruppe B unter Punkt 7.2.3.1) zum einen mit dem ~120 mM Natrium- und zum anderen mit dem ~100 mM Kaliumhydrogenphosphatpuffer hergestellt (Konzentrationen nach der Verdünnung mit Methanol- d_4 ; Konzentration (TMSP) = 0.5 mM; jeweils ohne EDTA).

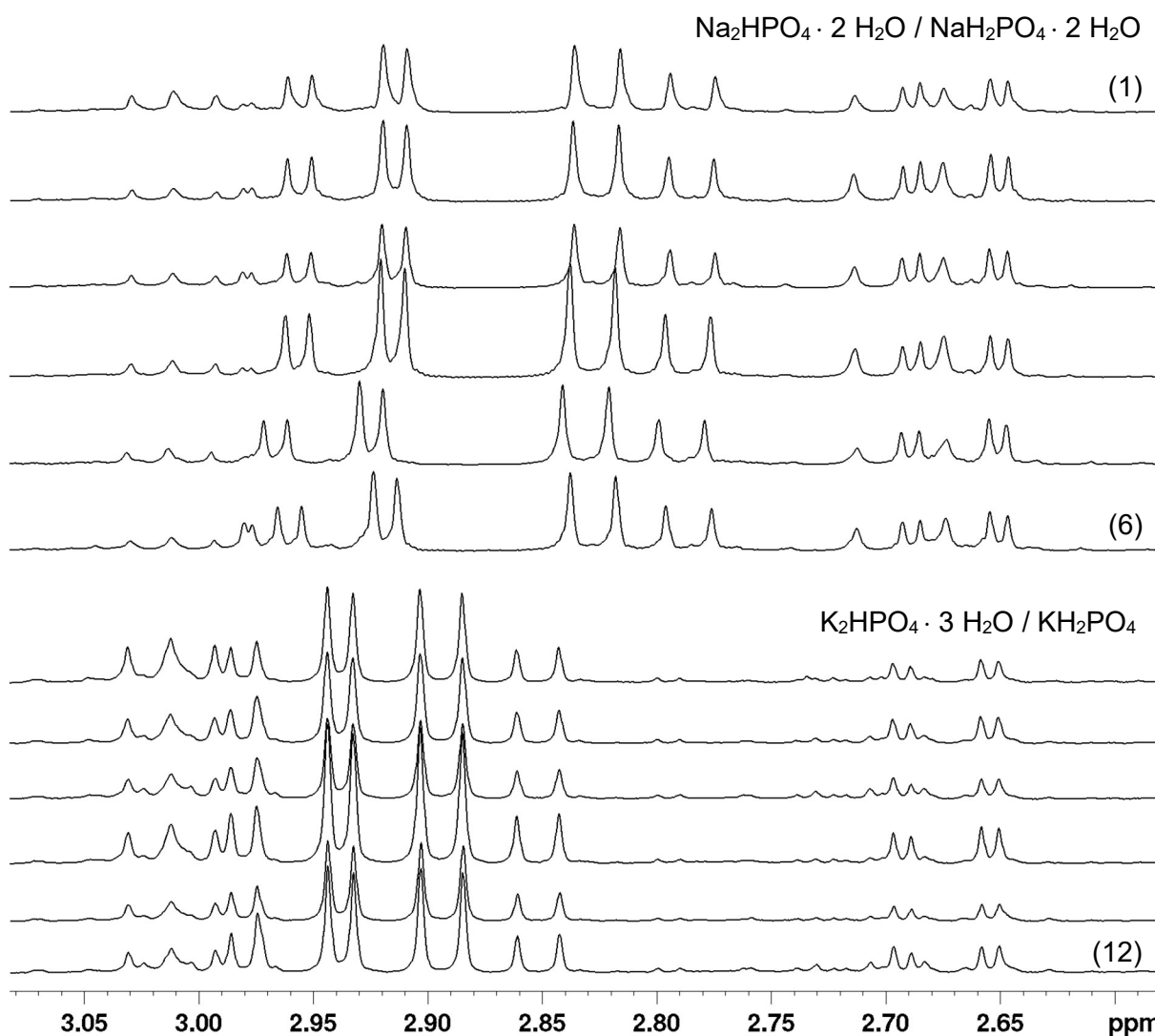


Abbildung 30: 1D-¹H-NOESY-Spektren der Spargelextrakte aus zwei verschiedenen Puffersystemen; 1-6 Natriumhydrogenphosphat, 7-12 Kaliumhydrogenphosphat, 1/7: 14-DE-BWS-Smi-Gi, 2/8: 14-DE-SH-Saf-Gi, 3/9: 14-DE-BYSr-Gam-Gi, 4/10: 14-DE-BWS-Lan-Gi, 5/11: 14-DE-BYAb-Kug-Gr, 6/12: 14-DE-SH-Har-Ba

Die Abbildung 30 zeigt eindeutig, dass der Kaliumhydrogenphosphatpuffer im Gegensatz zu dem Natriumsalzäquivalent keine pH-Shifts aufweist. Dies ist sehr wahrscheinlich dadurch zu begründen, dass das schwerer lösliche Na_2HPO_4 -Salz des $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O} /$

5 Ergebnisse und Diskussion

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Puffers ausfällt (Löslichkeitsprodukt = 77 g/L), bevor es eine ausreichende Pufferkapazität erreichen kann (GESTIS-Stoffdatenbank, 2020). Der Kaliumhydrogenphosphatpuffer bietet durchweg gut reproduzierbare Spektren verschiedener Proben, auch ohne den Einsatz von EDTA. Aus diesem Grund wird sich im weiteren Verlauf der Arbeit auf die Anwendung dieses Puffers ohne den Zusatz von EDTA konzentriert.

Pufferkonzentration

Im Verlauf der weiteren Methodenentwicklung wurde – auf Grundlage der beobachteten pH-Shifts bei der Verwendung des Natriumhydrogenphosphatpuffers – nur noch der Kaliumhydrogenphosphatpuffer hinsichtlich der Pufferkapazität untersucht. Die Analyse des Mischpuffers ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O} / \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) wird an dieser Stelle nicht weitergeführt, da der reine Kaliumhydrogenphosphatpuffer ausreichend stabil ist. Weiterhin kann für die Probenaufarbeitung im Rahmen der Herkunftsbestimmung auf die H_2O -freien Salze (ohne Hydrathülle) zurückgegriffen werden, was für die Vorversuchszwecke noch nicht notwendig erschien.

Wie zu Beginn des Kapitels bereits beschrieben, wird die Elektronendichte leicht de-/protonierbarer funktioneller Gruppen bei Anwesenheit basischer und saurer Verbindungen verändert. Damit verändern sich auch die chemischen Verschiebungen einzelner Protonensignale des entsprechenden Moleküls. Derartige pH-Shifts beeinflussen die statistische Auswertung. Es bedarf daher für die zu bearbeitende Fragestellung einer Extraktionsmethode, welche stabil gegenüber den pH-beeinflussenden Komponenten der Versuchsmatrix Spargel ist. Ein Puffersystem, welches während der Anwendung in Lösung bleibt, aber auch eine ausreichende Pufferkapazität bietet, soll für die Aufarbeitung der Spargelproben zur Unterscheidung ihrer geographischen Herkunft entwickelt werden.

Wie aus Abbildung 30 deutlich hervorgeht, ist das alternative Puffersystem des wasserlöslicheren $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O} / \text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffers ohne EDTA-Zusatz mit 0.5 mM TMSP weitergehend zu untersuchen. Die Konzentration des Puffers soll anhand des folgenden Versuchs optimiert werden, sodass die Pufferkapazität ausreichend ist, um bei guter Lösungsstabilität reproduzierbare, pH-Shift-unbeeinflusste Messergebnisse gewährleisten zu können.

Zunächst wurde ein 200 mM sowie ein 1,000 mM Puffer angesetzt, da die bisher verwendete Konzentration des Natriumhydrogenphosphatpuffers (~240 mM, bzw. in der 1:2-Verdünnung mit Methanol(- d_4) entspricht ~120 mM) keine ausreichende Pufferkapazität zur Kompensation der pH-Shifts besaß. Es soll weiterhin beobachtet werden, ob eine sehr hohe Konzentrierung einen negativen Effekt (pH-Shift-Beeinflussung durch Alkali- und Erdalkalimetallionen) auf die

5 Ergebnisse und Diskussion

Spektren besitzt bzw. ob eine gleichbleibende Stabilität und Qualität der Spektren gegeben ist. Abbildung 31 vergleicht die Spektren von Spargelextrakten, bei denen die unterschiedlich hoch konzentrierten Kaliumhydrogenphosphatpuffersysteme (200 mM und 1,000 mM) eingesetzt wurden. Aus Gruppe C und D in Tabelle 27 unter Punkt 7.2.3.1 sind alle Einwaagen nachzusehen.

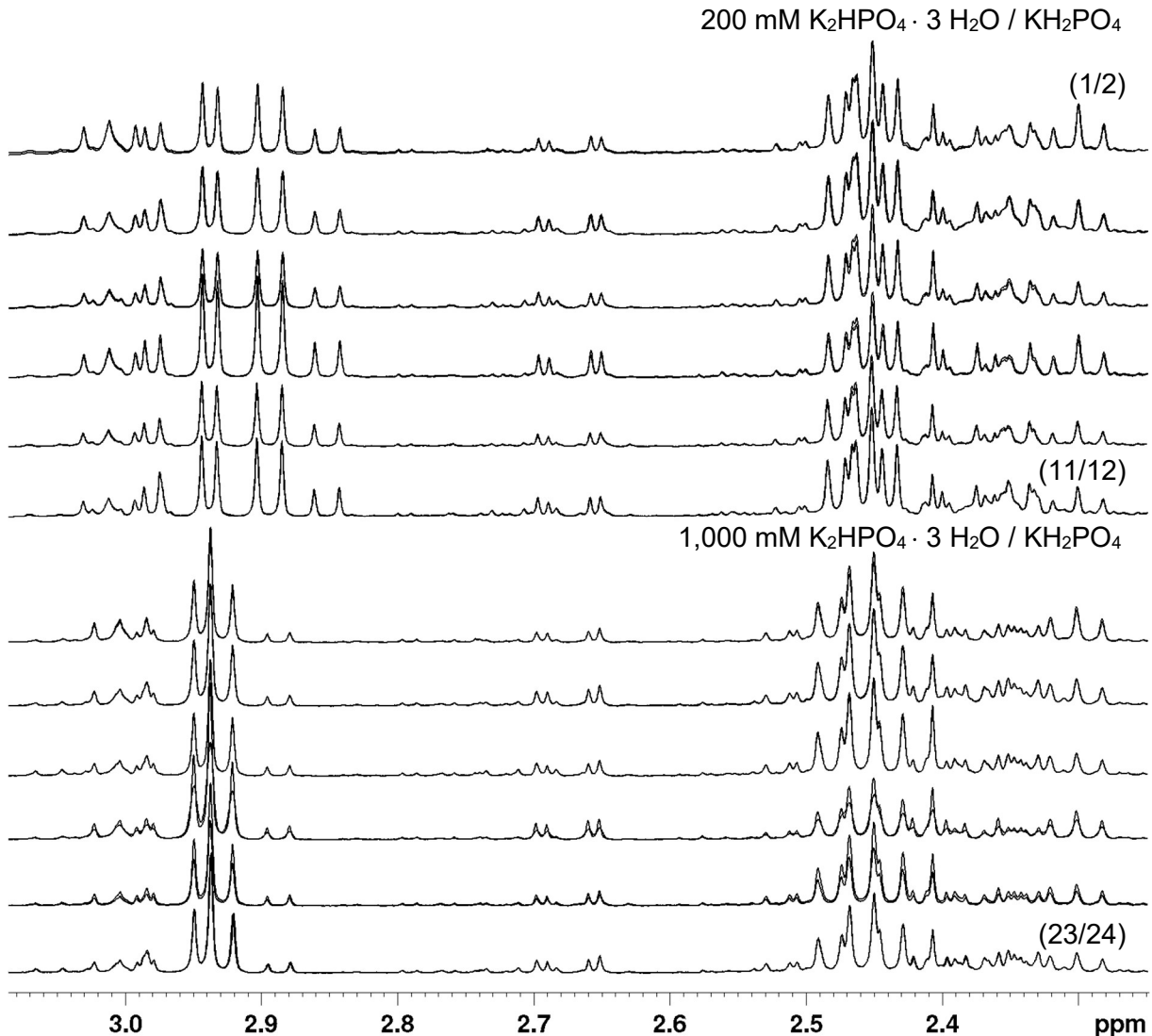


Abbildung 31: 1D-¹H-NOESY-Spektren der Spargelextrakte aus zwei verschiedenen hoch konzentrierten Kaliumhydrogenphosphatpuffersystemen; 1-12 200 mM Puffer, 13-24 1,000 mM Puffer, 1/2 + 13/14: 14-DE-BWS-Smi-Gi, 3/4 + 15/16: 14-DE-SH-Saf-Gi, 5/6 + 17/18: 14-DE-BYSr-Gam-Gi, 7/8 + 19/20: 14-DE-BWS-Lan-Gi, 9/10 + 21/22: 14-DE-BYAb-Kug-Gr, 11/12 + 23/24: 14-DE-SH-Har-Ba

Wie in Abbildung 31 zu sehen ist, steigert die höhere Kaliumhydrogenphosphatpufferkonzentration von 1,000 mM die Spektrenqualität hinsichtlich der Konstanz der chemischen Verschiebungen nicht und erweist sich daher als unnötig. Aufgrund des

5 Ergebnisse und Diskussion

veränderten chemischen Umfeldes durch die erhöhte Pufferkonzentration ändern sich lediglich die chemischen Verschiebungen einiger Signale innerhalb der jeweiligen Konzentrationsversuchsreihe. Der 200 mM Puffer ist daher für die in dieser Arbeit genannten Fragestellungen als ausreichend zu beurteilen und wird im Folgenden für die Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) weiter untersucht.

Nach den ersten Abwandlungsschritten der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) hin zur Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) sollen nun der Extraktionsschritt der lyophilisierten Spargelprobe mit der Aufnahme in einem geeigneten Puffer zusammengefasst werden: Dabei wird zunächst mit der Hälfte des Methanol- d_4 (712.5 μ L) extrahiert und anschließend mit einem Kaliumhydrogenphosphatpuffer auf 1.5 mL (\cong 712.5 μ L unter Berücksichtigung der 75 mg Lyophilisat) aufgefüllt.

Es wird im Folgenden untersucht, ob die geringere resultierende Kaliumhydrogenphosphatpufferkonzentration von 100 mM oder gar eine noch geringere Stufe (unter Einsatz eines 100 mM Puffers) von 50 mM für die Konstanz der chemischen Verschiebung ausreichend ist. Unter Verwendung des 200 mM und eines neu angesetzten 100 mM Kaliumhydrogenphosphatpuffers werden die Spektren dieser Auszüge vergleichend in Abbildung 32 dargestellt. Die entsprechenden Einwagen sind der Tabelle 27 Gruppe D zu entnehmen.

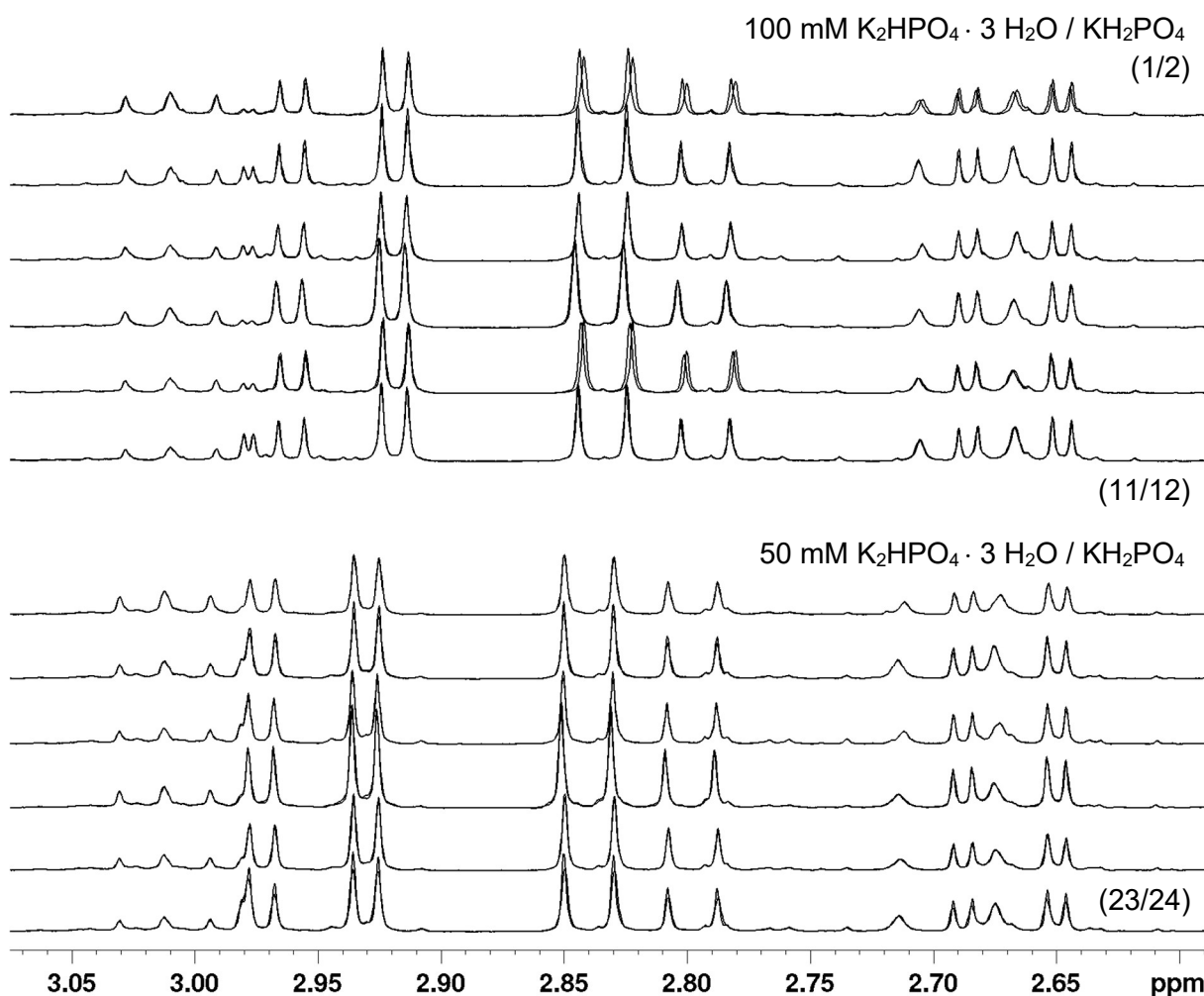


Abbildung 32: 1D-¹H-NOESY-Spektren der Spargelextrakte aus zwei unterschiedlich hoch konzentrierten Kaliumhydrogenphosphatpuffersystemen; 1-12 100 mM Puffer result., 13-24 50 mM Puffer result., 1/2 + 13/14: 14-DE-BWS-Smi-Gi, 3/4 + 15/16: 14-DE-SH-Saf-Gi, 5/6 + 17/18: 14-DE-BYSr-Gam-Gi, 7/8 + 19/20: 14-DE-BWS-Lan-Gi, 9/10 + 21/22: 14-DE-BYAb-Kug-Gr, 11/12 + 23/24: 14-DE-SH-Har-Ba

Wie aus Abbildung 32 ersichtlich wird, ist die Konstanz der chemischen Verschiebungen bei beiden Pufferkonzentrationen ähnlich gut. Ein leichter Shift ist bei beiden Konzentrationsreihen sichtbar, was mit der durch Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) bedingten Mischung mit Methanol-*d*₄ oder direkten Metabolomunterschieden der Proben in Zusammenhang stehen kann. Die hier sichtbaren Shifts von max. 0.005 ppm stören die statistische Auswertung (*bucketing*) allerdings nicht.

Um mögliche stark abweichende pH-Shifts (> 0.005 ppm) natürlichen Ursprungs aus dem Spargel zu umgehen, wurde weiterhin der 200 mM Kaliumhydrogenphosphatpuffer verwendet (Endkonzentration 100 mM). Dieser liefert eine ausreichende Pufferkapazität und somit auch eine gewisse Stabilität gegenüber den pH-Shifts in der chemischen Verschiebung. Wie bereits

5 Ergebnisse und Diskussion

erwähnt, wird für weitere Untersuchungen im Rahmen der Herkunftsbestimmung der Einsatz der wasserfreien Salze des Kaliumhydrogenphosphatpuffers bevorzugt, da sich diese Salze ebenso gut für die Methode eignen wie die Kaliumsalze mit Hydrathülle, mit dem Unterschied, dass durch ihre Verwendung der Wassereintrag nicht noch weiter erhöht wird.

Zusatz von Natriumazid

Als weiteres Puffer-Additiv für die Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) wurde Natriumazid mit 2 mM der Pufferlösung hinzugefügt. Der Einsatz soll einem biologischen Verderb der Proben entgegenwirken. Die spektroskopischen Auswirkungen des Zusatzes wurden nicht weitergehend untersucht, da durch das Molekül keine störenden Signale im Spektrum entstehen können und sich auf vergangene Forschungsarbeiten (Beckonert *et al.*, 2007; Dona *et al.*, 2016; Liebeke, Bundy, 2011; Mannina *et al.*, 2012) berufen werden kann.

5.1.3.3 Zusammenfassung der Methodenentwicklung

Im Folgenden sollen die beiden Aufarbeitungsmethoden noch einmal zusammengefasst, bzw. ihre einzelnen Entwicklungsschritte abgehandelt und bewertet werden.

5.1.3.3.1 Vorgehensweise für die Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3)

Zunächst wurde die Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) entwickelt. Bei der Untersuchung des Extraktionsmittels zeigte sich für Methanol ein höheres Extraktionsvermögen als für Acetonitril oder Gemischen aus beiden Lösungsmitteln. Das verwendete undeuterte Methanol wurde mittels Stickstoffstrom vom Spargeextrakt getrennt und der Rückstand in einem deuterierten Natriumhydrogenphosphatpuffer mit TMSP aufgenommen. Die Endkonzentration des Puffersystems beträgt $\sim 240 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ / $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ mit $\sim 0.5 \text{ mM TMSP}$.

Aus der Methode ergeben sich folgende Nachteile: Aufgrund der langen Trocknungszeit unter dem Stickstoffstrom (24 h) erweist sich die Methode in Anbetracht der großen Probenanzahl als zu zeitaufwendig, weshalb der Trocknungsschritt möglichst umgangen werden soll. Ebenfalls besteht eine zu große Kontaminationsgefahr, da die Probengefäße unter dem Abzug verhältnismäßig ungeschützt offenstehen. Weiterhin zeigt der Natriumhydrogenphosphatpuffer bei vielen Proben Instabilitäten, da das Salz Na_2HPO_4 eine zu geringe Löslichkeit besitzt und bereits vor dem Erzielen einer hinreichenden Pufferkapazität ausfällt. Dadurch können die jeweiligen pH-Wert-Schwankungen nicht abgefangen werden und es kommt zu pH-Shifts in den NMR-Spektren.

5.1.3.3.2 Vorgehensweise für die Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7)

Aus den in Punkt 5.1.3.3.1 beschriebenen Gründen wurden Änderungen in der Extraktion und am Puffersystem vorgenommen, woraus sich die Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) ergibt: Der Trocknungsschritt wird umgangen, indem deuteriertes Methanol eingesetzt wird, welches nicht entfernt werden muss. Es wird dabei nicht nur Zeit gespart, sondern auch eine Kontaminationsquelle umgangen, da die Proben keine 24 h mehr geöffnet im Metallblockthermostat stehen müssen. Durch die Anwesenheit des Methanol- d_4 im Extrakt bleiben die Proben darüber hinaus noch länger stabil, da der Alkohol eine konservierende Wirkung besitzt und eventuell vorhandene Mikroorganismen keine Aktivität zeigen können.

Der ~240 mM Natriumhydrogenphosphatpuffer wird durch einen 200 mM konzentrierten Kaliumhydrogenphosphatpuffer ersetzt. Da sich die hohen Pufferkonzentrationen (Gruppe C, Punkt 7.2.3.1; Ergebnisse siehe Punkt 5.1.3.2.2) als nicht notwendig herausstellten und um sich an bestehenden Forschungsergebnissen zu orientieren (Kim *et al.*, 2010; Tomita *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2009), soll der Puffer nach der Extraktion mit Methanol- d_4 zu gleichen Teilen wie Methanol- d_4 eingesetzt werden. Die resultierende Endkonzentration von 100 mM eignet sich sehr gut hinsichtlich der Pufferkapazität und -stabilität. Darüber hinaus wird, aufgrund der Extraktion sowohl mit Methanol- d_4 , als auch im Gemisch mit dem deuterierten Puffer, das Extraktionsspektrum von dem mittelpolaren zusätzlich auf den polaren Bereich ausgeweitet. Weiterhin wird zusätzlich zur biologischen Konservierung der Extrakte durch das Methanol ein Zusatz von Natirumazid in der Pufferlösung vorgenommen. In der 1:2-Verdünnung mit Methanol- d_4 resultierend folgende Konzentrationen des Puffers in den Probenextrakten: 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, 0.25 mM TMSP und 1 mM NaN_3 . Diese Methode wurde für alle Spargelproben, welche im Zuge der Herkunftsbestimmung und der Metabolit-identifizierung kernresonanz-spektroskopisch vermessen wurden, herangezogen und liefert somit eine konstante Grundlage für die statistische Datenverarbeitung.

5.1.4 Metabolomstabilität

Die Verweildauer der Proben im Probenwechsler des Spektrometers bei der automatischen Vermessung kann mitunter bis zu 24 h betragen. Daher ist es von großem Interesse, wie lang die hergestellten Extrakte mit einem geringen, aber nicht vermeidbaren Restproteingehalt für die Generierung eines aussagekräftigen Spektrums verwendbar sind.

Es wurde eine Stabilitätsprüfung des extrahierten Metaboloms durchgeführt. Eine Mischprobe aus verschiedenen deutschen Spargelproben wurde sowohl mit der Aufarbeitungsmethode 1

5 Ergebnisse und Diskussion

(intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) unter Verwendung des Kaliumhydrogenphosphatpuffers $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O / KH_2PO_4$ (Gruppe B (ohne Additive) unter Punkt 7.2.3.1), als auch mit der Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) je einmal aufgearbeitet und über einen einwöchigen Zeitraum täglich vermessen. Der Vergleich der Spektren für die Aufarbeitungsmethoden 1 und 2 ist in Abbildung 33 und Abbildung 34 aufgeführt.

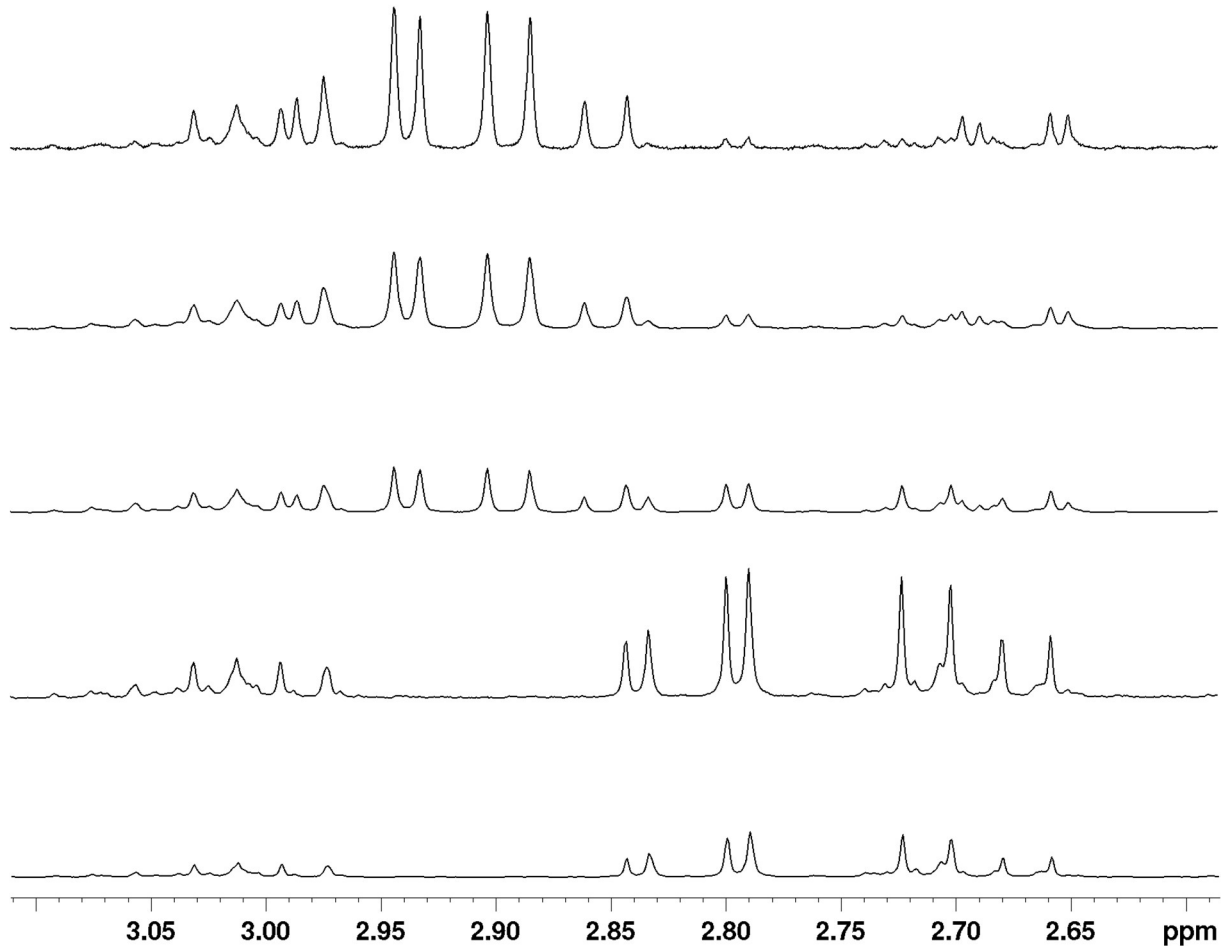


Abbildung 33: 1D-¹H-NOESY-Spektren eines Spargelprobenextraktes (aus einer Mischprobe) nach Aufarbeitungsmethode 1, gemessen in definierten zeitlichen Abständen; Proben von oben nach unten: Tag 0, Tag 1, Tag 2, Tag 6, Tag 8 (Messreihe 1)

5 Ergebnisse und Diskussion

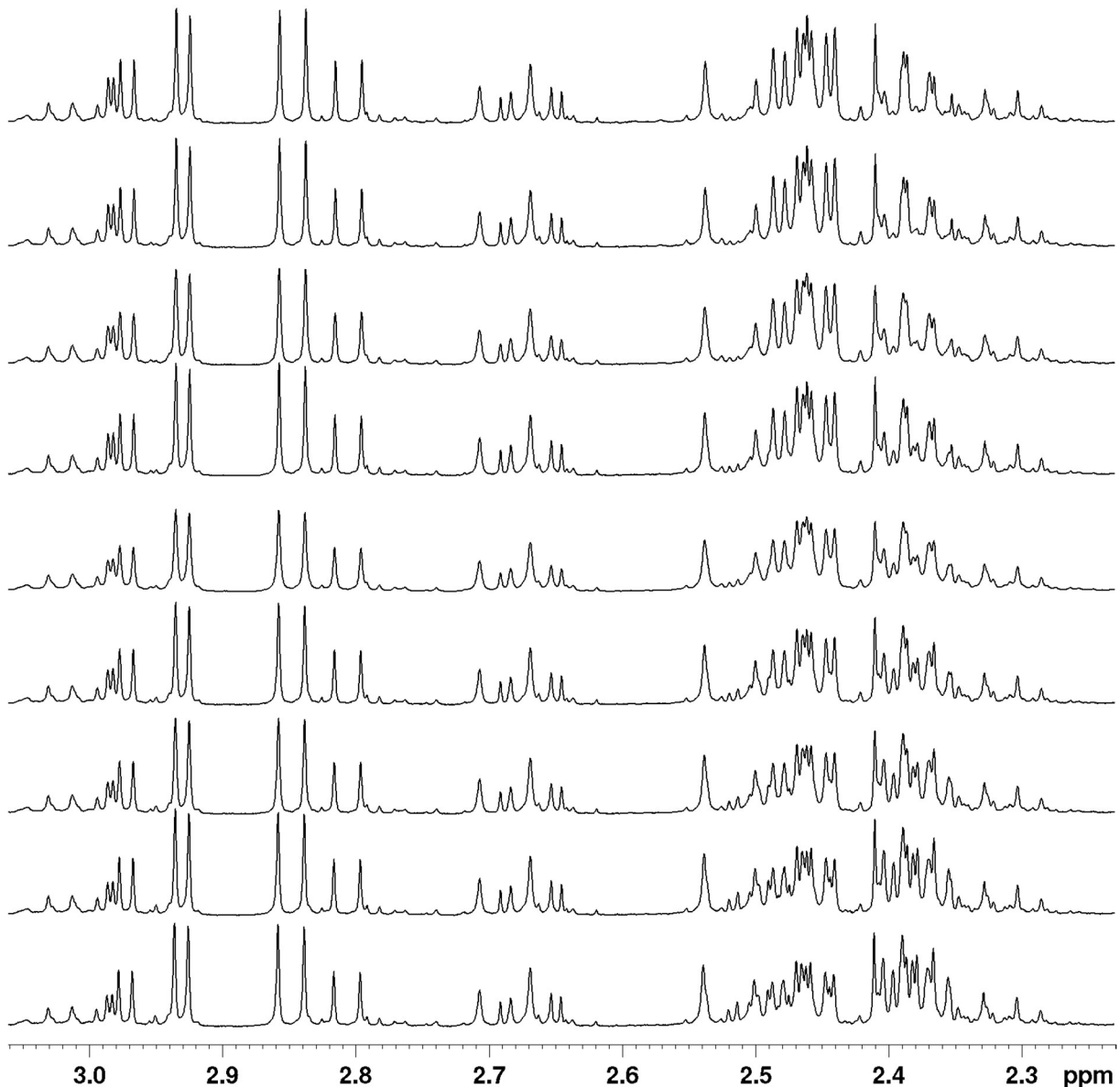


Abbildung 34: 1D-¹H-NOESY-Spektren eines Spargelprobenextraktes (aus einer Mischprobe) nach Aufarbeitungsmethode 2, gemessen in definierten zeitlichen Abständen; Proben von oben nach unten: Tag 0, 10 Stunden, Tag 1, Tag 2, Tag 3, Tag 4, Tag 5, Tag 6, Tag 7 (Messreihe 2)

Auch wenn die chemischen Verschiebungen aufgrund der unterschiedlichen Extraktionsverfahren der beiden Messreihen voneinander abweichen, so ist doch eine eindeutige Aussage über die Metabolomstabilität bei Verwendung der jeweiligen Aufarbeitungsmethode möglich.

Wie in der Messreihe 1 (Abbildung 33) erkennbar wird, stellen sich bereits nach Tag 1 und 2 starke Veränderungen ein. So bauen sich die Signale zwischen 2.85 ppm und 3.0 ppm mit der Zeit ab und zwischen 2.65 ppm und 2.84 ppm entstehen neue Signale. Die Signalintensität der Peaks zwischen 2.85 ppm und 3.0 ppm beträgt nach Tag 1 bereits nur noch ca. die Hälfte im Vergleich zu Tag 0. An Tag 6 und 8 sind diese Signale nicht mehr sichtbar. In der

5 Ergebnisse und Diskussion

Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) werden die Proteine zunächst mit Hilfe von Methanol gefällt, welches im Nachgang unter einem Stickstoffstrom entfernt wird. Durch die Zugabe des wässrigen Puffers können resolubilisierende Proteine und Enzyme aus dem Bodensatz wieder aktiv werden. Weiterhin wurde in dem Puffer der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) auch kein Natriumazid eingesetzt und das Methanol entfällt als konservierendes Agens, wie es in der Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) der Fall ist. Diese Aspekte sind mögliche Erklärungen für die starke Beeinträchtigung der Probe bereits nach einem Tag, wenn sie mit der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) aufgearbeitet wird. Die Proben sollten für diese Methode daher sofort vermessen werden, was für große Probenmengen eine Schwierigkeit darstellt.

Die Messreihe 2, welche mit Hilfe der Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) generiert wurde, zeigt laut Abbildung 34 deutlich weniger Veränderungen im Spektrum. Die Signale bei 2.42 ppm, 2.8 ppm und 3.0 ppm verringern sich minimal mit fortschreitender Zeit (ab Tag 2). Auch vergrößern sich Signale im Bereich von 2.33 ppm. Es ist anhand der zeitlichen Abstände festzuhalten, dass sich das Maß der Signaländerungen in der Messreihe 2 (Abbildung 34) der Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) in einem deutlich geringeren Umfang bewegt als in der Messreihe 1 (Abbildung 33) der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30). So verringern sich beispielsweise die Intensitäten der Peaks zwischen 2.85 ppm und 3.0 ppm in Abbildung 34 im extremen Vergleich zu denselben Signalen der Messreihe 1 nur um ca. 5 % - 10 % erst ab zwei Tagen.

Diese Erkenntnis bestätigt die oben angeschnittene Hypothese, dass sich die Anwendung der Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) durch den Verbleib von 50 % Methanol- d_4 im Extrakt als auch durch den Zusatz des antimikrobiell wirksamen Natriumazids konservierend auf die Probenextrakte auswirkt. Das Methanol erhöht die Stabilität der Proben und denaturiert die in Lösung befindlichen Proteine. Nach bis zu zwei Tagen sind kaum Veränderungen im Spektrum sichtbar, was der Bearbeitung großer Probenmengen zugutekommt. Hingegen entspricht die Vermessung von sensiblen *Metabolomics*-Proben nach mehr als zwei Tagen keiner guten Laborpraxis. Ergebnisse könnten fehlgedeutet werden, da nicht klar ist, ob die statistischen Differenzen der metabolischen Profile auf den geographischen Unterschieden oder auf einer zu lang gelagerten NMR-Probe beruhen. Unter Einhaltung einer Zeitspanne von maximal zwei Tagen zwischen Aufarbeitung und Messung der Proben kann die verwendete Methode für die nachfolgend durchgeführte Herkunftsanalyse als sehr robust und gut geeignet erachtet werden.

5.1.5 Proteingehaltsbestimmung der Spargelextrakte nach BRADFORD

Bedingt durch Enzymaktivitäten kann innerhalb weniger Sekunden bereits die Metabolitzusammensetzung eines Organismus beeinträchtigt werden (Kim *et al.*, 2010). Im Protonenspektrum sind dann oft die Proteine als breite „Berge“ im hochfeldverschobenen Bereich zu sehen, was die statistische Auswertbarkeit erschwert. Darüber hinaus können kleinere Signale durch die breiten Proteinsignale verdeckt werden. Beide Phänomene können zur Fehldeutung statistisch ermittelter Unterschiede führen und sollten daher umgangen werden. Eine halb-quantitative Bestimmung von Enzymen bietet die Proteingehaltsbestimmung nach BRADFORD (Bradford, 1976). Die Kalibrierreihe der Proteinbestimmung ist in Tabelle 9 zu sehen. Die zugehörige Kalibriergerade ist in Abbildung 35 dargestellt.

Tabelle 9: Kalibrierreihe für die BSA-Proteingehaltsbestimmung mittels BRADFORD:

Konzentration an Protein BSA [$\mu\text{g/mL}$]	Gemessene Extinktion [Skt]
3.846	0.135
7.692	0.350
11.538	0.441
15.385	0.542
19.231	0.695

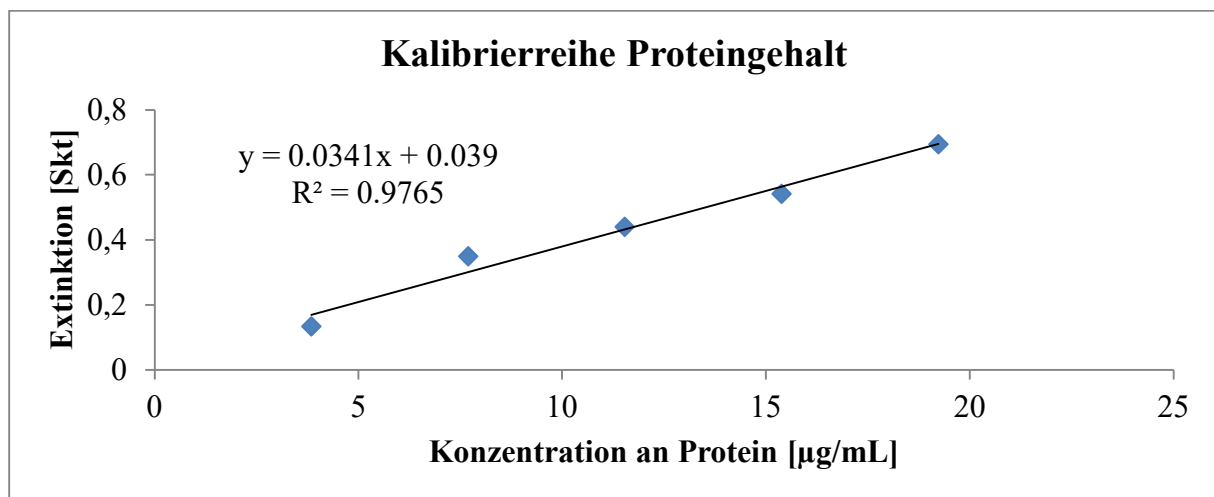


Abbildung 35: Graphische Darstellung der Messwerte aus Tabelle 9

Die Bestimmung wurde mit je drei unterschiedlichen Probenvolumina der Sorten *Gijnlim* und *Backlim* durchgeführt, welche mittels Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) extrahiert wurden. Es wurden verschiedene Extraktvolumina eingesetzt. Formel 3

5 Ergebnisse und Diskussion

liefert die Gleichung zur Berechnung des prozentualen Proteingehalts im Extrakt. In Tabelle 10 werden alle verwendeten Größen erläutert.

Formel 3: Berechnung des Proteingehalts im Spargellyophilisat

$$G = \frac{x \cdot VF \cdot V_{Ex}}{m_{EW}} \cdot 100$$

Tabelle 10: Erläuterung der Größen aus Formel 3

Variable	Einheit	Beschreibung
G	%	Prozentualer Proteingehalt
x	µg/mL	Massenkonzentration ermittelt aus Geradengleichung der Kalibrierreihe
VF	-	Verdünnungsfaktor (auf 250 µL mit Coomassie-Brillant-Blau G-250)
V _{Ex}	mL	Volumen des Extraktes (250 µL + 20 µL / 30 µL / 40 µL)
m _{EW}	µg	Einwaage des Spargellyophilisates (75.500 µg)
100	-	Faktor bezogen auf 100 %

Die Ergebnisse der Proteingehaltsbestimmung nach BRADFORD sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Ergebnisse der Proteingehaltsbestimmung nach BRADFORD im Spargellyophilisat

Probe und Aufgabevolumen	Gemessene Extinktion [Skt]	Konzentration [µg/mL]	VF	Gehalt [%] ± StdAbw. [%]
Backlim 20 µL	0.297	7.57	13.5	0.037
Backlim 30 µL	0.428	11.41	9.33	0.039
Backlim 40 µL	0.531	14.43	7.25	0.040
Backlim				0.04 ± 0.002
Gijnlim 20 µL	0.361	9.44	13.5	0.046
Gijnlim 30 µL	0.518	14.05	9.33	0.049
Gijnlim 40 µL	0.640	17.62	7.25	0.049
Gijnlim				0.05 ± 0.002

Aus der Mittelwertbildung der Bestimmungen dreier unterschiedlicher, aufgebrachter Volumina (20 µL, 30 µL, 40 µL) konnte ein Proteingehalt von 0.04 ± 0.002 % für die lyophilisierte *Backlim*-Probe und ein Gehalt von 0.05 ± 0.002 % für die lyophilisierte *Gijnlim*-Probe bestimmt werden. Der Literaturwert von Protein in Gemüsespargel liegt bei 1.96 % (siehe Punkt 3.1.2). Spargel enthält etwa 93 % Wasser, welches durch die vorangegangene Gefriertrocknung entfernt wurde, sodass von einem natürlichen Gehalt von 28.4 % Protein im Spargellyophilisat laut Literatur auszugehen ist. Mit der verwendeten Extraktionsmethode mit Methanol-d₄

5 Ergebnisse und Diskussion

konnten somit über 99.5 % der enthaltenen Proteine ausgefällt werden. Die Analyseverfahren lässt nur eine ungefähre Schätzung aufgrund des fehlenden der Matrix entsprechenden Standardproteins zu. Ein möglicher Fehler ist daher nicht auszuschließen. Dennoch kann von einer stark verminderten Enzymaktivität im Allgemeinen und somit von einem geringen Einfluss auf die Metabolitzusammensetzung ausgegangen werden.

5.2 Statistische Auswertung

Insgesamt wurden für die Herkunftsanalysen 279 Spargelproben gesammelt, aufgearbeitet und NMR-spektroskopisch vermessen. Die akquirierten Daten aller Proben werden mittels multivariater Auswerteverfahren, wie der Hauptkomponentenanalyse (PCA), mit Hilfe von Klassifizierungsmodellen, wie *random forest* und der Diskriminanzanalyse (PLS-DA) sowie anhand von *importance*, *boruta* und *box plots* untersucht.

Es werden zunächst nur die deutschen Proben betrachtet, welche vor Ort auf den Höfen der Landwirte/innen gesammelt wurden und somit authentisches Probenmaterial darstellen. Anschließend sollen die deutschen und ausländischen Spargelproben gegenübergestellt und hinsichtlich metabolischer Unterschiede untersucht werden.

Alle verwendeten Daten wurden für die eindeutigere graphische Veranschaulichung logarithmiert. Dies hat eine Auswirkung auf die erklärte Varianz, welche einen kleineren Wert annimmt als bei der Verwendung der Originaldaten und wirkt sich durch die ganzheitliche Anwendung auf alle Spektren nicht nachteilig aus. In der Anwendung der Klassifizierungsmodelle ergeben sich hieraus ebenfalls keine Abweichungen.

5.2.1 Vergleich deutscher Spargelproben

Insgesamt 218 Proben wurden für die statistische Auswertung der Unterschiede innerhalb Deutschlands herangezogen. Im Folgenden soll die Klassifizierung von Spargelproben aus verschiedenen deutschen Bundesländern betrachtet werden. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, müssen eventuell größere Einflussfaktoren ausgeschlossen werden. Insbesondere der Einfluss des Erntejahres, der Sorte sowie der Ernteperiode werden hierbei genauer betrachtet.

5.2.1.1 Nord- und süddeutsche Spargelproben aus den Jahren 2014, 2015 und 2016

Die Fragestellung nach der Authentizität von deutschem Spargel ist insofern von Interesse, da es auch in der Vergangenheit vermehrt zu Verfälschungen innerhalb der BRD gekommen ist.

5 Ergebnisse und Diskussion

So wird vermutet, dass insbesondere im süddeutschen Raum, wo einige geschützte Herkunftsbezeichnungen für Spargel geführt werden (Schrobenhausen, Abensberg, Franken), oft mit Spargel aus anderen deutschen Regionen, in denen der Preis pro Kilogramm geringer ist, verfälscht oder gestreckt wird.

Entsprechend soll im Folgenden diskutiert werden, ob sich nord- und süddeutscher Spargel mit den zur Verfügung stehenden Methoden voneinander abgrenzen lässt. Da diese Regionen die größten Probenumfänge aufweisen und gleichzeitig die größten geographischen Distanzen bieten, ist davon auszugehen, dass dies die statistische Aussagekraft stützt. Die norddeutschen Regionen umfassen Schleswig-Holstein und Niedersachsen, die süddeutschen Regionen decken Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz und Hessen ab. Sie sind jeweils aus den Jahrgängen 2014, 2015 und 2016 und beinhalten die Sorten *Backlim*, *Cumulus*, *Gijnlim* und *Grolim*. Die PCA der Hauptkomponenten 1 und 2 ist in der Abbildung 36 dargestellt.

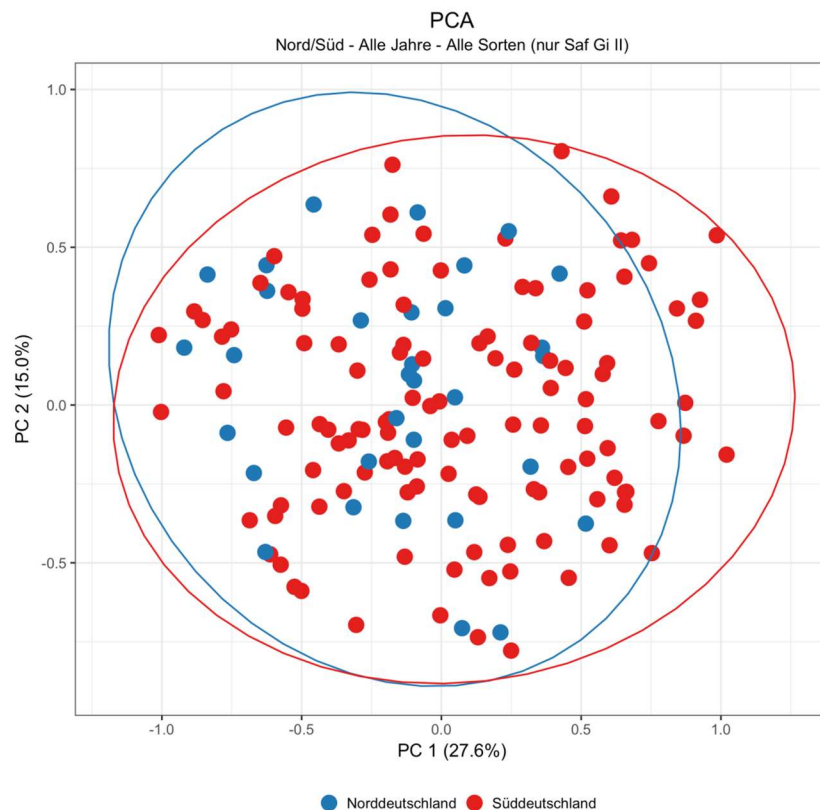


Abbildung 36: Zweidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2: Spargelproben aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot), alle Jahrgänge, alle Sorten

Die Abbildung 36 zeigt, dass die nord- und süddeutschen Spargelproben mittels PCA mit dem aktuellen Probenstand und unter den bisherigen Bedingungen nicht getrennt werden können.

5 Ergebnisse und Diskussion

Die Probengruppen clustern übereinander und es ist keine Zuordnung möglich. Weiterhin beträgt die erklärte Varianz der ersten beiden Hauptkomponenten zunächst nur 42.5 %, was noch keinem allzu hohen Wert entspricht.

Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse werden lediglich graphische Abbildungen generiert, welche ein eventuelles *clustering* abbilden können. Überlappen Bereiche von Probengruppen in einer PCA, so lässt sich schwer sagen, wie sicher eine Zuordnung einzelner Proben ist. Mit Hinblick auf die praktische Anwendbarkeit im Falle von beispielsweise behördlichen Untersuchungen besteht die Notwendigkeit eines Zahlenwertes, anhand dessen eine Zuordnung mit einer bestimmten prozentualen Sicherheit erfolgen kann.

Zu diesem Zweck eignen sich die verschiedenen Klassifikationsmodelle, wie z. B. die Diskriminanzanalyse (PLS-DA), welche sowohl eine gute Verbildlichung der gezielten Unterscheidung von Gruppen, als auch einen entsprechenden Zahlenwert liefert. Das Modell *random forest* wiederum soll eine Zuordnung von Proben zu einer Probengruppe mit Hilfe von sogenannten Entscheidungsbäumen ermöglichen (Punkt 3.4.3) und liefert ebenfalls eine Genauigkeitsrate der Klassifizierung (Gromski *et al.*, 2015). Der PLS-DA *plot* bezüglich dieser Fragestellung ist in Abbildung 37, die Genauigkeitsrate der PLS-DA- und *random forest*-Klassifikation sind in Tabelle 12 dargestellt.

5 Ergebnisse und Diskussion

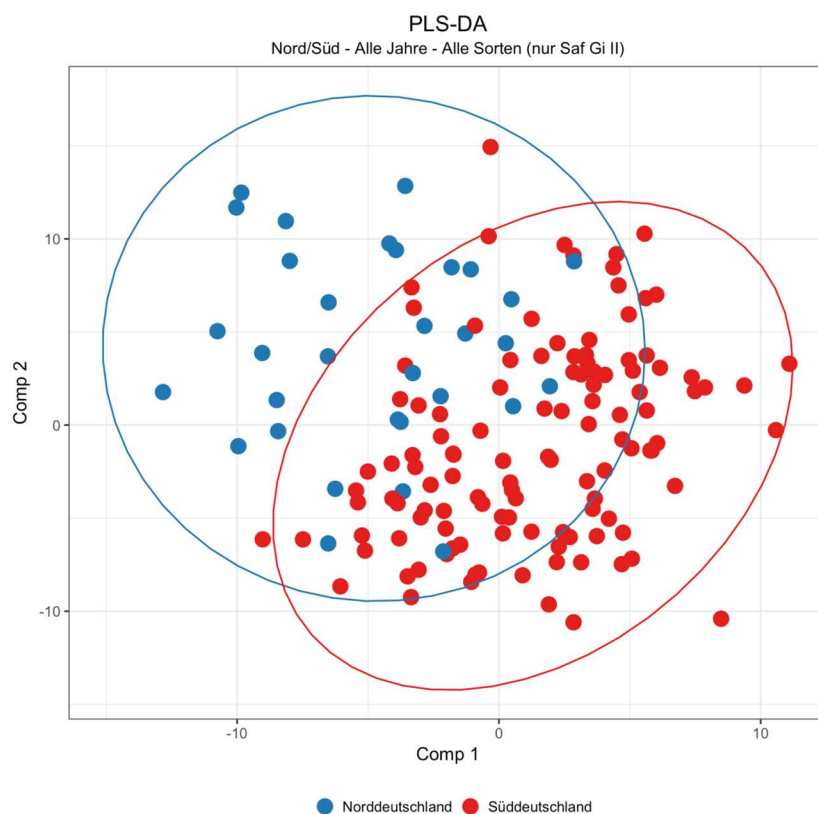


Abbildung 37: PLS-DA von Spargelproben aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot), alle Jahrgänge, alle Sorten

Tabelle 12: Gegenüberstellung der Klassifizierungsergebnisse nord- und süddeutscher Spargelproben aus den Jahren 2014, 2015 und 2016 mit allen Sorten

	PLS-DA	<i>random forest</i>
Nord/Süd-DE – alle Jahre, alle Sorten	88.2 %	83.8 %

Eine visuelle Zuordnung anhand der PCA oder PLS-DA ist bisher noch nicht eindeutig; ein leichtes *clustering* im PLS-DA *plot* ist jedoch erkennbar. Die große Probenanzahl (153) führt dabei zu einer recht stabilen und bis hierhin ausreichend guten Genauigkeit der beiden Klassifikationsmodelle PLS-DA und *random forest*, wobei die PLS-DA mit 88.2 % ein etwas besseres Ergebnis liefert als die Klassifikation mittels *random forest* mit nur 83.8 %.

Im Folgenden sollen die möglichen Einflussfaktoren, wie Sorte und Ernteperiode, hinsichtlich der Verbesserung der Klassifizierbarkeit, insbesondere mittels PLS-DA und *random forest* analysiert werden.

5.2.1.2 Nord- und süddeutsche Spargelproben der Sorte *Gijnlim* aus den Jahren 2014, 2015 und 2016

Im Rahmen dieses Projektes wurden bevorzugt die deutschen Hauptanbausorten *Backlim*, *Cumulus*, *Gijnlim* und *Grolim* gesammelt. Um einen möglichen Sorteneinfluss auf die Trennung nord- und süddeutscher Spargelproben zu überprüfen, können nur die Proben der Sorte *Gijnlim* verwendet werden, da die Probenanzahlen der übrigen Sorten mit weniger als $[2 \text{ (Nord/Süd)} \cdot 3 \text{ (2014/2015/2016)} \cdot 3 \text{ (Beobachteranzahl für alle sechs Zellen in einer zwei-dimensionalen Kreuztabelle)} \equiv] 18$ Proben für eine statistische Analyse zu gering sind (Universität Köln, 2001).

In Abbildung 38 ist der *scores plot* der PCA zu der Trennungsfrage nach nord- und süddeutschen Spargelproben der Sorte *Gijnlim* dargestellt. Mit Hilfe der Klassifikationsmodelle PLS-DA (Abbildung 39) und der *accuracy rate*-Gegenüberstellung aus PLS-DA und *random forest* (Tabelle 13) soll die Unterscheidbarkeit anhand einer gerichteten Fragestellung veranschaulicht werden.

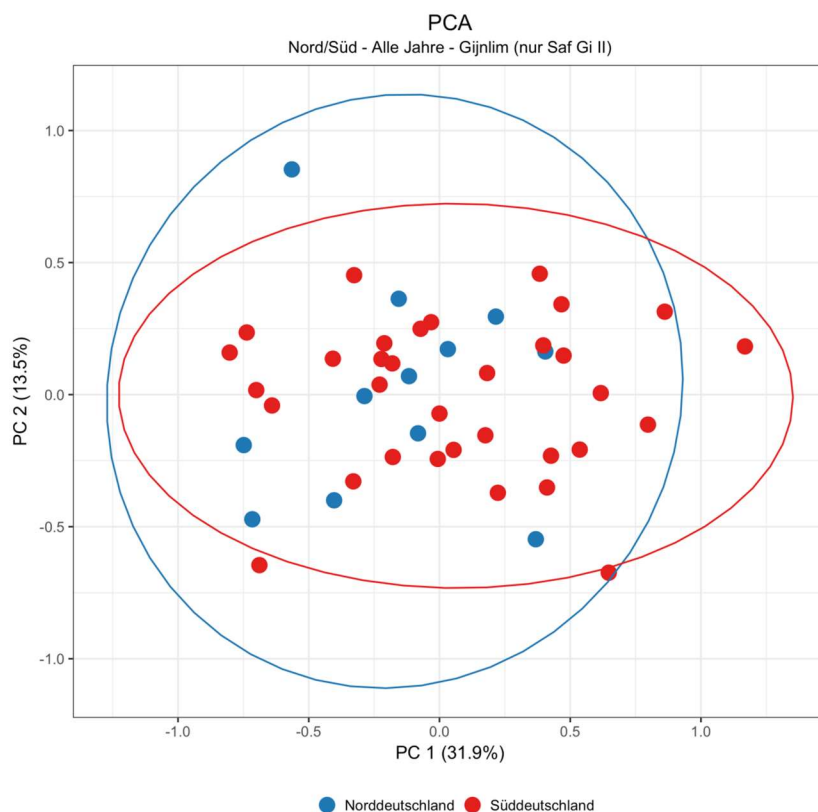


Abbildung 38: Zweidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2: Spargelproben der Sorte *Gijnlim* aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot), alle Jahrgänge

5 Ergebnisse und Diskussion

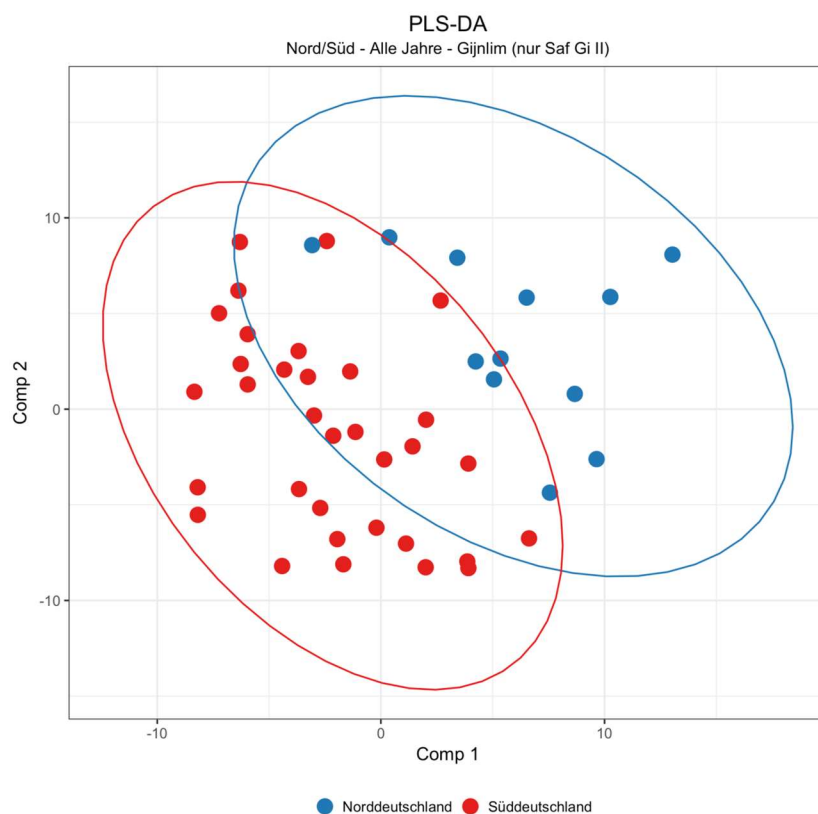


Abbildung 39: PLS-DA von Spargelproben der Sorte *Gijnlim* aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot), alle Jahrgänge

Tabelle 13: Gegenüberstellung der Klassifizierungsergebnisse nord- und süddeutscher Spargelproben aus den Jahren 2014, 2015 und 2016 der Sorte *Gijnlim*

	PLS-DA	<i>random forest</i>
Nord/Süd-DE – alle Jahre, nur <i>Gijnlim</i>	78.2 %	76.2 %

Die in der PCA (Abbildung 38) dargestellten ersten beiden Hauptkomponenten erreichen nun eine etwas höhere erklärte Varianz von 45.4 %. Weiterhin zeigt der *plot* der PLS-DA (Abbildung 39) bereits einen eindeutigen Trend der *Gijnlim*-Proben bezüglich der Trennung nach Nord- und Süddeutschland. Allerdings verschlechtern sich die *accuracy rates* der Klassifikationsmodelle auf 78.2 % (PLS-DA) bzw. 76.2 % (*random forest*) im Vergleich zu der Klassifikation ohne Ausschluss der anderen Sorten (Tabelle 12), was wahrscheinlich mit der weitaus geringeren Probenanzahl in Zusammenhang steht.

Es leitet sich die Frage ab, ob die Sorte einen Einfluss auf die Trennung der Gruppen besitzt. Trotz nicht vereinbar, verschlechterter *accuracy rates* der Klassifikationsmodelle zeigt sich für diesen Versuch eine höhere erklärte Varianz in der PCA und ein deutlicher Trend in der PLS-DA, was auf eine bessere Trennung der Gruppen hindeutet. Eine Aussage zum Einfluss

5 Ergebnisse und Diskussion

der Sorte kann an dieser Stelle nicht formuliert werden, da die Frage bislang nur mit dem hier untersuchten Probenquerschnitt nord- und süddeutsche Proben aus 2014, 2015 und 2016 der Sorte *Gijnlim* praktisch verfolgt werden konnte. Die Probenanzahl der übrigen Sorten und Anbauggebiete ist zu gering. Weiterhin können keine Aussagen darüber getroffen werden, ob die Ergebnisse auf die Erntejahre 2017 und 2018 übertragbar sind; dies wäre in einer weiterführenden Arbeit untersuchen.

Im Folgenden wird die Klassifizierung nord- und süddeutscher *Gijnlim*-Spargelproben aus jeweils nur einem Jahrgang mit Hilfe der statistischen Werkzeuge untersucht.

5.2.1.3 Nord- und süddeutsche Spargelproben der Sorte *Gijnlim* des Erntejahres 2015 bzw. 2016

Die akquirierten Proben werden hinsichtlich des potentiellen Einflusses der verschiedenen Erntejahre auf die Klassifizierung nord- und süddeutscher Spargelproben untersucht. Um einen Einfluss des Erntejahres ausschließen oder feststellen zu können, wird der Klassifikator für *random forest* und die PLS-DA zur Unterscheidung der Erntejahre trainiert.

Eine Aussage über den Erntejahrgangseinfluss der deutschen Proben aus 2014 kann im Rahmen dieser Untersuchung nicht getroffen werden, da die Anzahl an Proben der Sorte *Gijnlim* für dieses Jahr zu geringt ist (eine Probe aus Norddeutschland, sechs aus Süddeutschland, in Summe 7, somit < 18, siehe Punkt 5.2.1.2).

Abbildung 21 unter Punkt 5.1.2 zeigt deutlich, dass sich die Probengruppe aus 2014 stark von den übrigen Gruppen der Erntejahre 2015 und 2016 abgrenzt, was möglicherweise mit der unterschiedlichen Lagerung während des Transports im Rahmen der Probenahme in Zusammenhang steht. Aufgrund der geringen Probenanzahl und der fehlenden Vergleichbarkeit infolge der geänderten Probenahme- und Probenvorbereitungsbedingungen wird die Probengruppe aus dem Jahr 2014 daher für alle folgenden Untersuchungen ausgeschlossen.

In Abbildung 40 und Abbildung 41 sind die PCAs der nord- und süddeutschen Spargelproben jeweils aus den Jahren 2015 und 2016 für die Sorte *Gijnlim* dargestellt. Mittels PLS-DA wird in Abbildung 42 (2015) sowie Abbildung 43 (2016) und in Tabelle 14 mit Hilfe der Gegenüberstellung der Klassifikationsmodelle (PLS-DA, *random forest*) die Klassifizierung dargestellt.

5 Ergebnisse und Diskussion

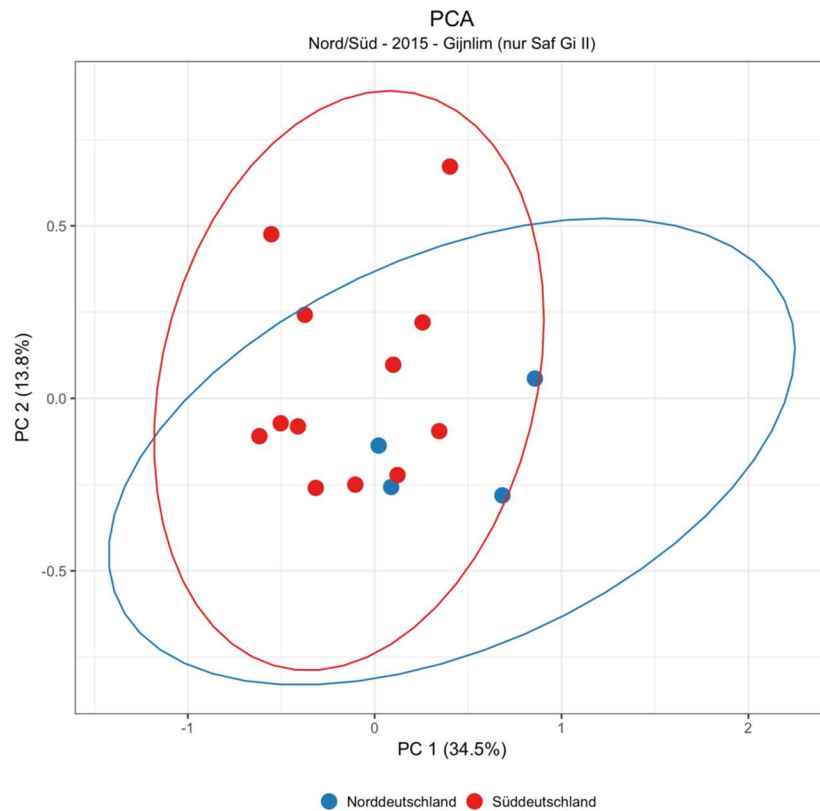


Abbildung 40: Zweidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2: Spargelproben der Sorte *Gijnlim* des Erntejahres 2015 aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot)

5 Ergebnisse und Diskussion

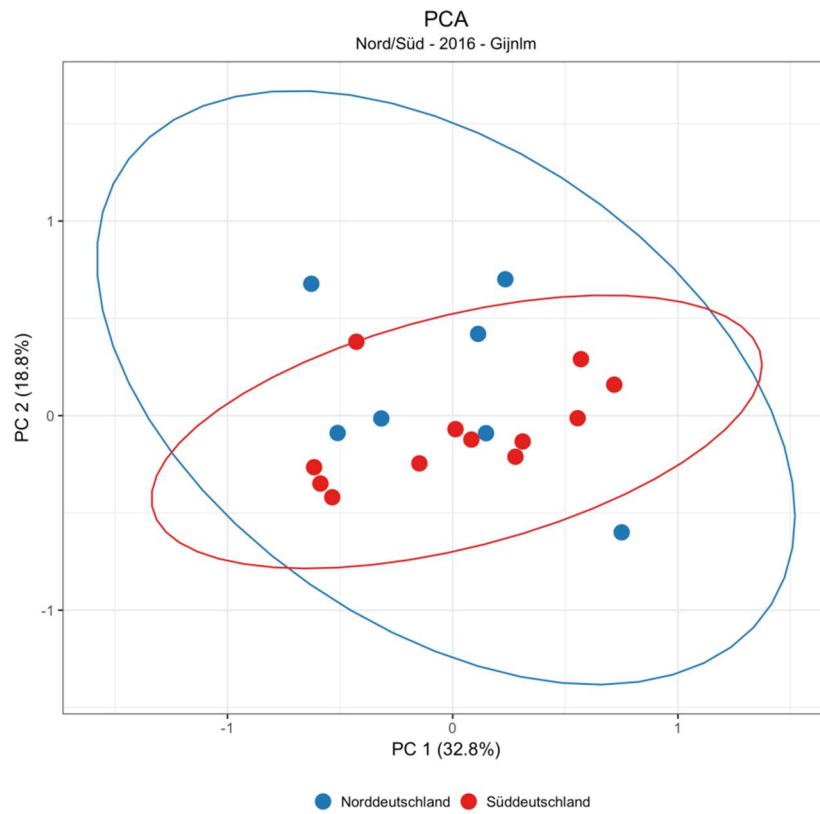


Abbildung 41: Zweidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2: Spargelproben der Sorte *Gijnlim* des Erntejahres 2016 aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot)

5 Ergebnisse und Diskussion

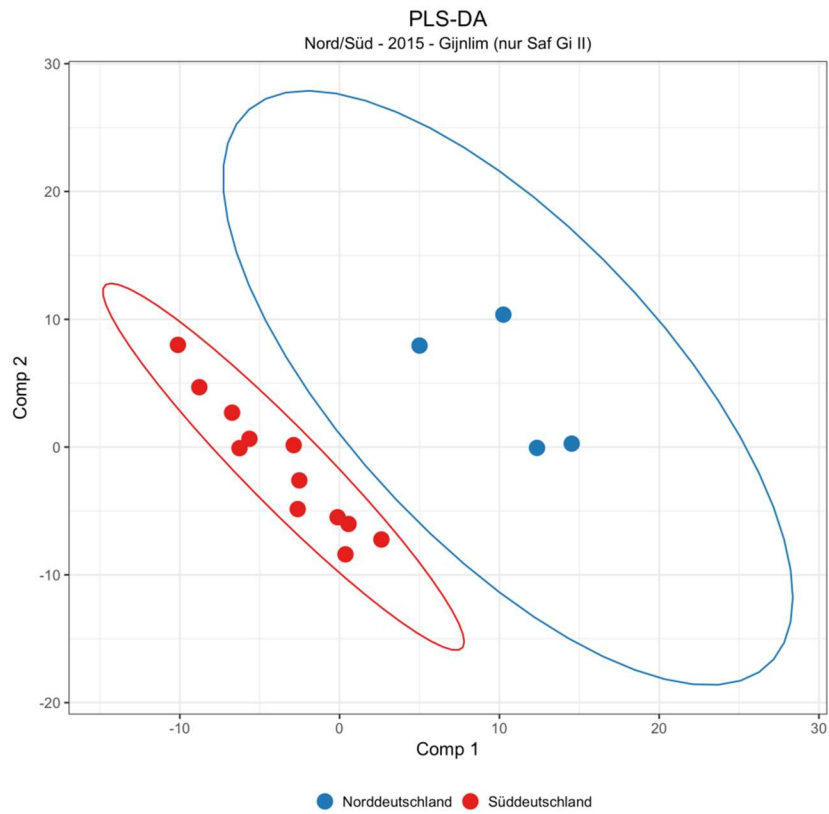


Abbildung 42: PLS-DA von Spargelproben der Sorte *Gijnlim* des Erntejahres 2015 aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot)

5 Ergebnisse und Diskussion

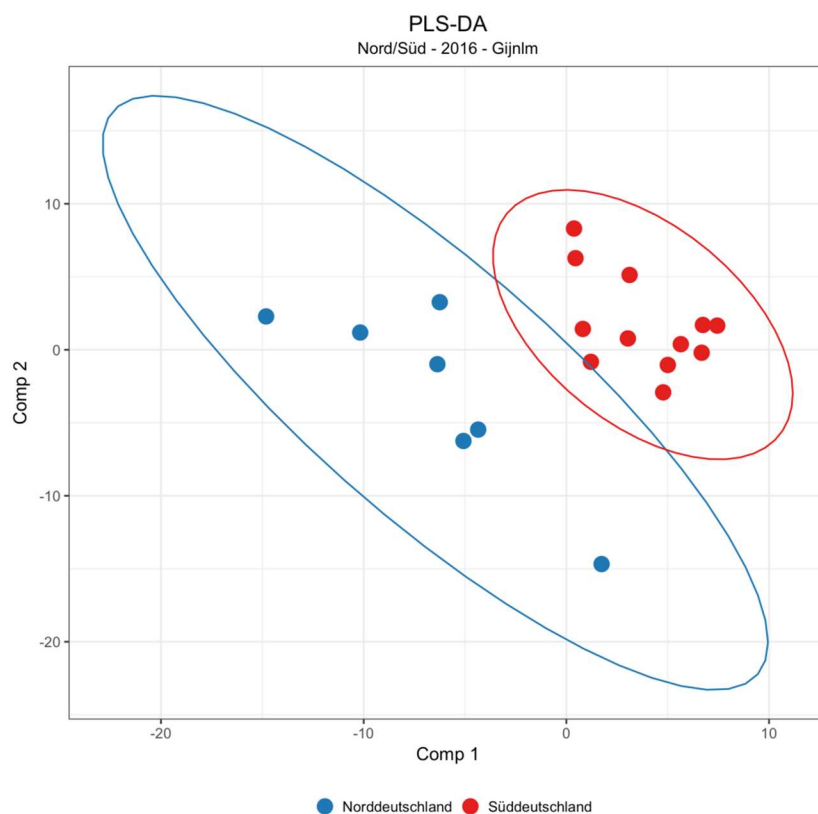


Abbildung 43: PLS-DA von Spargelproben der Sorte *Gijnlim* des Erntejahres 2016 aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot)

Tabelle 14: Gegenüberstellung der Klassifizierungsergebnisse nord- und süddeutscher Spargelproben aus den Jahren 2015 bzw. 2016 der Sorte *Gijnlim*

	PLS-DA	<i>random forest</i>
Nord/Süd-DE – 2015, nur <i>Gijnlim</i>	95.0 %	85.0 %
Nord/Süd-DE – 2016, nur <i>Gijnlim</i>	85.0 %	80.0 %

Die Ergebnisse der PCAs lassen, bis auf einen Trend im Gruppenclustering, keine eindeutige Aussage über die Trennbarkeit der beiden Gruppen zu. Die erklärten Varianzen von 48.3 % (2015) und 51.6 % (2016) sind – wenn auch nicht sehr viel – höher als in Punkt 5.2.1.1 und Punkt 5.2.1.2, weshalb die beschriebenen Beobachtungen (Trend, erklärte Varianz) in Relation zu der geringen Probenanzahl als statistisch glaubwürdig und plausibel einzustufen sind. Auch die PLS-DA *plots* zeigen, dass eine Trennung der nord- und süddeutschen *Gijnlim*-Proben für die einzelnen Jahre 2015 und 2016 visuell eindeutiger ist. Mit signifikant angestiegenen *accuracy rates* der Klassifizierungsmethoden von bis zu 95.0 % (PLS-DA, Nord/Süd-DE, 2015, Gi) im Vergleich zu den Ergebnissen ohne Differenzierung der Sorten- (Punkt 5.2.1.1) und Jahrgangseinflüsse (Punkt 5.2.1.2) deckt sich das Ergebnis mit den

5 Ergebnisse und Diskussion

graphischen Darstellungen der PLS-DAs. Es wird eine sehr klare zweidimensionale Trennung der Gruppen erreicht, wenn auch für die Proben aus 2016 noch ein gewisser Überlappungsbereich existiert. Dieser Umstand ist bislang noch nicht geklärt.

Es ist festzuhalten, dass der Erntejahrgang einen erheblichen Einfluss auf das Metabolom und damit auf die Klassifizierbarkeit der in dieser Arbeit gewählten Spargelproben besitzt. Diese Ergebnisse sind, trotz der sehr limitierten Probenanzahl an metabolisch wenig differenzierten Proben, als sehr positiv für die zugrundeliegende Studie zu bewerten. Dennoch ist von einem direkten Transfer der Aussagen zum Einfluss von Sorte und Erntejahr auf ähnliche Fragestellungen, u. U. mit einer anderen Untersuchungsmatrix, auf Grundlage der vorliegenden Klassifizierungsergebnisse, abzuraten.

5.2.1.4 Nord- und süddeutsche Spargelproben aus dem Jahr 2015 zur Untersuchung des Ernteperiodeneinflusses

In den untersuchten Jahrgängen 2014 bis 2016 sollten die Probenahmen stets im ungefähr gleichen Zeitraum stattfinden, um einen möglichen Einfluss durch den Zeitpunkt der Probenahme innerhalb einer Ernteperiode weitestgehend auszuschließen. Entsprechend wurde jede Probenahme in der dritten oder vierten Woche im Mai anberaumt.

Im Jahr 2015 wurde zur Überprüfung dieses Einflusses vier Mal im Abstand von drei Wochen von Mitte April bis Ende Juni je eine Probenahme bei einem Spargelanbauer in Schleswig-Holstein (Spargelhof Schäfer, Wiemersdorf) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um die Proben 15-DE-SH-Saf-Gi-I, 15-DE-SH-Saf-Gi-II, 15-DE-SH-Saf-Gi-III und 15-DE-SH-Saf-Gi-IV. Bei allen vier Probenahmen wurde die Sorte *Gijnlim* vom selben Feld akquiriert, um auch den Sorteneinfluss ausschließen zu können. In den Untersuchungen unter Punkt 5.2.1.1, Punkt 5.2.1.2 und Punkt 5.2.1.3 wurde jeweils nur eine der vier Proben aus der Ernteperiode-Versuchsreihe (15-DE-SH-Saf-Gi-II) einbezogen, da diese zu einem Zeitpunkt akquiriert wurde, welcher zeitlich am nächsten an der Spargelprobenahmetour lag.

Es ist zu überprüfen, ob die graphische Trennung beeinflusst wird, wenn Proben außerhalb des Zeitrahmens der Probenahmetour – wie es insbesondere bei den ausländischen Proben gezwungenermaßen der Fall ist – hinzugezogen werden. In Abbildung 44 und Abbildung 45 sind die *plots* der PCA und PLS-DA der nord- und süddeutschen Proben, inklusive aller Proben der Ernteperiode-Versuchsreihe aus dem Jahr 2015 (15-DE-SH-Saf-Gi-I bis IV), dargestellt. Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse der Klassifikationsmodelle PLS-DA und *random forest*.

5 Ergebnisse und Diskussion

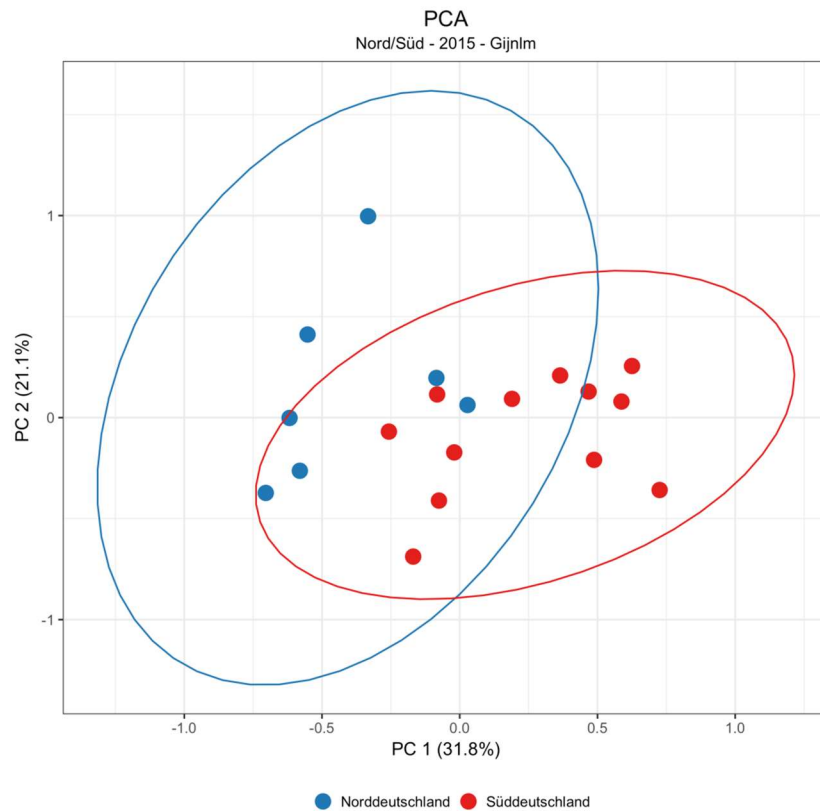


Abbildung 44: Zweidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2: Spargelproben der Sorte *Gijnlim* des Erntejahres 2015 aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot), inkl. Ernteperiode-abdeckende Proben

5 Ergebnisse und Diskussion

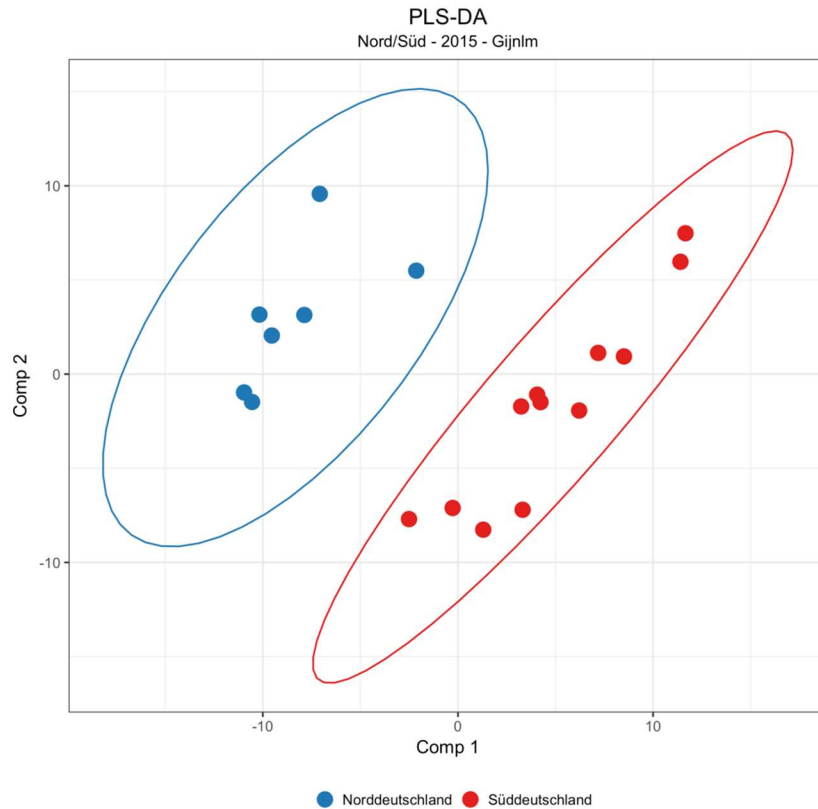


Abbildung 45: PLS-DA von Spargelproben der Sorte *Gijnlim* des Erntejahres 2015 aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot); inkl. Ernteperiode-abdeckende Proben

Tabelle 15: Gegenüberstellung der Klassifizierungsergebnisse nord- und süddeutscher Spargelproben aus dem Jahr 2015 der Sorte *Gijnlim* inkl. Ernteperiode-abdeckende Proben

	PLS-DA	<i>random forest</i>
Nord/Süd-DE – 2015, alle <i>Gijnlim</i>-Proben	96.7 %	96.7 %

Die *plots* in Abbildung 44 und Abbildung 45 im Vergleich zu Abbildung 40 und Abbildung 42 deuten darauf hin, dass ein abweichendes Probenahmedatum innerhalb eines Erntejahres keine negative Auswirkung auf die graphische Darstellung besitzt. Die erklärte Varianz der PCA verbessert sich sogar etwas (52.9 %); dies wird wahrscheinlich durch die höhere Anzahl an Proben aus Schleswig-Holstein zu begründen sein.

Unter Einbeziehung der vier Proben dieses Ernteperiodenversuches wurde eine sehr gute Genauigkeitsrate von 96.7 % in beiden Klassifizierungsmodellen erreicht. Im Vergleich mit den in Punkt 5.2.1.3 erreichten 85 % (*random forest*) bis 95 % (PLS-DA) (Berechnung für das Jahr 2015, nur *Gijnlim*) wird also eine Verbesserung der Ergebnisse erzielt. Es ist daher nicht davon auszugehen, dass sich der Erntezeitpunkt im Rahmen einer Ernteperiode nachteilig auf das statistische Modell auswirkt. Wäre die Variable Einflussgebend, müssten sich eine

5 Ergebnisse und Diskussion

schlechtere Trennung und Klassifizierungsgenauigkeit ergeben, was hier nicht der Fall ist. Daher ist anzunehmen, dass der Anstieg der *accuracy rates* ebenfalls mit der höheren Probenanzahl begründet werden kann. Es ist demnach lediglich zu vermuten – jedoch im Rahmen dieses Projektes nicht überprüfbar –, dass der Einfluss des Probenahmezeitpunktes innerhalb einer Ernteperiode nicht größer ist als die geographischen Einflussfaktoren zwischen nord- und süddeutschen Spargelproben oder das Erntejahr.

5.2.2 Vergleich deutscher und ausländischer Spargelproben

Von besonderem wirtschaftlichem Interesse ist die Herkunftsanalyse von weißem Spargel aufgrund verschiedener Täuschungsfälle, bei denen vermutet wird, dass dieser aus dem Ausland nach Deutschland transportiert und illegalerweise als deutscher Spargel vertrieben wurde.

Für die Herkunftsunterscheidung werden folgende relevante Anbauländer des Spargels herangezogen: Polen, Niederlande, Spanien, Griechenland und Peru. Spargel aus diesen Ländern wird zum Ausgleich des deutschen Marktes sehr häufig importiert (siehe Punkt 3.1.4). Das vom Mittelmeer und der höheren Sonneneinstrahlung geprägte Klima sowie die Bodenzusammensetzung (Luvisol-Böden und kalkhaltige Braunerden) in Spanien und Griechenland lassen vermuten, dass Unterschiede in der Metabolitzusammensetzung feststellbar sind (Fink *et al.*, 2016; Torrent *et al.*, 2010). Ebenso ist zu erwarten, dass sich die peruanischen Spargelproben aufgrund der Höhenlage, der Böden und des Klimas von den deutschen Proben unterscheiden (Transamerika, 2009).

Insgesamt konnten 61 ausländische Spargelproben kommerziell erworben werden (60 aus den Jahren 2015 und 2016). Die Proben aus den Niederlanden wurden dabei zu 100 % von den Höfen selbst, von Verkaufsautomaten an den Höfen oder im Einzelhandel vor Ort mit einer eindeutigen Herkunftsdeklaration erworben. Weiterhin war die Zuordnung der Sorte in sieben von zehn Fällen bei den niederländischen Proben möglich. Zertifikate, welche die Authentizität der restlichen ausländischen Proben bestätigen, existieren nicht. Daher muss sich auf die Angaben auf den Etiketten, bzw. auf die Deklarationen und Aussagen der Händler von losen Waren bezogen werden. Einen Grund für eine absichtlich falsche Herkunftsangabe von ursprünglich deutschem Spargel gibt es bislang nicht, weshalb im Rahmen dieses Forschungsprojekts davon ausgegangen werden kann, dass zumindest die Angabe des Herkunftslandes korrekt ist.

Im Folgenden werden die verschiedenen Fragestellungen und Ergebnisse der statistischen Auswertung der Spargelproben aus den unterschiedlichen Herkunftsländern dargestellt und diskutiert.

5.2.2.1 Spargelproben aus Deutschland, Polen, Niederlande, Spanien, Griechenland und Peru

Hauptkomponentenanalyse

Zunächst sollen die Spargelproben aller Länder mittels Hauptkomponentenanalyse betrachtet werden. Von Interesse ist ein mögliches *clustering* sowie die Auswirkung der Daten aus dem Jahrgang 2014 auf die statistische Aussage. In der Abbildung 46 und Abbildung 47 sind die 3D-scores *plots* der Hauptkomponentenanalysen aller Spargelproben aus Deutschland, Polen, den Niederlanden, Spanien, Griechenland und Peru der Jahre 2014, 2015 und 2016 (279 Proben) bzw. vergleichend aus 2015 und 2016 (237 Proben) dargestellt.

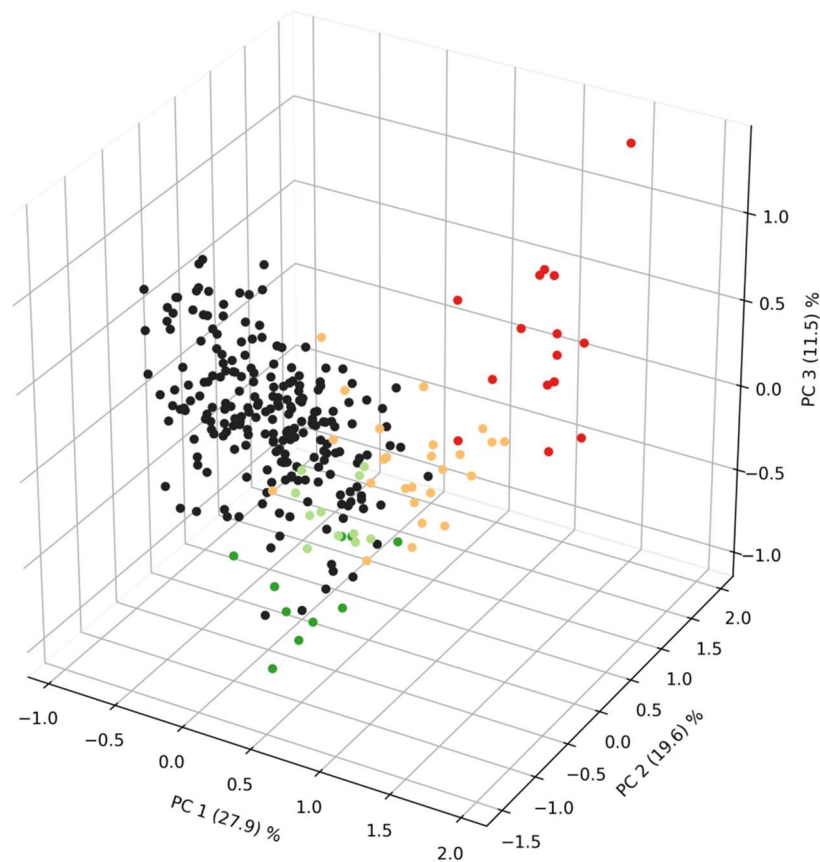


Abbildung 46: Dreidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2/PC3: Spargelproben aus Deutschland (schwarz), Niederlande (grün), Polen (hellgrün), Spanien (ocker), Griechenland (orange), Peru (rot), aus den Jahren 2014, 2015 und 2016, alle Sorten

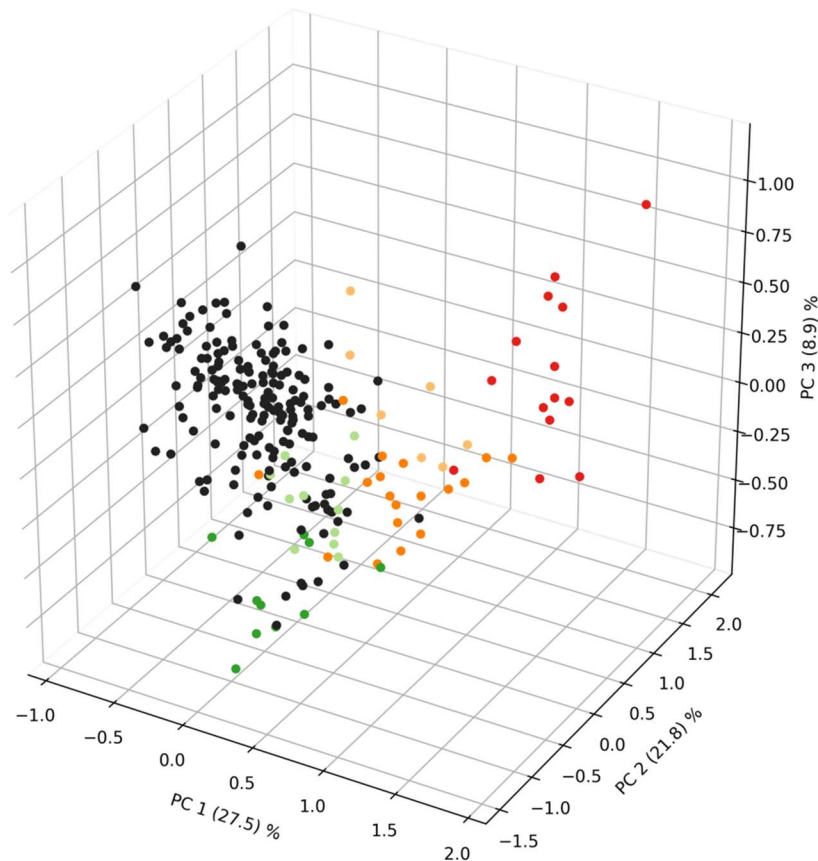


Abbildung 47: Dreidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2/PC3: deutsche (schwarz), niederländische (grün), polnische (hellgrün), spanische (ocker), griechische (orange) und peruanische (rot) Spargelproben der Jahrgänge 2015 und 2016, alle Sorten

Abbildung 46 und Abbildung 47 zeigen gleichermaßen, dass die deutschen Proben den Datenswerpunkt im *scores plot* bilden. Die niederländischen (grün) und polnischen (hellgrün) Proben konzentrieren sich im unteren Bereich der deutschen Probenwolke. Zwar zeigt sich ein *clustering* der Nachbarlandsproben, allerdings ist die Streuung innerhalb der beiden Probengruppen (PL, NL) größer als die Trennung zu den einzelnen anderen Gruppen, so dass eine eindeutige Zuordnung der Gruppenzugehörigkeit mittels dieser PCA nicht möglich ist. Weiterhin wird ersichtlich, dass die spanischen (ocker) und griechischen Proben (orange) klare Trends zur Separierung aufweisen, während die peruanischen Proben (rot) vollständig getrennt vorliegen. Trotz des noch nicht perfekten *clusterings* der Einzelgruppen wird eine erklärte Varianz von 59 % bzw. 58.2 % erzielt, was wiederum auf die große Probenanzahl zurückzuführen sein kann. Einen verhältnismäßig großen Beitrag zur Aufspaltung der Probengruppen scheinen die Komponenten PC1 und PC3 zu leisten.

Die Hypothese, dass geographisch weiter entfernte Proben einen stärkeren Einfluss auf die graphische Trennung besitzen, wird im weiteren Verlauf der Arbeit unter Punkt 5.2.2.2, Punkt 5.2.2.3 und Punkt 5.2.2.4 diskutiert. An dieser Stelle erfolgt unter anderem auch die genauere

5 Ergebnisse und Diskussion

Auswertung der Separierung der Spargelproben aus den Nachbarländern Deutschland, Polen und den Niederlanden.

Die Datenanalyse aller deutschen Proben aus den drei Jahrgängen (2014 bis 2016) im Vergleich zur Einbeziehung von nur zwei Jahrgängen (2015, 2016) besitzt makroskopisch zunächst keine allzu große Auswirkung auf die graphische Anordnung der Probengruppen. Das *clustering* der Länder-Gruppen wird durch das Einfügen oder Ausschließen der Proben aus 2014 nicht signifikant verändert. Die erklärten Varianzen der PC1/PC2/PC3 ähneln sich ebenfalls sehr stark: 59.0 % (Abbildung 46) und 58.2 % (Abbildung 47). Auf dieser Erkenntnis basierend wird vermutet, dass – im Gegensatz zu den Ergebnissen der innerdeutschen Auswertung – ein Herkunftseinfluss, bedingt beispielsweise durch größere geographische Distanzen und damit oft auch größere klimatische Unterschiede, eine übergeordnete Rolle gegenüber dem Erntejahrgangseinfluss spielt. Daher wurden – in Einstimmung mit der Argumentation und Entscheidung aus Punkt 5.2.1.3 in Verbindung mit Abbildung 21 – die Proben aus dem Jahr 2014 für die weiteren Untersuchungen nach Länderunterschieden außenvorgelassen. Weiterhin besteht ohnehin ein starkes Ungleichgewicht zwischen deutschen und ausländischen Proben, sodass 41 weitere deutsche Proben aus 2014 keine gravierende Verbesserung oder Verschlechterung der statistischen Aussage hervorrufen.

Klassifikationsmodelle PLS-DA und *random forest*, inklusive *confusion matrix*

Im Folgenden wird die Güte der *random forest* und PLS-DA Klassifizierungen mit Bezug auf die Anzahl der einbezogenen Ländergruppen betrachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Gegenüberstellung der Klassifizierungsergebnisse deutscher, polnischer, niederländischer, spanischer, griechischer und peruanischer Spargelproben aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten

	PLS-DA	<i>random forest</i>
DE/NL/PL/ES/GR/PE, 2015/2016	77.6 %	88.6 %

Mit den abgebildeten *accuracy rates* von 88.6 % bei der *random forest*-Klassifikation und 77.6 % bei der PLS-DA ist noch keine hinreichende Genauigkeit gegeben. Insgesamt scheint die Vorhersagemethode mittels *random forest* besser zu funktionieren als mit Hilfe der PLS-DA. Grund für die unzureichende Vorhersagegenauigkeit ist die große Gruppenvielfalt bei stark unterschiedlichen Gruppengrößen und daraus resultierenden, verhältnismäßig hoch frequentierten Fehlzuordnungen auf Seiten der ausländischen Probengruppen. Dies wird auch in der *confusion matrix* deutlich, die als eine Darstellungsform zur Gegenüberstellung der korrekten und falschen Zuordnungen eines Klassifikationsmodells sowie der jeweiligen

5 Ergebnisse und Diskussion

gruppenspezifischen Genauigkeitsraten fungiert. Solch eine Matrix wird in den folgenden Unterkapiteln zu Vergleichszwecken angeführt, um zu beobachten, welchen Effekt die Reduktion der Gruppenanzahl besitzt.

Zunächst werden alle sechs Länder betrachtet, anschließend werden einige Länder in Untergruppen zusammengefasst (vier Gruppen) und letztlich die deutschen den ausländischen Proben gegenübergestellt (zwei Gruppen). Auf diese Weise sollen Fehlzuordnungen durch den *classifier* aufgrund zu ähnlicher Metabolitzusammensetzungen vermieden werden. In Abbildung 48 ist die *confusion matrix* der Spargelproben aus den sechs Ländern für die Jahre 2015 und 2016 dargestellt.

	DE	PL	NL	ES	GR	PE	TPR FNR [%]
DE	173	1	2	0	1	0	97.7 2.3
PL	4	6	0	0	1	0	54.5 45.5
NL	8	0	1	0	1	0	10.0 90.0
ES	0	0	0	3	4	0	42.9 57.1
GR	4	0	0	1	13	0	72.2 27.8
PE	0	0	0	0	0	14	100.0 0.0

Abbildung 48: *confusion matrix* der *random forest*-Klassifikation aller Spargelproben aus Deutschland (DE), Polen (PL), den Niederlanden (NL), Spanien (ES), Griechenland (GR) und Peru (PE) aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten; rechts: richtig positive (obenstehend) sowie falsch negative (untenstehend) *accuracy rates*

Es werden sowohl die korrekten Klassenzuordnungen (*true positive*), als auch Fehlzuordnungen (*false negative*) im Vergleich zur Gesamtprobenanzahl einer Gruppe dargestellt (TPR bzw. FNR). Die resultierende korrekte Zuordnungsrate wird mit der *accuracy rate* angegeben (TPR).

Im vorliegenden Fall zeigt die *accuracy rate*, dass die peruanischen Proben zu 100 % korrekt ihrer Gruppe zugeordnet werden können. Mit ~98 % korrekter Vorhersage liegen die deutschen Proben gleich dahinter, gefolgt von griechischem (~72 %), polnischem (~55 %), spanischem (~43 %) und niederländischem Spargel (10 %). Die *accuracy rate* aller ausländischen Proben beträgt im Schnitt 61.7 % und die Gesamt-*accuracy* 88.6 %.

5 Ergebnisse und Diskussion

Diese Werte sind differenziert zu betrachten, da sich Fehlzuordnungen bei kleineren Probengruppen schneller bemerkbar machen als bei stabilen, großen Gruppen. Die Probenanzahl aus den einzelnen Ländern ist stark unterschiedlich. So liegen aus Deutschland 177 Proben vor, während aus dem Ausland nur 7 bis 18 Spargelproben pro Herkunftsland zur Verfügung stehen. Auffällig ist die schwierige Klassifizierbarkeit der niederländischen Proben, da hier nur 10 % der Proben korrekt zu der niederländischen Gruppe und 90 % anderen Probengruppen (80 % der deutschen Gruppe) zugeordnet wurden. Das Klassifikationsmodell funktioniert optimal mit größeren Probengruppen. Darüber hinaus wird das Klassifikationsmodell durch Gruppen ähnlicher Größe stabilisiert. (Pett, 2016)

Weiterhin ist in den Abbildungen zu sehen, dass sich die deutschen, niederländischen und polnischen Proben oftmals einander zuordnen, was zwischen den Gruppen Deutschland und Spanien, Griechenland oder Peru sehr viel seltener bis nie der Fall ist. Ein ähnliches Phänomen ist auch bei den Proben aus Spanien und Griechenland untereinander zu beobachten. Dies kann mit den sehr ähnlichen, geographisch bedingten, äußeren Einflussfaktoren in Zusammenhang stehen, welche keine statistisch verifizierbaren Unterschiede im Metabolom hervorrufen (Fink *et al.*, 2016; Torrent *et al.*, 2010). Es ist daher zu erwarten, dass sich Fehlzuordnungen durch den *classifier* bei einer Reduzierung der Probengruppen minimieren lassen und somit die Genauigkeit zunimmt; diese Hypothese soll im weiteren Verlauf (siehe Punkt 5.2.2.3 und 5.2.2.4) überprüft werden.

Oversampling

Wie unter Punkt 3.4.3.1 beschrieben, bietet sich zum Angleich der unterschiedlichen Gruppengrößen das SMOTE-*Oversampling* an. Insbesondere die niederländische, polnische und spanische Probengruppe schlossen hinsichtlich der erreichten *accuracies* nicht zufriedenstellend ab, weshalb diese Methode als erfolgversprechend zu betrachten ist. Das SMOTE-*Oversampling* wurde für alle Probengruppen, außer für die deutsche Probengruppe, vorgenommen. Die resultierende *confusion matrix* ist in Abbildung 49 zu sehen.

5 Ergebnisse und Diskussion

	DE	PL	NL	ES	GR	PE	TPR FNR [%]
DE	156	5	13	0	3	0	88.1 11.9
PL	2	8	0	0	1	0	72.7 27.3
NL	1	1	8	0	0	0	80.0 20.0
ES	0	0	0	6	1	0	85.7 14.3
GR	0	2	1	2	13	0	72.2 27.8
PE	0	0	0	0	0	14	100 0

Abbildung 49: confusion matrix der random forest-Klassifikation aller Spargelproben aus Deutschland (DE), Polen (PL), den Niederlanden (NL), Spanien (ES), Griechenland (GR) und Peru (PE) aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten; rechts: richtig positive (obenstehend) sowie falsch negative (untenstehend) accuracy rates (Nested-Cross-Validation; 10-fache interne Validierung; SMOTE-Oversampling; boruta)

Die Gesamtzahl korrekt zugeordneter Proben ist mit Hilfe des SMOTE-Oversamplings gestiegen. So konnten die accuracies der Gruppen Niederlande, Polen und Spanien auf 80 %, 72.7 % und 85.7 % heraufgesetzt werden. Die Vorhersagegenauigkeit der bereits zuvor – und ohne SMOTE-Oversampling – durchgeführten, sehr gut klassifizierbaren griechischen und peruanischen Proben blieb unverändert (72.2 % und 100 %). Verschlechtert hat sich die Genauigkeit der deutschen Spargelproben (88.1 %), da im Zuge der Gruppengrößenangleichung zugunsten der anderen Probengruppen Abstriche auf Seiten der Proben-stärksten Gruppe zu verzeichnen waren. Bei genauerer Analyse fällt auf, dass die fehlzugeordneten, deutschen Proben überwiegend aus den Grenzregionen zwischen Deutschland und den Nachbarländern Polen und den Niederlanden stammen. Die accuracy rate aller ausländischen Proben beträgt mit Hilfe der SMOTE-Oversampling-gestützten Klassifizierung im Schnitt 81.7 % und die Gesamt-accuracy 86.5 %, womit ein vertretbarer Verlust von etwa 2 Prozentpunkten im Vergleich zu der Gesamt-accuracy ohne SMOTE-Oversampling (88.6 %) zu verzeichnen ist. Die verstärkte Stabilität und accuracy der ausländischen Gruppen um 20 Prozentpunkte mit Hilfe des SMOTE-Oversamplings sind für die Gesamtheit aller Proben und Probengruppen als großer Gewinn zu bewerten.

5.2.2.2 Spargelproben aus Deutschland und den Nachbarländern

An dieser Stelle soll auf die Unterscheidbarkeit von Spargel aus den mitteleuropäischen Nachbarländern Deutschland, Niederlande und Polen eingegangen werden. Zur genaueren Betrachtung der Gruppierung der deutschen, polnischen und niederländischen Spargelproben wird deren Hauptkomponentenanalyse separat in Abbildung 50 dargestellt.

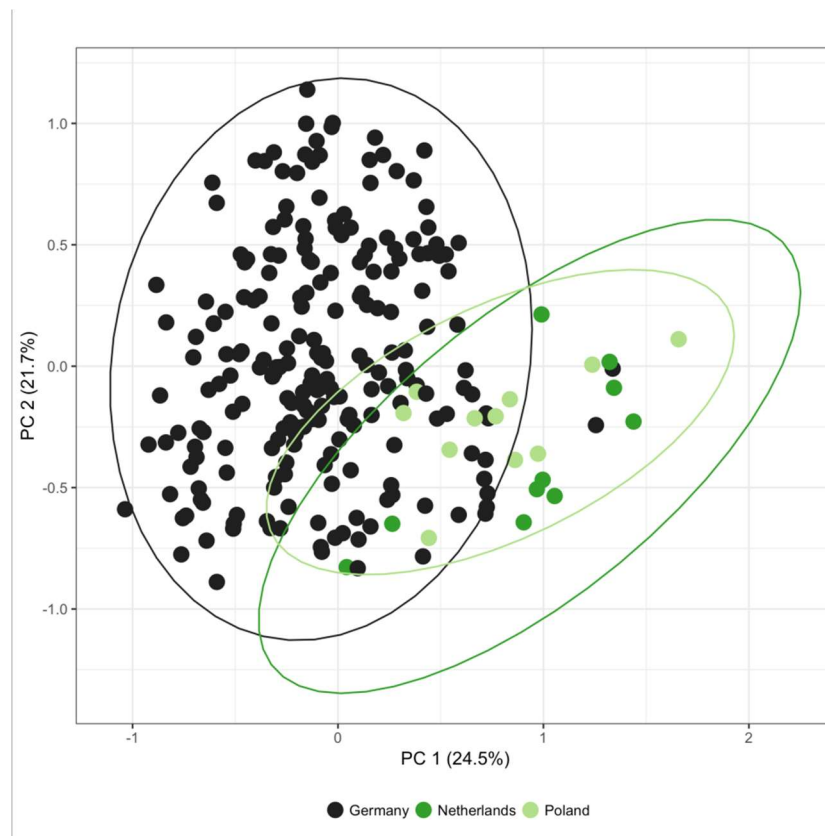


Abbildung 50: Zweidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2: Spargelproben aus Deutschland (schwarz), Niederlande (grün), Polen (hellgrün) aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten

Es wird deutlich, dass mit Hilfe der PCA zwischen den drei Nachbarländern, separat betrachtet, ebenfalls kein eindeutiges *clustering* der Gruppen existiert. Die unausreichende Güte der PCA zeigt sich auch in der für die Probenmenge verhältnismäßig geringen erklärten Varianz von 46,2 %. Eine leichte Tendenz zur Separierung zwischen den deutschen und niederländischen / polnischen Proben existiert jedoch, wobei das hier erzielte Ergebnis zunächst nur Vermutungen zulässt. Die Beobachtung ist zu verfolgen, bis weitere Proben aus den nächsten Erntejahren vermessen und ausgewertet wurden.

Betrachtet man nur die beiden in Vergleich gesetzten Spargelprobengruppen aus den Nachbarländern Polen und den Niederlanden, zeigen diese ähnliche Muster in der

5 Ergebnisse und Diskussion

graphischen Darstellung. Die Probengruppen lassen sich nicht unterscheiden und liegen direkt übereinander. Lässt man die geringe Probenmenge der beiden Länder außen vor, so ist festzuhalten, dass die Proben scheinbar mehr Gemeinsamkeiten als Unterschiede untereinander ausweisen. Im Vergleich zu den deutschen Proben sind diese Unterschiede ebenfalls nur sehr bedingt erfassbar. Diese Beobachtung geht mit dem oben erwähnten Trend einher und soll unter Punkt 5.2.2.3 nochmals aufgegriffen werden.

Mit Bezug auf einen eventuellen Zusammenhang zwischen dem *clustering* in der PCA und der geographischen Distanz zwischen den Proben der drei Nachbarländer kann zum jetzigen Zeitpunkt noch keine belastbare Aussage getätigt werden. Es ist lediglich zu vermuten, dass sich die sehr ähnlichen, äußeren Einflussfaktoren (Längen- und Breitengrad, Höhenlage, Bodenzusammensetzung, Klima, Anbaumethoden, Sorteneinsatz, etc.) aufgrund von geringen geographischen Distanzen, wie es bei den Nachbarländern und dem „Probenschwerpunkt“ Deutschland der Fall zu sein scheint, auf das sehr ähnliche Spargelmetabolom auswirken. Dies schlägt sich auch auf die schwierigere statistische Unterscheidbarkeit nieder. Die Vermutung wird durch die sehr gute Trennung der geographisch am weitesten entfernten peruanischen Proben gestärkt, trotzdem sie nur eine sehr kleine Probengruppe (14 Proben) aufweisen (siehe hierzu die Punkte 5.2.2.3 und 5.2.2.4).

5.2.2.3 Spargelproben aus Deutschland, den Nachbarländern, mediterranen Ländern und aus Übersee

Die PCA aus Abbildung 47 zeigt trotz der geringen Unterschiede zwischen Deutschland, den Niederlanden und Polen einen eindeutigen Trend dieser drei Ländergruppen zur Trennung von den anderen Probengruppen. Es wird ersichtlich, dass die PC1 und PC3 eine besondere Rolle bei dem *clustering* spielen. Während sich zwischen deutschen, niederländischen und polnischen Spargelproben noch starke Überlappungsbereiche abzeichnen, werden bei den Proben aus dem mediterranen Raum (Spanien, Griechenland) bereits starke Unterschiede zu den deutschen Proben sichtbar. Peruanische Spargelproben können zu 100 % von denen aus Deutschland separiert werden.

Die Annahme liegt nahe, dass sich mit zunehmender Ähnlichkeit der klimatischen Verhältnisse und Bodenzusammensetzungen die metabolischen *fingerprints* der Probengruppen angleichen. Um kleinere Unterschiede zwischen zwei Gruppen manifestieren zu können, werden entsprechend große Probengruppen mit ausreichend vielen Datensätzen zur Stabilisierung der statistischen Aussage benötigt. So ist die geringe Probenanzahl der Nachbarlands-Gruppen sehr wahrscheinlich hinderlich für eine eindeutige Trennung; die Größe der mediterranen und Übersee-Gruppen erscheinen hingegen aufgrund der starken

5 Ergebnisse und Diskussion

Abweichungen im Metabolom ausreichend zu sein, um eine klare Separation zu bewirken. Dass diese Abweichungen durch klimatische, bodenspezifische oder anbaubezogene Unterschiede erwirkt werden, kann an dieser Stelle nur vermutet werden. Sehr wahrscheinlich besitzt auch der mitunter lange Transportweg (bis zu drei Tage, ob überland oder via Luftfracht) einen Einfluss auf die Unterscheidbarkeit. Zwar wurden alle Transportbedingungen so gewählt, wie sie laut Brecht *et al.* 2019 empfohlen sind, jedoch ist ein Unterscheidungsmerkmal, welches aufgrund des Transports zustande kommt, nicht als unvorteilhaft anzusehen, da dieser Faktor von eventuell kriminell motivierten Händlern im Nachgang nicht steuerbar und somit auch nicht fälschbar ist (Brecht *et al.*, 2019).

Die Ergebnisse der PCA aus Abbildung 47 und der Klassifikationen (Tabelle 16 und Abbildung 48) eignen sich noch nicht für eine eindeutige Aussage. Daher sollen nun die einzelnen Gruppen zusammengefasst werden, sodass anstelle von sechs unterschiedlichen Gruppen nur noch vier Gruppen gegenübergestellt werden: Deutschland, „*Neighbours*“ (Niederlande, Polen), „*Mediterranean*“ (Spanien, Griechenland) und „*Oversea*“ (Peru). Bei der Anwendung einer PCA ist kein abweichendes Ergebnis zu Abbildung 47 zu erwarten, da es sich um dasselbe Probenset handelt. Die Klassifizierungsmodelle *random forest* und PLS-DA hingegen sollten eindeutigere und fassbarere Angabe über die Trennung der vier Gruppen ermöglichen: siehe hierzu Tabelle 17. Die Ergebnisse der Klassifizierung sind in der *confusion matrix* in Abbildung 51 zu sehen.

Tabelle 17: Gegenüberstellung der Klassifizierungsergebnisse deutscher (DE), benachbarter (NB = *Neighbours*) mediterraner (MT = *Mediterranean*) und peruanischer (OS = *Oversea*) Spargelproben aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten

	PLS-DA	<i>random forest</i>
DE/NB/MT/OS, 2015/2016	91.5 %	91.1 %

5 Ergebnisse und Diskussion

	DE	NB	MT	OS	TPR FNR
DE	172	3	2	0	97.2 2.8
NB	9	9	3	0	42.9 57.1
MT	4	0	21	0	84 16
OS	0	0	0	14	100 0

Abbildung 51: Confusion matrix der random forest-Klassifikation von deutschen (DE), benachbarten (NB = Neighbours), mediterranen (MT = Mediterranean) und peruanischen (OS = Oversea) Spargelproben aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten; rechts: richtig positive (obenstehend) sowie falsch negative (untenstehend) accuracy rates

Die Genauigkeiten der PLS-DA- und *random forest*-Klassifikationen haben sich von 77.6 % und 88.6 % auf 91.5 % und 91.1 % verbessert. Die beiden Modelle zeigen sehr ähnliche Ergebnisse. In der *confusion matrix* sind die Proben aus Übersee weiterhin zu 100 % separierbar. Mit ~97 % korrekter Vorhersage folgen die deutschen Proben, welche einen Prozentpunkt zugunsten der verbesserten *accuracy* der Nachbarländer mit nunmehr insgesamt ~43 % einbüßen mussten. Ebenfalls hat sich die gemittelte *accuracy* der mediterranen Spargelproben mit 84 % merklich verbessert. Die *accuracy* aller ausländischen Proben erhöht sich von 61.7 % auf 73.3 %.

Der positive Effekt der verbesserten Klassifikationsmodelle wurde bereits in Punkt 5.2.2.1 hypothetisch angedeutet und ist sehr wahrscheinlich durch die beschriebene Komprimierung der sechs auf vier Probengruppen und die damit verbundene erhöhte Probendichte pro Gruppe zurückzuführen. Für das Vorgehen in weiteren Arbeiten und insbesondere für Fallbeispiele in der freien Wirtschaft wäre auch eine Aussage, ob der Spargel aus Deutschland, den Nachbarländern Deutschlands, aus dem mediterranen Raum oder von Übersee kommt, von großem Wert. Um noch bessere Genauigkeiten zu erzielen, wird im Folgenden die Klassifizierung zwischen deutschen und allgemein „ausländischen“ Spargelproben untersucht.

5.2.2.4 Spargelproben aus Deutschland und dem Ausland

Es wird die Klassifizierung mittels PLS-DA und *random forest* von nur noch zwei Gruppen, nämlich „Deutschland“ und „Ausland“, durchgeführt, um sie leichter voneinander unterscheiden zu können. Die Gruppengröße für die ausländischen Proben wächst somit noch weiter an, wodurch die Anwendung des neu trainierten *classifiers* eine noch eindeutigere Zuordnung ermöglichen soll.

Das statistische Modell reduziert sich auf nur noch zwei Gruppen und ist zur Veranschaulichung der jeweiligen Probenanteile in Form der PCA in Abbildung 52 dargestellt.

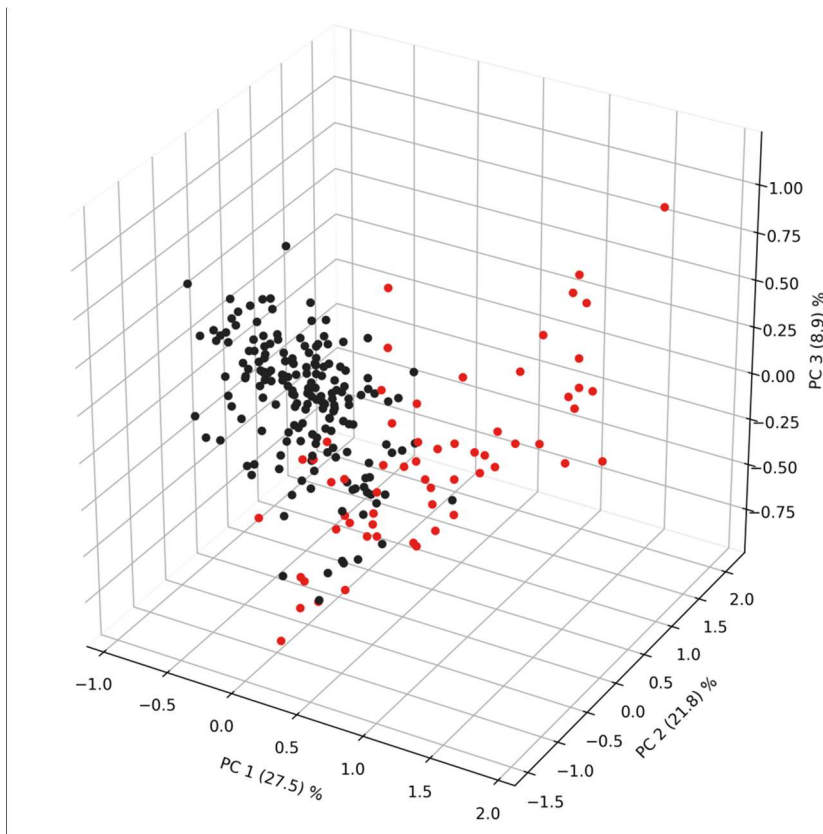


Abbildung 52: Dreidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2/PC3: Spargelproben aus Deutschland (schwarz), Ausland (rot) aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten

Die Trennung und graphische Darstellung mittels Hauptkomponentenanalyse wird nicht verbessert (erklärte Varianz = 58.2 %), da die Datenlage dieselbe ist (Vergleich siehe Abbildung 47). Allerdings kann mit Hilfe der Vorhersagemodelle PLS-DA und *random forest* die *accuracy rate* deutlich erhöht werden, da weniger Querüberschneidungen infolge von Fehlzugehörigkeiten zu erwarten sind. Aus dem hierfür neu berechneten *classifier* konnte das Klassifikationsergebnis in Tabelle 18 erzielt werden. Die *confusion matrix* ist in Abbildung 53 zu sehen.

Tabelle 18: Gegenüberstellung der Klassifizierungsergebnisse deutscher und ausländischer Spargelproben aus den Jahren 2015 und 2016; alle Sorten

	PLS-DA	<i>random forest</i>
DE/FC, 2015/2016	93.2 %	92.4 %

	DE	FC	TPR FNR
DE	169	8	95.5 4.5
FC	10	50	83.3 16.7

Abbildung 53: Confusion matrix der *random forest*-Klassifikation von deutschen (DE) und ausländischen (FC = foreign country) Spargelproben aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten; rechts: richtig positive (obenstehend) sowie falsch negative (untenstehend) *accuracy rates*

In dem neu berechneten Modell mit nur noch zwei Gruppen steigt, wie zu erwarten, die Rate korrekter Zuordnungen für das Gesamtmodell (PLS-DA 93.2 %, *random forest* 92.4 %) und insbesondere für die ausländischen Spargelproben um etwa 20 Prozentpunkte auf 83.3 %. Auf der anderen Seite sinkt die durchschnittliche *accuracy* deutscher Spargelproben um etwa 2 % Prozentpunkte auf 95.5 %.

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse zeigt, dass sich die Aussage über die Sicherheit einer Zuordnung anhand der Wahl des Auswertemodells sehr stark beeinflussen lässt. Dennoch besitzen die hier gewonnenen Resultate mit korrekten Zuordnungsraten von über 90 % bereits sehr aussagekräftige und bis dato noch nicht erreichte Genauigkeiten. In Anbetracht des wirtschaftlichen Interesses an einer sicheren Methode zur Herkunftsprüfung von weißem Spargel ist dieser Sachverhalt unbedingt weiter zu untersuchen und möglichst mittels weiterer Messungen zu stützen.

Die Anzahl ausländischer Spargelproben beläuft sich bislang auf 60, was ca. einem Drittel der deutschen Proben entspricht. Unter der Annahme, noch weitere Proben aus dem Ausland akquirieren und messen zu können, sodass mindestens 150 ausländische Proben insgesamt zur Verfügung stehen, sollte die Fehlerquote dieser Proben noch weiter sinken. Mit einem optimal trainierten *classifier* und einer ausreichend hohen Probenanzahl kann dieses Vorhersagemodell aus wirtschaftlicher Sicht von großem Nutzen sein, um die Authentizität von Verdachtsproben zu überprüfen.

5.2.3 *targeted* Analyse

Die *non-targeted*, also nicht-zielgerichtete, Analyse liefert eine gute Methode zur Vorhersage der geographischen Herkunft unbekannter Spargelproben. Diese Form der Analyse basiert auf umfangreichen Vorbereitungen. Es bedarf nicht nur kostenintensiver Analysegeräte und -programme, welche je nach Methode frei zugänglich oder auch lizenzgebunden sein können, sondern auch zeitaufwändiger Methodenentwicklungen. Entsprechend sind für die umfangreiche Probenaufarbeitung, -messung sowie für den Umgang, die Auswertung und die Pflege statistischer Daten und Datenbanken auch die Expertise von ausgebildetem Fachpersonal notwendig.

Um eine schnellere und ressourcensparendere Methode für die routinemäßige Identifizierung unbekannter oder verdächtiger Spargelproben zu erhalten, wäre daher die bisher *non-targeted* angewandte Methode durch eine *targeted* Methode zu erweitern. Bei der *non-targeted* Methode wird das gesamte, messtechnisch erfassbare Metabolom ohne spezifische Zielverbindung betrachtet. Anders ist es bei der *targeted* Analyse: Hier werden nur noch ausgewählte Komponenten, das heißt einzelne chemische Verbindungen oder auch spezifische Abhängigkeiten unter mehreren Stoffen sowie einzelne Stoffwechselwege, analysiert, welche zuvor mittels *non-targeted* Analyse identifiziert worden sind.

Solche *targets* führen zu einer erleichterten Zuordnung unbekannter Proben, weshalb nur noch sie – und nicht das gesamte Metabolom – isoliert betrachtet werden müssen. Sind das/die *target/s* isoliert, bedarf es einer Methode zur eindeutigen Bestimmung anhand dieses/r Parameter/s. Die Vorteile zeigen sich dahingehend, dass bestimmte Arbeitsschritte eingespart werden können, es keiner Anschaffung und Bedienung kostspieliger und komplizierter Analysegeräte mehr bedarf und keine spezifischen Fachkenntnisse des Personals vorausgesetzt werden. Anstelle dessen können eine vereinfachte Aufarbeitungsmethode und weniger komplexe Messsysteme eingesetzt werden. Weiterhin wird durch die vereinfachte Methode kein spezielles wissenschaftliches Hintergrundwissen der vorangegangenen Forschung vorausgesetzt.

Sind die interessanten Verbindungen identifiziert worden, ergeben sich im Zuge einer *targeted* Analyse weitere Vorteile mit Hinblick auf wissenschaftliche Aspekte. So können nach der Identifizierung biochemische Vorgänge aufgeklärt bzw. interpretiert werden. Möglich ist auch die Aufklärung von Zusammenhängen zwischen chemischen Markern, den erfassten Metadaten und somit den äußeren Einflussfaktoren.

Zur Identifizierung bestimmter, chemischer Markersubstanzen oder relevanter *buckets* können die Werkzeuge *importance*, *boruta* und *box plots* herangezogen werden, sodass beispielsweise mit Hilfe der identifizierten *features* eine direkte Aussage über die Herkunft

5 Ergebnisse und Diskussion

einer Probe ableitbar sein kann. Die Herangehensweise einer *targeted* Untersuchung und die Identifizierung einer chemisch-charakteristischen Markersubstanz werden im Folgenden dargestellt. Zur Vereinfachung der Methode wird die Unterscheidung von peruanischen und deutschen Spargelproben vorgenommen.

5.2.3.1 Identifizierung relevanter *buckets*

Zunächst müssen die relevanten *buckets* identifiziert werden, welche für die Trennung der Gruppen verantwortlich sind. Hierzu liefert die PCA Informationen über trennungsrelevante Spektrenabschnitte, welche in den verschiedenen Klassifizierungsmodellen, wie z. B. in dem Modell *random forest*, als Grundlage verwendet werden. Es wird ein Ranking der wichtigsten *buckets* für die jeweilige Probengruppe erstellt und deren Wichtigkeit für die Trennung mit Hinblick auf ihre chemische Spezifität abgeschätzt.

Importance und *boruta plots*

Aus der Klassifikation gehen verschiedene relevante *buckets* hervor, welche in einem *importance plot* dargestellt werden können. Die einzelnen *features* werden entsprechend ihrer Relevanz den einzelnen Spektrenabschnitten zugeordnet. In Abbildung 54 wird ein *importance plot* von deutschen und peruanischen Spargelproben dargestellt.

Ebenfalls kann mit Hilfe des *boruta plots* (Abbildung 55, Abbildung 56), einem *feature*-Selektion-Algorithmus, welcher auf der *random forest*-Klassifikation aufbaut, eine Rangfolge der einzelnen *features* erzeugt werden. Zudem werden die Streuungen der relevanten *features* angegeben. Befinden sich zwei *features* in dieser Rangfolge auf ähnlichen Stufen, so sind sie auch ähnlich relevant; sind ihre Streuungen ebenfalls von ähnlichem Ausmaß, so kann dies ein Hinweis über eine mögliche Korrelation sein. Da jede Berechnung einer *random forest*-Klassifikation und entsprechend eines *boruta plots* aus einer zufälligen Auswahl an Entscheidungsbäumen vorgenommen wird, sind die Ergebnisse nie gleich, jedoch sehr ähnlich. Es wurde daher das Ergebnis aus einer Dreifachbestimmung gemittelt.

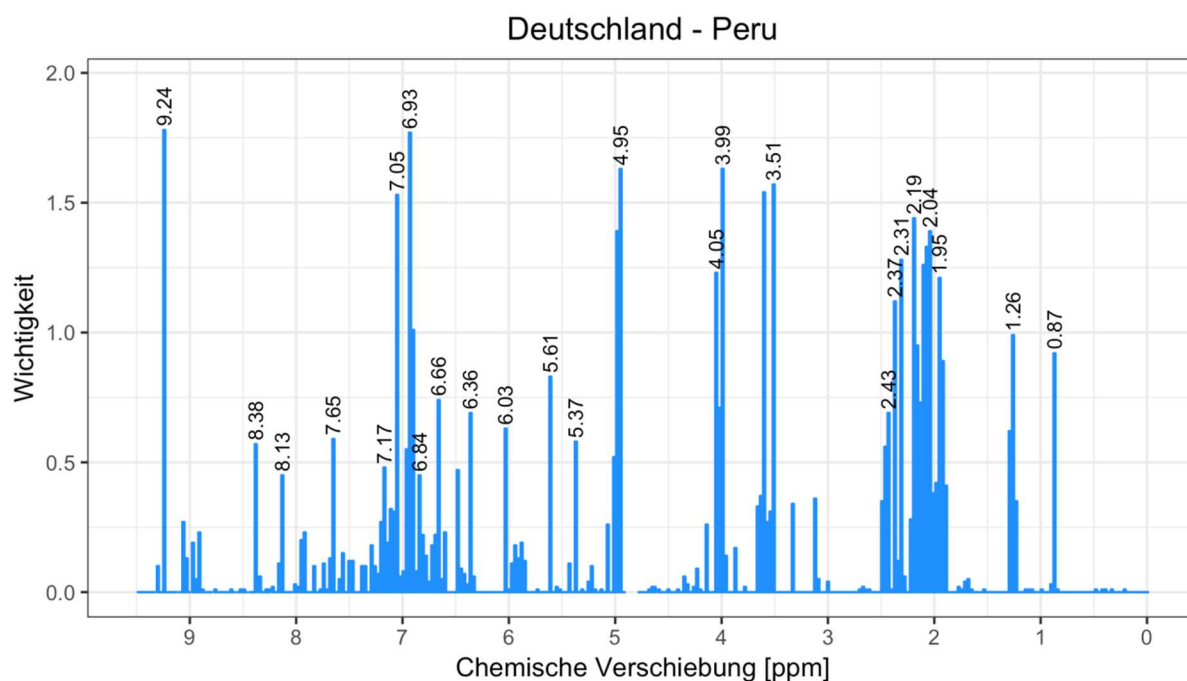


Abbildung 54: *Importance plot* der 1D-¹H-NOESY-Spektren deutscher und peruanischer Spargelproben, aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten

Die Relevanz einzelner buckets wird mit Hilfe des *importance plots* (Abbildung 54) nachvollziehbarer. Die hervorgehobenen und gelabelten *buckets* wurden nach eigenem Ermessen und nicht nach einem einheitlichen Schwellenwert ausgewählt, da die *importance plots* verschiedener Klassifikationen nicht miteinander vergleichbar sind. Als etwas unübersichtlich stellen sich die Regionen im Spektrum heraus, in denen mehrere relevant erscheinende Peaks dicht beieinanderliegen. Deshalb wurden hier jeweils die maximalen Werte der Peaks innerhalb einer relevanten und zusammenhängenden Spektrenregion markiert. Diese sehr intensiven *buckets* können zu einer sehr guten Trennung der jeweiligen Gruppen (hier Deutschland und Peru) führen, sind aber unter Umständen chemisch eher unspezifisch und dienen daher gegebenenfalls nicht der selektiven, gezielten Unterscheidung. Die *importance plots* der Gegenüberstellungen von Spargel aus Deutschland – Polen / Niederlande / Spanien / Griechenland sind im Anhang in Abbildung 68, Abbildung 69, Abbildung 70 und Abbildung 71 dargestellt. Sie werden an dieser Stelle nicht diskutiert.

5 Ergebnisse und Diskussion

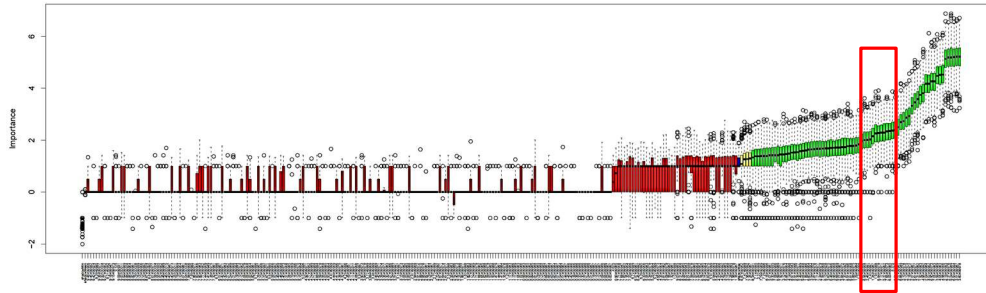


Abbildung 55: *Boruta plot* zur Darstellung der *importances* der relevanten *buckets* einer deutsch-peruanischen *random forest*-Klassifikation, aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten; rot markiertes Feld = Ausschnitt siehe Abbildung 56

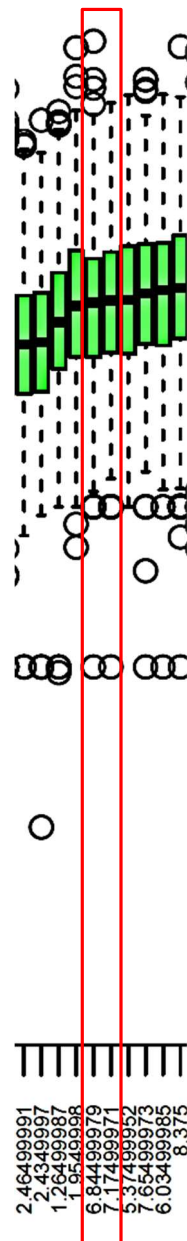


Abbildung 56: Ausschnitt aus dem *boruta plot* aus Abbildung 55, rot markiertes Feld = korrelierende *buckets*

5 Ergebnisse und Diskussion

Auch in Abbildung 55 und Abbildung 56 wird deutlich, welche *buckets* für die Trennung der Gruppen von Relevanz sind und welche nicht. Der Schwellenwert der *importance* wurde abermals selbst gesetzt; alle grün dargestellten *features* werden demnach als relevant erachtet, alle roten *features* werden für die statistische Trennung als weitestgehend irrelevant außenvorgelassen.

Schaut man sich die Graphik (Abbildung 55) und ein beispielhaftes 1D-¹H-NOESY-Spektrum (Abbildung 19) genauer an, kann auch hier festgestellt werden, dass nicht immer die laut *random forest* am wichtigsten errechneten *buckets* auch die aussagekräftigsten sind. So bieten die *buckets* bei 3.51 ppm und 3.60 ppm, welche im *importance* Ranking ganz oben angesiedelt sind, keine große Aussagekraft, da sie sich inmitten vieler unspezifischer Überlagerungen befinden. Die Signale bei 6.84 ppm und 7.17 ppm hingegen sind zwar für die Trennung der beiden Gruppen nicht am besten geeignet und zeigen geringere *importances*, sind aber dennoch wichtig für die Trennung, da sie aufgrund ihrer isolierten chemischen Verschiebungen eine hohe Spezifität besitzen. Die chemische Verschiebung verrät, dass hier Signale aus aromatischen Systemen vorliegen; weiterhin liegen sie im *boruta plot* mit sehr ähnlichen *importances* direkt nebeneinander, was einen Hinweis auf eine mögliche Korrelation der Signale gibt.

Auf diese Weise können Informationen über ihre chemische/n Struktur/en erhalten werden, was im Rahmen der *targeted* Analyse von großer Bedeutung ist. Neben der guten Eignung als spezifische/n Metabolite/n zeigt auch der Trennungsversuch deutscher und peruanischer Spargelproben anhand dieser beiden *buckets*, dass ihr Aussagegehalt für die Fragestellung von großem Wert ist: Führt man eine *random forest*-Klassifikation mit nur diesen beiden *buckets* durch, so werden 12 von 14 der peruanischen Proben korrekt vorhergesagt. Das Ergebnis ist in der *confusion matrix* in Abbildung 57 zu sehen.

	DE	PE	TPR FNR
DE	176	1	99.4 0.6
PE	2	12	85.7 14.3

Abbildung 57: *Confusion matrix* der *random forest*-Klassifikation von deutschen (DE) und peruanischen (PE) Spargelproben anhand der *buckets* 6.84 ppm und 7.17 ppm, aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten; rechts: richtig positive (obenstehend) sowie falsch negative (untenstehend) *accuracy rates*

5 Ergebnisse und Diskussion

Mit Hilfe der *non-targeted* Herkunftsanalyse konnten die peruanischen Spargelproben zu 100 % von den deutschen Proben differenziert werden. Das Trennungsergebnis der *targeted* Methode anhand zweier *features* mit einer 86 %igen, korrekten Zuordnung für die peruanischen und 99.4 %igen Genauigkeit für die deutschen Proben ist als sehr verlässlich einzuschätzen. Es gibt Aufschluss über die große Stabilität der Klassifikation der beiden Probengruppen.

Box plots

Eine noch differenziertere Darstellungsweise für die Eignung eines individuellen *features* für eine Probengruppenunterscheidung liefert der *box plot*. Anhand des *box plots* sind die Intensitäten der *buckets* – und damit indirekt auch die Konzentrationen – in den einzelnen Probengruppen ersichtlich.

In Abbildung 58 und Abbildung 59 sind zwei *box plots* für die Unterscheidung der Proben aus Deutschland und Peru dargestellt. Die Intensitätsspannweiten des jeweiligen *buckets* sind logarithmisch für die betrachteten Probengruppen aufgetragen.

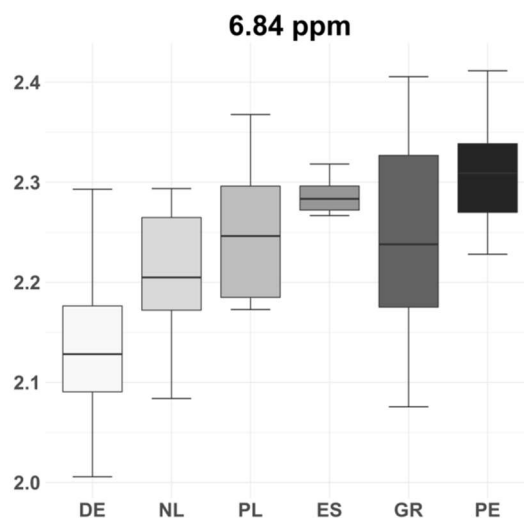


Abbildung 58: Box plot des buckets bei 6.84 ppm für die Unterscheidung von peruanischen und deutschen Spargelproben, aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten; Intensitäten logarithmiert

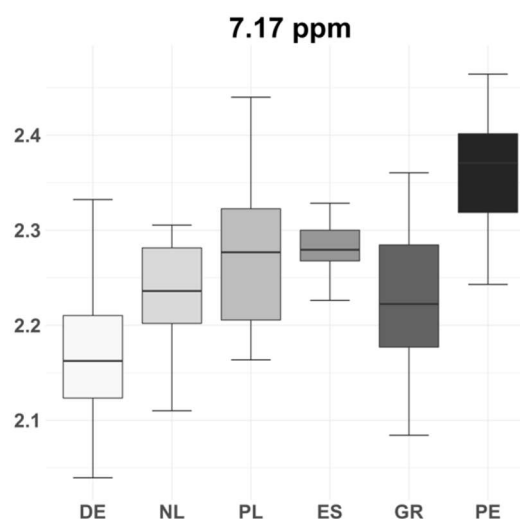


Abbildung 59: Box plot des buckets bei 7.17 ppm für die Unterscheidung von peruanischen und deutschen Spargelproben, aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten; Intensitäten logarithmiert

Die dargestellten *box plots* der buckets 6.84 ppm und 7.17 ppm zeigen, dass die peruanischen Proben bei diesen chemischen Verschiebungen im Mittel eine höhere Intensität als die deutschen Proben aufweisen. Diese *buckets* sind, wie bereits vermutet, sehr gut für die Identifizierung von Spargel aus Peru geeignet. Im Anhang in Abbildung 72, Abbildung 73, Abbildung 74, Abbildung 75 und Abbildung 76 sind weitere *box plots*, welche für die Unterscheidung von Spargel aus den anderen Herkunftsländern relevant sein können, dargestellt. Diese werden an dieser Stelle nicht weiter diskutiert.

Wie schon erläutert und von Dias *et al.* 2016 bestätigt, stellen nicht immer die „Ranking-stärksten“ *buckets* auch gleich die besten *features* dar (Dias *et al.*, 2016). Mit diesem Bewusstsein ist zusammenzufassen, dass der *importance plot* aus Abbildung 54, der *boruta plot* aus Abbildung 55 und Abbildung 56 sowie die *box plots* aus Abbildung 58 und Abbildung 59 sich gegenseitig hinsichtlich ihrer Unterscheidungsrelevanz der genannten *buckets* (6.84 ppm und 7.17 ppm) bestätigen.

5.2.3.2 Identifizierung der chemischen Struktur

Um von den statistisch ermittelten *buckets* Rückschlüsse auf die jeweiligen Verbindungen zu erhalten, müssen die spektralen Bereiche genauer betrachtet werden. Dazu werden die 1D-¹H-NOESY-Spektren analysiert. In Abbildung 60 ist der Spektrenausschnitt zwischen 6.6 ppm und 7.5 ppm dargestellt.

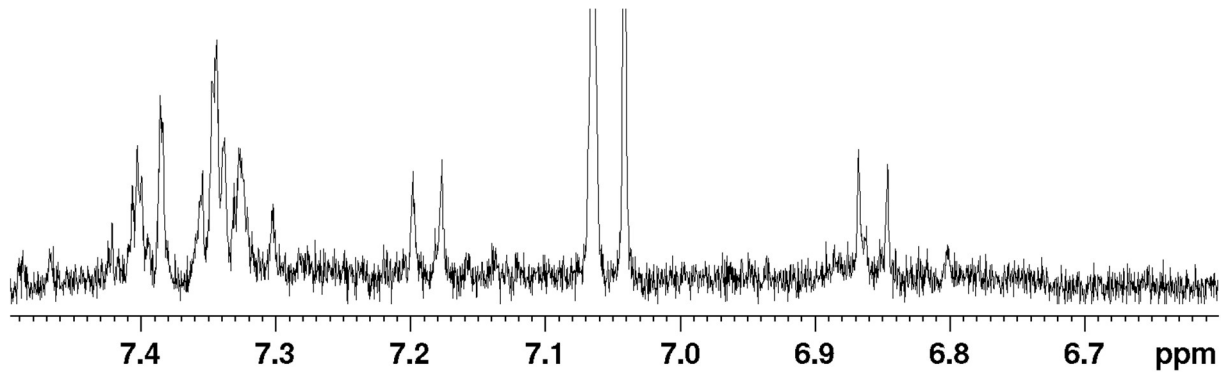


Abbildung 60: 1D-¹H-NOESY-Spektrum einer deutschen Spargelprobe (15-DE-RP-Sul-Ba-2)

Für die unter Punkt 5.2.3.1 besprochenen *buckets* bei 6.84 ppm und 7.17 ppm sind zwei Multipletts zu erkennen, jeweils mit einer Kopplungskonstante von 8.49 Hz. Sie gehören zu einem AA'XX'-Spinsystem eines parasubstituierten Aromaten. Die chemischen Verschiebungen deuten auf eine Phenolverbindung hin. Die Annahme, dass die beiden Signale zu einer gemeinsamen Verbindung gehören, soll durch 2D-Experimente überprüft werden.

In Abbildung 61 wird ein J-RES-Spektrum gezeigt, welches Aufschluss darüber gibt, ob die Multiplizität der beobachteten Signale (zwei Multipletts) korrekt ist. Abbildung 62 zeigt ein TOCSY-Spektrum, bei dem die Zusammengehörigkeit der beiden Signale zu einem Molekül über deren Korrelationssignale verdeutlicht wird.

5 Ergebnisse und Diskussion

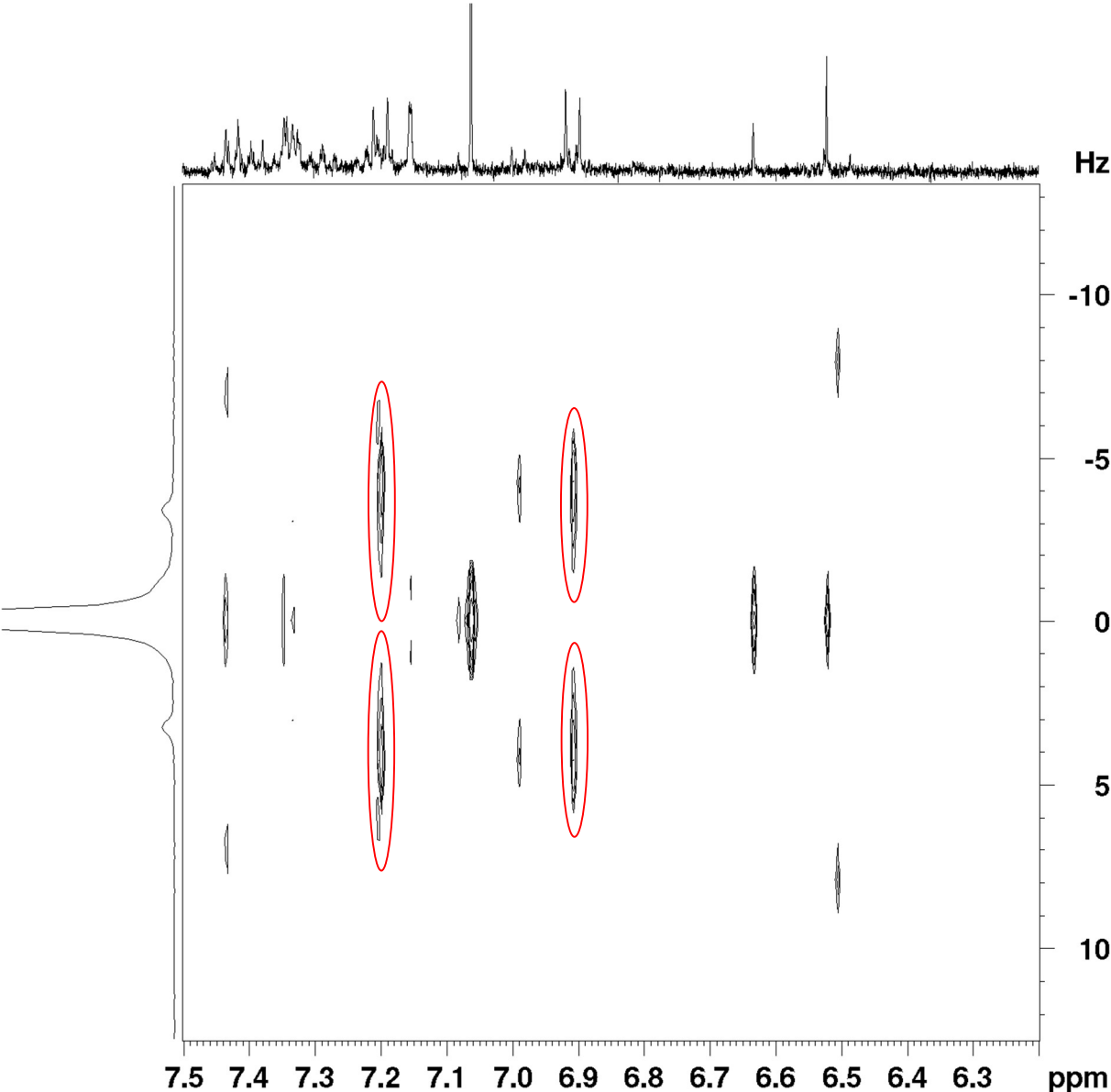


Abbildung 61: Ausschnitt eines J-RES-Spektrums einer peruanischen Spargelprobe (16-PE-HH-TAL-Fru)

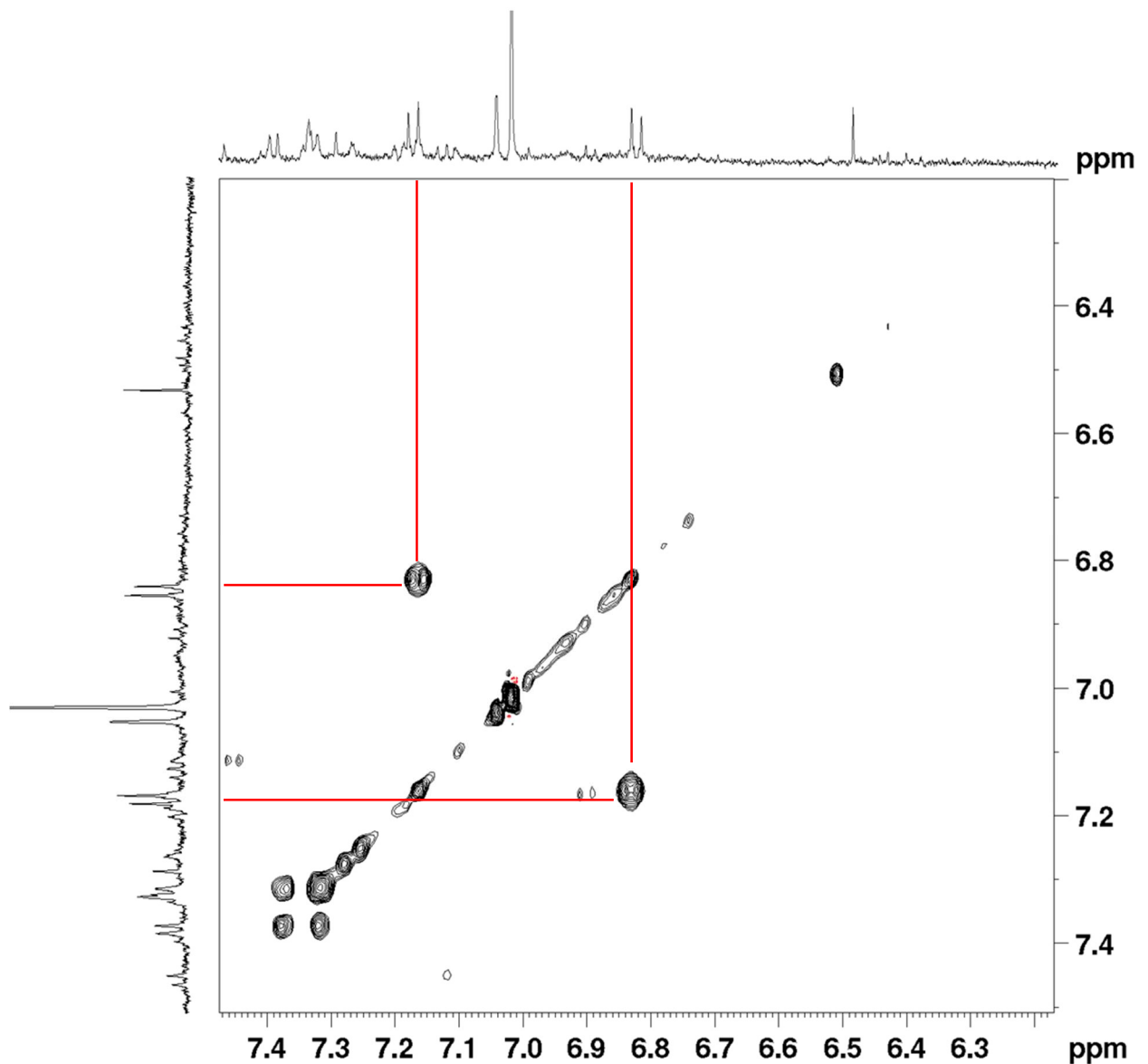


Abbildung 62: Ausschnitt eines TOCSY-Spektrums einer peruanischen Spargelprobe (16-PE-HH-TAL-Fru)

Im J-RES-Spektrum konnte die Annahme zweier Multipletts verifiziert werden, da die Aufspaltung entlang der F1-Achse jeweils zwei Signale zeigt. Es liegen hier also keine anderen Signale übereinander. Auch die Vermutung, dass die Signale zu einer Verbindung gehören, konnte mit Hilfe des TOCSY-Spektrums bestätigt werden. Aufgrund der Kopplungskonstante (8.49 Hz) und der chemischen Verschiebung wird L-Tyrosin als ein möglicher Analyt vermutet. Die chemische Struktur von L-Tyrosin ist in Abbildung 63 zu sehen.

5 Ergebnisse und Diskussion

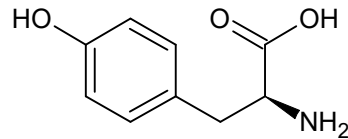


Abbildung 63: Strukturformel von L-Tyrosin (ChemSketch, 2020)

Ein Abgleich mit der Human Metabolome Data Base gibt einen weiteren Hinweis auf die Richtigkeit der Annahme. Abbildung 64 zeigt das ¹H-NMR-Spektrum einer L-Tyrosin Probe, welche an einem 500 MHz Spektrometer der Firma Bruker[®] gemessen wurde (HMDB L-Tyrosin, 2020). In Tabelle 19 sind die Signale gelistet.

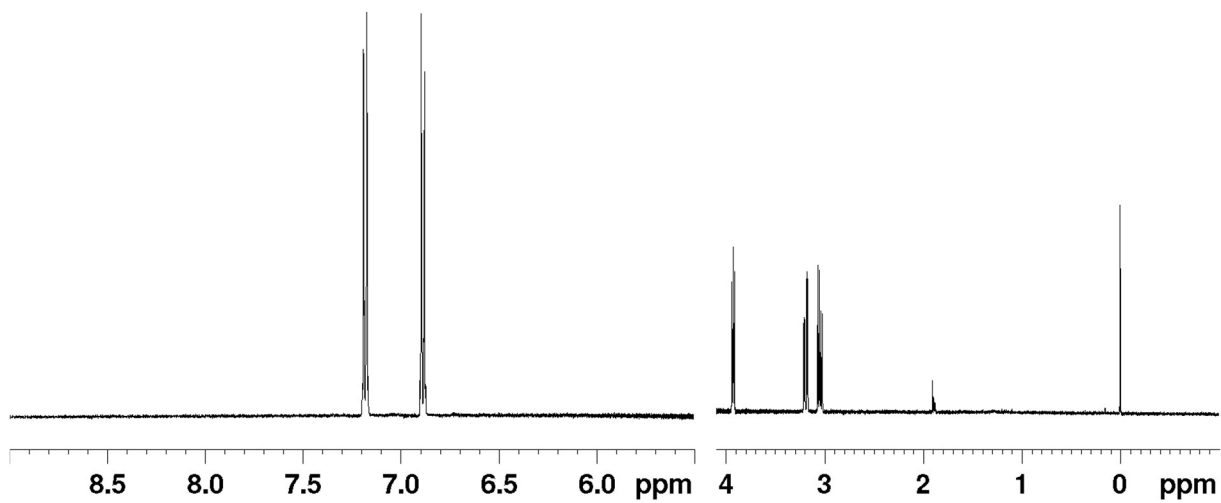


Abbildung 64: ¹H-NMR-Spektrum einer 0.5 mM L-Tyrosin-Probe (in 50 mM Natriumphosphatpuffer, 100 % D₂O, 0.1 % DSS, 500 μM Natriumazid, pH=7.7, 298 K) (HMDB L-Tyrosin, 2020)

Tabelle 19: Peak-Listung der L-Tyrosin Probe aus Abbildung 63 (HMDB L-Tyrosin, 2020)

Chemische Verschiebung	Intensität
7.1909	0.24
7.1740	0.26
6.8964	0.23
6.8794	0.20
3.9407	0.08
3.9304	0.09
3.9252	0.09
3.9141	0.08
3.2103	0.06
3.2001	0.07
3.1809	0.10
3.1707	0.09
3.0685	0.10
3.0529	0.10
3.0391	0.07
3.0236	0.07

In einem Dotierungsexperiment werden zum einen eine undotierte und zum anderen eine dotierte Spargelprobe vermessen. Ein Reinspektrum des Standards L-Tyrosin wurde ebenfalls gemessen. Abbildung 65 zeigt das Ergebnis des Dotierungsexperiments.

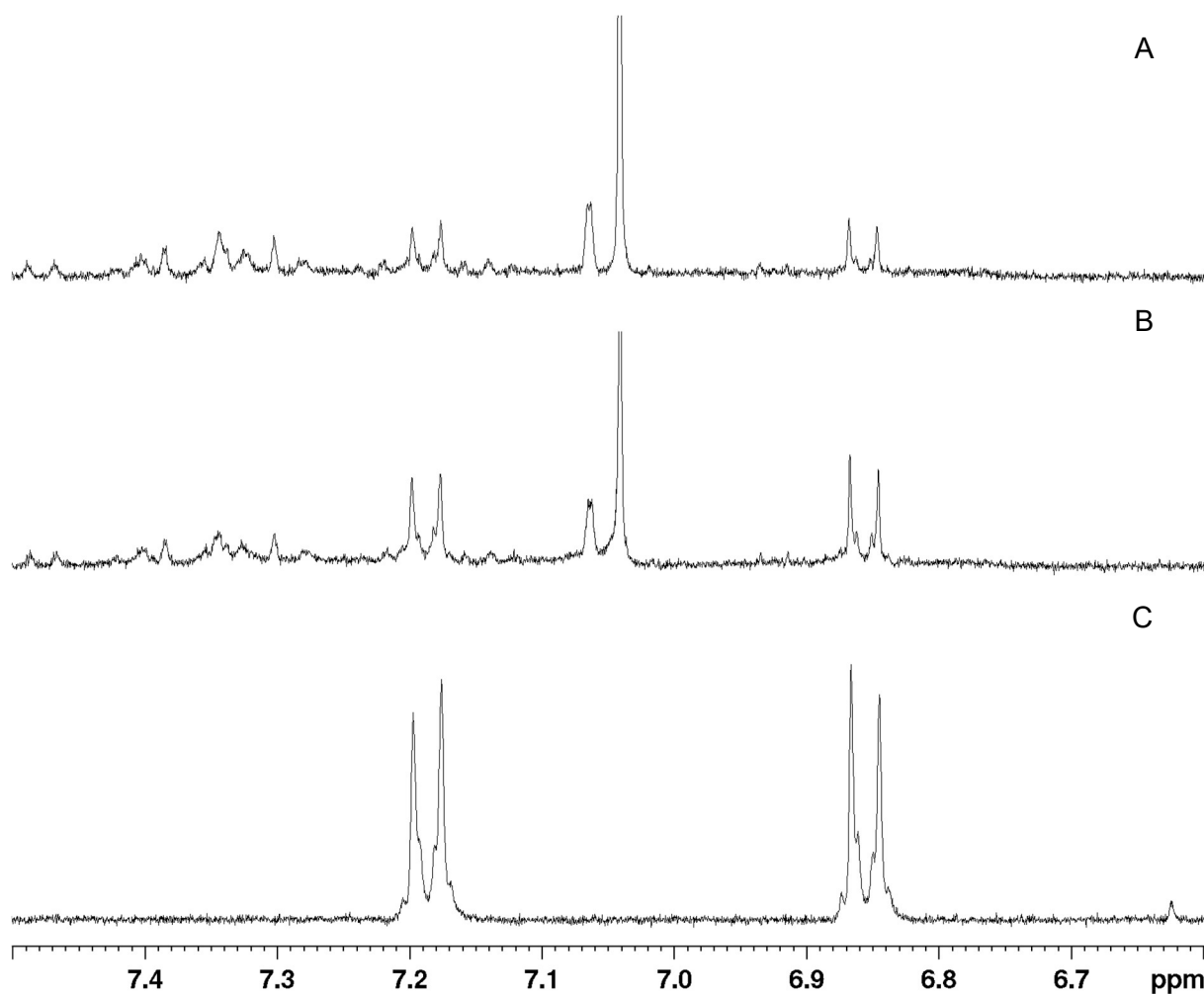


Abbildung 65: $1D\text{-}^1\text{H-NOESY}$ -Spektren des Dotierungsexperiments einer peruanischen Spargelprobe (15-PE-HH-TAL-Fru): A Probe ohne Dotierung; B Probe dotiert mit L-Tyrosin (0.03 mM L-Tyrosin / 50 % Methanol- d_4 + 50 % deut. Kaliumhydrogenphosphatpuffer; Extraktion nach Tabelle 31); C Standardprobe L-Tyrosin (50 % Methanol- d_4 + 50 % deut. Kaliumhydrogenphosphatpuffer)

Anhand des Dotierungsexperiments kann eindeutig belegt werden, dass es sich bei der gesuchten Verbindung um L-Tyrosin handelt, da sich die Intensitäten beider Signale erhöhen. Die höhere Konzentrierung von L-Tyrosin in den peruanischen Spargelproben ergibt dabei durchaus Sinn: Die Spargelanbauggebiete in Peru liegen auf einer Höhe von bis zu 3500 m, während Spargel aus Deutschland auf eher geringen Höhenlagen zwischen 50 m bis 800 m gedeiht (Diniz *et al.*, 2013). Es kann vermutet werden, dass die höhere und intensivere Sonneneinstrahlung in Peru eine Adaption der dort kultivierten Pflanzen hervorruft, indem diese höhere Konzentrationen UV-aktiver Stoffe, wie z. B. L-Tyrosin, bilden.

An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass die Verbindung zunächst nur als Beispiel für die Herangehensweise einer *targeted* Analyse zu verstehen ist und die Vorgehensweise als Grundlage für weitere Arbeiten dienen kann. Ist bekannt, welche Verbindung sich hinter einem

5 Ergebnisse und Diskussion

bucket versteckt, so kann sie meist sehr leicht analytisch quantifiziert werden. Dies ermöglicht eine schnelle und einfache Variante für Authentizitätsfragen anhand weniger Parameter. Die Entwicklung hochdurchsatzfähiger, verlässlicher und einfacher Methoden mit wenigen Störkomponenten bietet eine große Attraktivität in der Routineanalytik. Verdachtsproben können leichter identifiziert werden, was im Umkehrschluss zu mehr Transparenz sowohl für die/den Verbraucher/in, als auch regionale Landwirte/innen führt.

6 Ausblick

Das Forschungsprojekt „Spargel-Monitoring“ bietet über die hier erzielten Ergebnisse hinaus noch weitere Ansatzpunkte, welche ausgebaut oder grundlegend neu erforscht werden können. Die Verbesserung der statistischen Genauigkeit in Zusammenhang mit einer höheren Probenanzahl und dabei ähnlichen Gruppengrößen gelten dabei als wesentliche Punkte. Insbesondere die ausländischen Probengruppen sind mit insgesamt 60 Einzelproben aus statistischer Sicht stark unterrepräsentiert. Die in Punkt 3.4.3.1 und 5.2.2.1 beschriebenen Vorteile des *Oversamplings* zeigen deutlich, welchen Einfluss die Vergrößerung der probenschwachen Klassen besitzt. Einschätzungen von *Metabolomics*-Experten zufolge, sollte jede Variable, welche in ein statistisches Auswerteverfahren einbezogen wird, mit einer Stichprobenmenge von jeweils 100 Proben untersucht werden (Spraul, 2014).

Die Korrelation der verschiedenen, angewandten Analysemethoden trägt ebenfalls zu einer Stärkung der Aussagekraft des Modells bei. Die Korrelation NMR-spektroskopisch erhobener Daten mit NIR-spektroskopischen oder massenspektrometrischen Daten (Punkt 3.2.2.3) liefert zusätzliche Informationen und erweitert somit den Blickwinkel auf das Metabolom. Die Vorhersagegenauigkeit des Modells aber auch die Suche nach relevanten chemischen Markern kann auf diese Weise enorm unterstützt werden.

Um die bisherigen Forschungsergebnisse für Industrie, Handelslabor und Untersuchungsamt anwendbar zu gestalten, bedarf es vereinfachter Methoden, welche schnell eindeutige Ergebnisse liefern. Um eine gewisse Verlässlichkeit dieser Tests zu erwirken, ist die Identifizierung weiterer chemischer Marker notwendig. Aus einer Kombination verschiedener Substanzen, deren Konzentrationen sowie An- oder Abwesenheiten kann eine Aussage über die Herkunft einer Spargelprobe getroffen werden. Die Identifizierung relevanter Markersubstanzen wird aufgrund von Überlagerungseffekten jedoch oft erschwert, wie im vorliegenden Fall der Bereich der Kohlenhydrate zwischen 2.5 ppm und 4.5 ppm. Mittels flüssigkeitschromatographischer, fraktionierter Trennung und anschließender NMR-spektroskopischer und massenspektrometrische Strukturaufklärung (3DCC = *three-dimensional cross correlation*) können Substanzgemische aufgetrennt und analysiert werden. 2D-Experimente, wie die in Punkt 5.2.3.2 verwendete TOCSY- oder J-RES-Experimente tragen zur Strukturaufklärung unbekannter oder vermuteter Verbindungen bei (Behnken *et al.*, 2012; Fellenberg *et al.*, 2013; Duddek, 2007). Abschließend können postulierte Verbindungen mit Hilfe von Dotierungsexperimenten sehr einfach und zuverlässig nachgewiesen werden.

7 Experimenteller Teil

In diesem Kapitel werden alle verwendeten Materialien und Geräte in tabellarischer Form gelistet sowie alle Methoden beschrieben.

7.1 Materialien und Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien sind in Tabelle 20 und die verwendeten Chemikalien in Tabelle 21 dargestellt. Die genutzten Computer-gestützten Programme sowie die Geräte sind in der Tabelle 22 und Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 20: Verwendete Materialien

Materialien	Hersteller
Aluminiumfolie	aro [®]
Erlenmeyerkolben, 50 mL, 100 mL, 250 mL, z. T. mit Schliff Linz 29/32	DURAN Group GmbH
Gefrierbeutel, 6 L und 10 L	pely-plastic GmbH & Co. KG
Gefrierbeutel mit Verschlussfunktion, 3 L	k. A.
Glasstäbe	k. A.
Hammer	k. A.
Kältehandschuhe, 76.45.508	engelbert strauss GmbH & Co. KG
Keramikkmesser	Böker Manufaktur Ceramic [®]
Maßkolben, 5 mL, 10 mL, 50 mL, 100 mL	DURAN Group GmbH
Messzylinder, 50 mL, 100 mL, 200 mL	Dagra GmbH
Mikro-Einwegspatel: smart Spatula mikro aus PP	Carl Roth GmbH & Co. KG
Mörser (181/90) mit Pistill (56-00)	HCT Germany; Morgan Advanced Materials Haldenwanger GmbH
NMR-Röhrchen 5 mm Boroeco-5-7 + Deckel	DEUTERO GmbH
Parafilm „M“ Laboratory Film, PM-996, 4 IN. X 125 FT. Roll	Sigma-Aldrich [®]
Pasteurpipetten, 230 mm, ISO 7712, European-Cat.No. 612-1702	VWR International GmbH
Pipetten Research, 100 µL und 1,000 µL	Eppendorf Deutschland GmbH
Pipettenspitzen, 100 µL und 1,000 µL	Eppendorf Deutschland GmbH

7 Experimenteller Teil

Reaktionsgefäße, 2.0 mL, rund zulaufend oder 1.5 mL, spitz zulaufend	Eppendorf Deutschland GmbH
Rundfilter, MN 615, Ø 90 mm, REF 431 009	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Rundkolben, 250 mL	DURAN Group GmbH
Probengefäße, 15 mL, 50 mL	Sarstedt AG & Co.
Stahlkugeln, 3 mm Durchmesser, entfettet	Fahrradgebrauchtmarkt Hamburg, Rolf Peters
Tiefkühltruhen, Kühlstärke mind. -20 °C	Verschiedene Hersteller
Trichter aus PP, Art. 709	VITLAB GmbH
TissueLyser	Qiagen, Retsch® GmbH
Übergangsstücke, Hülse NS 29 auf Kern NS 29, mit Glasfritte P1 Ø 25 mm	DURAN Group GmbH
Verschlussclips	IKEA GmbH & Co. KG

Tabelle 21: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	CAS- Nummer	Reinheit
Acetonitril	Carl Roth GmbH & Co. KG	75-05-8	≥99.9 %
Coomassie-Brillant-Blau G-250	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	6104-58-1	k. A., da Gemisch aus mehreren Verbindungen
Deuteriumoxid	Deutero GmbH	7789-20-0	99.9 %
Dikaliumhydrogenphos- phat Trihydrat	Grüssing GmbH	7758-11-4	99 % f. a.
Dikaliumhydrogenphos- phat	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH München, Deutschland	7758-11-4	≥98 %
Dinatriumhydrogenphos- phat Dihydrat	Grüssing GmbH	10028-24-7	99.5 %
Ethanol	VWR® International GmbH Darmstadt, Deutschland	64-17-5	>99.7 %, absolut, für HPLC
Ethylendiamintetraessig- säure	Grüssing GmbH	60-00-4	>99 %
<i>n</i> -Hexan	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH München, Deutschland	110-54-3	≥95 %

7 Experimenteller Teil

Kaliumchlorid	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland	7447-40-7	≥99.5 %, zur Analyse
Kaliumdihydrogenphosphat	Grüssing GmbH	7778-77-0	≥98 %
Methanol	Carl Roth®	67-56-1	≥99 %
Methanol- <i>d</i> ₄	Euriso-top®	811-98-3	99.80 %
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	26628-22-8	≥99.0 %
Natriumchlorid	Grüssing GmbH Analytika Filsum, Deutschland	7647-14-5	Ca. 99.5 %, reinst.
Natriumdeuterooxid	Aldrich Chem. Co.®	1310-73-2	≥98 % 40 wt. % in D ₂ O
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Grüssing GmbH	14014-06-3	99 %
Natriumtrimethylsilylpropionat, deuteriert	Deutero GmbH	24493-21-8	99.0 %
<i>o</i> -Phosphorsäure	Grüssing GmbH Analytika Filsum, Deutschland	7664-38-2	Ca. 85 % zur Analyse
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH München, Deutschland	9048-46-8	ca. 99 %
Saccharose	Sigma Aldrich®	57-50-1	≥99.5 %
Salzsäure- <i>d</i> ₁	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	7698-05-7	38 % 99.5 atom % D
Stickstoff, flüssig	Linde®	007727-37-9	≥99.999 %
Tetramethylsilan	Deutero GmbH	75-76-3	99.8 %
Trockeneis (CO ₂)	Eiskalt Sauber GmbH, Linde®	124-38-9	k. A.

Tabelle 22: Verwendete Computer-gestützte Auswertungsprogramme

Programm	Hersteller
Amix 3.9.14	Bruker® Biospin GmbH
C-Design	FoBaSoft®
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation®
Topspin 2.1 zur Akquisition/ Topspin 3.2 zur Auswertung der NMR-Spektren	Bruker® Biospin GmbH

7 Experimenteller Teil

Chenomx NMR Suite Version 5.2	Chenomx Inc., Edmonton, Alberta Canada
ACD/ChemSketch, version 2020.1.1	Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada

Tabelle 23: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
<u>NMR-Spektrometer:</u> 400 MHz, Ultra Shield, Bruker® 600 MHz, Ultra Shield, Bruker® <u>Probenköpfe:</u> SEI 400 MHz SB 5 mm, mit Z-Gradienten BBFO 600 MHz S3 5 mm, mit Z-Gradienten (SmartProbe) <u>Konsolen:</u> Avance I 400 MHz Avance III 400 MHz Avance III HD 600 Mhz Automatischer Probenwechsler B-ACS-60 Temperierungseinheit BCU 05	Bruker® Biospin GmbH
Feinwaage: XA105DU	Mettler-Toledo GmbH
Kugelmühle: BeadRuptor 24	OMNI INTERNATIONAL®
Kugelmühle: TissueLyser	QIAGEN GmbH
Gefriertrocknungsanlagen: Christ Gamma 1-20 und Christ Beta 1-16	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH
Messermühle Grindomix 300	Retsch® GmbH
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc.
Zentrifuge Sigma 1-14	Sartorius AG
Stickstoff-Trockenblock (Metallblockthermostat)	Gebr. Liebisch GmbH & Co. KG

7.2 Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methoden der Probenahme, -vorbereitung, -aufarbeitung bis hin zum kernresonanzspektroskopischen Messverfahren und der statistischen Auswertung werden im Folgenden erläutert.

7.2.1 Probenahme

Im Jahr 2014 wurden je 3 kg erntefrischer, weißer Spargel direkt von einem Feld des Erzeugers entnommen und im Tiefkühltransporter bei -20 °C eingefroren.

Für die Jahre 2015 und 2016 erfolgte die Probenahme auf den Höfen der Landwirte/innen selbst, wo die Proben für etwa 45 Minuten im Eiswasserbad „schockgekühlt“, dabei von groben Verschmutzungen befreit und anschließend möglichst gründlich gewaschen wurden. Je nach Auslastung des Betriebes konnte der Spargel dann im Anschluss über eine Wasch- und Sortierstraße einer feineren Wäsche unterzogen werden; war dies nicht möglich, so wurden die Proben ohne Waschvorgang entgegengenommen und gegebenenfalls im Kühltransporter in einer mit Wasser gefüllten, dicht verschließbaren Transportbox grob gewaschen. Die Proben wurden mit einer entsprechenden Probenkodierung und einem daraus resultierenden Barcode verpackt und anschließend in Plastikkisten auf Scherbeneis im Kühltransporter bei 2 °C gelagert.

Das Schema der Probenkodierung sowie die vollständige Auflistung aller Proben, inklusive der jeweiligen Barcodes sind im Anhang in Abbildung 67 und in Tabelle 38, Tabelle 39, Tabelle 40 und Tabelle 41 aufgeführt.

Nach Beendigung der Probenahmetour wurden die Proben aus dem Jahrgang 2014 direkt in die Kühltruhen (-20 °C) der Laboratorien der Universität Hamburg umgelagert. In den Jahren 2015 und 2016 wurden die Proben zunächst in flüssigem Stickstoff (-196 °C) „schockgefroren“ und sodann in die Tiefkühltruhen (-20 °C) verlegt.

Die gesamte Prozedur wurde in 13 für den Spargelanbau relevanten Regionen an je drei Standorten in den Jahren 2014, 2015 und 2016 durchgeführt. Zusätzlich wurden im Jahr 2015, über die gesamte Ernteperiode hinweg verteilt, drei weitere Proben der Sorte *Gijnlim* vom Hof Schäfer in Schleswig-Holstein akquiriert. Weiterhin wurde im Jahr 2016 je eine Probe in je zehn relevanten Spargelanbauregionen in Polen und in den Niederlanden gesammelt. Alle weiteren ausländischen Proben (41) wurden auf Märkten, in Einzelhandelsgeschäften oder Großmärkten kommerziell erstanden.

Im Jahr 2014 wurden 41 deutsche und eine ausländische Probe, in 2015 71 deutsche und elf ausländische Proben und im Jahr 2016 106 deutsche und 49 ausländische Proben gesammelt.

7 Experimenteller Teil

Insgesamt wurden somit 279 Proben akquiriert. Je nach Verfügbarkeit wurden die Sorten *Backlim*, *Cumulus*, *Gijnlim* und *Grolim*, wahlweise auch *Avalim*, *Herkolim*, *Rafaello*, *Ramada*, *Ramires*, *Rapsody* oder *Ravel* entnommen. Die genaue Auflistung der ausländischen und deutschen Proben erfolgt in Tabelle 42, Tabelle 43 und Tabelle 44 im Anhang.

Für die Erfassung aller Parameter, welche potentiell für eine Abweichung im Metabolom verantwortlich sein können, wurde ein Metadatenblatt (Beispiel siehe Tabelle 45 im Anhang) erstellt. Dieses wurde entweder digital oder händisch vor Ort von den Anbauern ausgefüllt und anschließend von den Forschungsstellen 1 und 2 in eine Datenbank eingepflegt.

Die optimierte Standardarbeitsanweisung für die Probenahme des Spargels für die Jahre 2015, 2016 ist in Tabelle 24 zu sehen.

Tabelle 24: Protokoll zur Probenakquise von weißem Spargel

intSOP	#002-Version 6.1
Autor	Juliane Klare / Torben Grube / Eric Rottmann / Dr. Thomas Hackl
Stand	20160313
Titel	Protokoll zur Probenakquise des Spargels
Geräte und Materialien	Große Wanne oder Becken (wasserdicht verschließbar) Kühlakkus Kühltransporter Kühltruhen Flüssigstickstoff-Druckgasbehälter Plastiktüten (10 L) Siebkörbe Waage
Chemikalien	Wasser Flüssiger Stickstoff Die gesammelten Spargelproben sind im Anhang in der Tabelle 38, Tabelle 39, Tabelle 40 und Tabelle 41 aufgeführt.

Durchführung	Anfahren der Höfe oder des lokalen Einzelhandels Akquise drei Kilogramm vorgewaschenen, weißen, sortenreinen Spargels Bei Bedarf Waschen verschmutzter Proben im Kühltransporter in einer mit Wasser gefüllten, dicht verschließbaren Transportbox Transport der Proben bei 2 °C (auf Scherbeneis oder Kühlakkus) in die Universität Schockgefrieren der Proben indirekt in einer Plastiktüte mit flüssigem Stickstoff Lagerung der schockgefrorenen Proben bei -20 °C in Kühltruhen
---------------------	---

7.2.2 Probenvorbereitung

Waschprozess

Die Proben des Erntejahrganges 2014 wurden zunächst für einige Sekunden in einem Gefrierbeutel in flüssigem Stickstoff gelagert. Anschließend wurden je ca. 5 Sprosse gleichzeitig kurz in ein Eiswasserbad eingebracht. Durch das Entfernen der entstehenden Eisschicht wurden grobe Verschmutzungen mitentfernt. Anschließend folgte ein feinerer Waschschrift, welcher möglichst zügig unter 5 °C kaltem Millipore-Wasser per Hand vorgenommen wurde, bis keine Verschmutzungen mehr sichtbar waren. Sprosse, welche während dieses Vorganges brachen, nicht zu säubern waren oder deren äußeres Erscheinungsbild auf Krankheiten (Spargelrost) oder Überreife (grüne Stangen) schließen ließen, wurden nicht verworfen.

Für die deutlich saubereren Proben aus den Jahrgängen 2015 und 2016 wurde eine weniger umfangreiche und einfachere Methode gewählt: Die Sprosse wurden zuvor nicht in Stickstoff gelagert, sondern nach der Entnahme aus dem Tiefkühlfach direkt dem Feinwaschschrift unterzogen, indem sie zunächst für wenige Sekunden in eine Wanne, befüllt mit 5 °C kaltem, destilliertem Wasser, eingebracht wurden. Somit konnte der grösste Sand entfernt werden und es bildete sich nur eine minimale Eisschicht. Nachfolgend wurden die Sprosse ebenfalls unter 5 °C kaltem Millipore-Wasser feingewaschen.

Mahlprozess

Im Anschluss werden die sauberen Sprosse der Proben aus allen drei Erntejahren vom Köpfchen ausgehend auf 15 cm Länge mit einem Keramikmesser zugeschnitten und abermals in drei je 5 cm große Stücke geteilt. Die Spargelstücke werden zum Schutz des Metaboloms aufgrund der Erwärmung und zugefügten Schnittstellen sofort in einen in flüssigem Stickstoff liegenden Gefrierbeutel mit Standboden gelegt.

7 Experimenteller Teil

Es werden 50 % der stickstoffkalten Spargelstücke und 50 % Trockeneis, welches zuvor mit einem Hammer (mit dazwischenliegender Plastikfolie) möglichst fein zerkleinert wird, zu insgesamt maximal 800 g in den Mahlbehälter „Grindomix 300“ der Firma Retsch® eingewogen. Der Behälter wird mit dem im Tiefkühlschrank (-20 °C) vorgekühlten Deckel verschlossen und in die Halterung der Messermühle eingesetzt. Das Mahlprogramm (Tabelle 25) wird ausgewählt und gestartet. Der fertig gemahlene Spargel wird in einen im Stickstoff befindlichen, großen, dicht verschließbaren Kunststoffbehälter überführt und dort mit allen weiteren Mahlfractionen derselben Probe mit einem Plastiklöffel vermengt, zuletzt geschüttelt und noch einmal vermengt.

Gefriertrocknung

Es werden je 60 g der homogenisierten Menge mit einem Plastiklöffel über einen vorgekühlten Plastiktrichter in zwei ebenfalls vorgekühlte und mit Alufolie umwickelte 250 mL Rundkolben überführt. Zum Schutze der Gefriertrocknungsanlage werden die Kolben entweder mit einem Filterpapier, welches den Rand zwischen Kolbenschliff und Gummiaufsatz des Stutzens der Gefriertrocknungsanlage vollständig abschließt, oder mit einem entsprechenden Übergangsstück mit integrierter Glasfritte versehen. Der Kolbeninhalt wird nach 48 Stunden mit einem sauberen, trockenen Glasstab durchmengt, sodass auch größere Stückchen zerbrechen und eingeschlossenes Eis leichter sublimieren kann. Nach weiteren 24 Stunden werden die beiden zu einer Probe gehörigen Kolben abgenommen und in einem Mörser mit Pistill verrieben, sodass auch hier eine Homogenisierung gegeben ist. Das Lyophilisat wird mit Hilfe eines Plastiktrichters in ein 50 mL Probengefäß (Sarstedt AG & Co.) überführt und bei -20 °C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Die Bedienungsanleitung der Gefriertrocknungsanlagen ist neben dem Gerät (VGII, 6. Stock, Raum 665, Grindelallee 117, 20146 Hamburg) zu finden und ist bei Benutzung des Gerätes zu befolgen. Es ist darauf zu achten, die Gefriertrocknungsanlage mit ausreichender Vorlaufzeit einzuschalten, sodass sich das Vakuum stabil einstellen kann.

Die Schritte des Waschens, Schneidens, Mahlens und der Gefriertrocknung werden als „Probenvorbereitung“ bezeichnet. Die über die Jahre 2015 und 2016 optimierte Standardarbeitsanweisung #003-Version 7 über die Probenvorbereitung von weißem Spargel ist in Tabelle 25 zu sehen.

Tabelle 25: Protokoll zur Probenvorbereitung von weißem Spargel

intSOP	#003-Version 7
Autor	Juliane Klare / Torben Grube / Eric Rottmann / Dr. Thomas Hackl
Stand	20160313
Titel	Protokoll zur Probenvorbereitung von weißem Spargel
Geräte und Materialien	<p>2 Gefriertrocknungsanlagen (Christ, 2 x mit Trockenrechen, insgesamt 50 Plätze)</p> <p>250 mL Rundkolben</p> <p>Aluminiumfolie</p> <p>Barcodes</p> <p>Schneideunterlage aus einem weitestgehend inerten und harten Material, z. B. Melamin</p> <p>Eismaschine</p> <p>Gefrierbeutel mit Verschlussfunktion (3 L)</p> <p>Glasstab</p> <p>Hammer</p> <p>Kleine Wanne oder Becken zum Waschen während der Probenvorbereitung</p> <p>Langstiellöffel</p> <p>Gefriertrocknungsaufsatz mit integrierter Glasfritte</p> <p>Messer</p> <p>Messermühle „Grindomix 300“ der Firma Retsch®</p> <p>Mörser mit Pistill</p> <p>Flüssigstickstoff-Druckgasbehälter</p> <p>Rundfilter 7 cm</p> <p>stabile Gefriertüten (6 L und 10 L)</p> <p>Trichter</p> <p>Verschlussklips</p>
Chemikalien	<p>Destilliertes Wasser</p> <p>Flüssiger Stickstoff</p> <p>Trockeneis</p>

Durchführung	<p>Anstellen der Gefriertrocknungsanlage(n) nach Anleitung</p> <p>Vorkühlen des Deckels des Mahlbehälters bei -20 °C im Tiefkühlschrank</p> <p>Vorwaschen der Spargelstangen in einer mit kaltem Wasser (~5 °C) befüllten Wanne, womit grobe Verunreinigungen entfernt werden</p> <p>Abspülen mit vorgekühltem (5 °C) Millipore-Wasser</p> <p>Kürzen der Spargelstangen auf 15 cm und sofortiges Zerkleinern in drei Teile (á 5 cm) und anschließendes Tieffrieren in einem in Flüssigstickstoff liegenden Gefrierbeutel (innerer Beutel 6 L mit Standboden, äußerer Beutel 10 L)</p> <p>Einwaage von ca. 400 g Spargel + 400 g Trockeneis im Mahlbehälter</p> <p>Mahlen des Gemisches mit der Messermühle der Firma Retsch® bei folgendem Mahlprogramm:</p> <p>20 Sekunden bei 1,000 rpm (vorwärts)</p> <p>30 Sekunden bei 4,000 rpm (vorwärts)</p> <p>5 Sekunden Pause</p> <p>30 Sekunden bei 4,000 rpm (vorwärts)</p> <p>5 Sekunden Pause</p> <p>30 Sekunden bei 4,000 rpm (vorwärts)</p> <p>Sammeln des Mahlgutes in einer Plastikbox mit Verschlussfunktion zum vereinfachten Durchmengen unter Zuhilfenahme eines langstieligen Plastiklöffels</p> <p>Überführen von je ca. 60 g des Pulvers in zwei 250 mL Rundkolben unter Zuhilfenahme eines ebenfalls vorgekühlten Trichters (-20 °C)</p> <p>Etikettieren mit dem entsprechenden Barcode</p> <p>Einsetzen eines Gefriertrocknungsaufsatzes mit integrierter Glasfritte oder alternativ eines vorgefalteten Rundfilters am Hals des Kolbens zum Schutze der Gefriertrocknungsanlage</p> <p>48 h Lyophilisieren, danach Umrühren mit einem sauberen, trockenen Glasstab</p> <p>24 h Lyophilisieren, Abnehmen der Kolben, Mörsern und Überführen in 50 mL große Probengefäße (Sarstedt AG & Co.). Zum Schutze vor Feuchtigkeit werden die Probengefäße in Gefrierbeuteln mit Verschlussfunktion bei mindestens -20 °C gelagert.</p>
---------------------	--

7.2.2.1 Gefriertrocknungszeiten der Spargelproben

Im Rahmen des Probenvorbereitungsprozesses wurden verschiedene Gefriertrocknungsmethoden (Tabelle 26) des Spargels überprüft. Die Probenvorbereitung erfolgte gemäß der Probenvorbereitungsmethode in Tabelle 25 unter Punkt 7.2.2; die Probenaufarbeitung entsprechend der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3) in Tabelle 30 unter Punkt 7.2.4.1. Folgende vier Gefriertrocknungsmethoden wurden dabei je zwei Mal an drei unterschiedlichen Höhenpositionen des Trockenrechens der Gefriertrocknungsanlage untersucht (Tabelle 26). Die Doppelbestimmungen der jeweiligen Trocknungsmethode pro Höhenposition wurde gemittelt, sodass 12 Versuchsansätze resultierten.

Tabelle 26: Untersuchte Gefriertrocknungsmethoden

Kürzel der Trocknungsmethode	Erläuterung
24 R 24 A	Rühren des vorgetrockneten Spargels nach 24stündiger Gefriertrocknung mit Hilfe eines Glasstabes Abnehmen des getrockneten Spargels nach weiterer 24stündiger Gefriertrocknung
48 R 24 A	Rühren des vorgetrockneten Spargels nach 48stündiger Gefriertrocknung mit Hilfe eines Glasstabes Abnehmen des getrockneten Spargels nach weiterer 24stündiger Gefriertrocknung
48 R 48 A	Rühren des vorgetrockneten Spargels nach 48stündiger Gefriertrocknung mit Hilfe eines Glasstabes Abnehmen des getrockneten Spargels nach weiterer 48stündiger Gefriertrocknung
96 A	Abnehmen des getrockneten Spargels nach 96stündiger Gefriertrocknung

7.2.3 Methodenentwicklung der Probenaufarbeitung

7.2.3.1 Herstellung der verwendeten Puffer

In Tabelle 27 sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Puffersysteme dargestellt:

Tabelle 27: verwendete Puffersysteme

Gr.	Puffergemische	Einwaage [g]	/ Volumina // Verdünnungen [L]	Konzentrationen [mM]
A	NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O / Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	0.96 / 1.07	/0.05	~240
	TMSP	0.09	/0.01//0.0005/0.05	~0.5
B	Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O / NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	0.5334 / 0.4678	/0.03	~200
	EDTA	0.0587	/0.03	~5
	TMSP	0.08886	/0.01//0.003/0.03	~5
	Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O / NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	0.5334 / 0.4678	/0.03	~200
	TMSP	0.08886	/0.01//0.003/0.03	~5
	K ₂ HPO ₄ ·3 H ₂ O / NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	0.6834 / 0.4647	/0.03	~200
	EDTA	0.0570	/0.03	~5
	TMSP	0.08886	/0.01//0.003/0.03	~5
	K ₂ HPO ₄ ·3 H ₂ O / NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	0.6834 / 0.4647	/0.03	~200
	TMSP	0.08886	/0.01//0.003/0.03	~5
	K ₂ HPO ₄ ·3 H ₂ O / KH ₂ PO ₄	0.6886 / 0.4066	/0.03	~200
	EDTA	0.0580	/0.03	~5
	TMSP	0.08886	/0.01//0.003/0.03	~5
	K ₂ HPO ₄ ·3 H ₂ O / KH ₂ PO ₄	0.6886 / 0.4066	/0.03	~200
TMSP	0.08886	/0.01//0.003/0.03	~5	
C	K ₂ HPO ₄ ·3 H ₂ O / KH ₂ PO ₄	3.4149 / 2.0369	/0.03	~1,000
	TMSP	0.08886	/0.01//0.003/0.03	~0.5
	K ₂ HPO ₄ ·3 H ₂ O / KH ₂ PO ₄	1.3670 / 0.8171	/0.03	~400
			Verdünnung des 400 mM-Puffers: //15/30	~200
	TMSP	0.08886	/0.01//0.003/0.03	~0.5

7 Experimenteller Teil

D	K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄	1.3670 / 0.8171	/0.03	~400
			Verdünnung des 400 mM-Puffers: //15/30	~200
	TMSP	0.08886	/0.01//0.003/0.03	~0.5
	K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄	0.5675 / 0.3433	/0.05	~100
	TMSP	0.08886	/0.01//0.005/0.05	~0.5
	NaN ₃	0.013	/0.002//0.001/0.05	~2

Gruppe A: Natriumhydrogenphosphatpuffer zur Untersuchung des Extraktionsmittels und der Gefriertrocknungsdauer

Für verschiedene Versuche (u. a. Punkt 7.2.3.2) im Rahmen der Methodenentwicklung wurden zur Probenaufarbeitung die Arbeitsschritte aus der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) verfolgt und zunächst ein Natriumhydrogenphosphatpuffer verwendet. Die Herstellung des 240 mM Phosphatpuffers war auf ein Gesamtvolumen von 50 mL ausgelegt und wird im Folgenden beschrieben:

Die Puffersubstanzen (0.96 g NaH₂PO₄ · 2 H₂O und 1.07 g Na₂HPO₄ · 2 H₂O) wurden in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 25 mL D₂O quantitativ in einen weithalsigen 50 mL Messzylinder überführt, sodass sowohl eine pH-Elektrode eingesetzt werden konnte, als auch ein Volumen ablesbar war. 0.09 g der Standardsubstanz Natriumtrimethylsilylpropionat (TMSP) wurden mit Hilfe eines Wägeschiffchens eingewogen und in einen 10 mL Maßkolben mit D₂O (≙ 50 mM) quantitativ überführt. Es wurde zur Marke aufgefüllt. Von der TMSP-Stammlösung wurden 500 µL zur Pufferlösung in den 50 mL Messzylinder gegeben (später wurde auf 50 mL aufgefüllt, was einer TMSP-Sollkonzentration von 0.5 mM entsprach (1:100 Verdünnung)).

Zunächst wurde die pH-Elektrode mit den dafür vorgesehenen Lösungen kalibriert. Die Pufferlösung wurde auf einen pD-Wert von 7.6 (≙ pH = 7.2, da pD = pH + 0.452 (Covington *et al.*, 1968)) eingestellt, sodass sich die Lösung im Phosphatpufferbereich befand. Hierbei wurde der pD-Wert mit DCI und NaOD eingestellt: Erfahrungsgemäß wurden ca. 10 Tropfen NaOD (0.5 mL) benötigt. Anschließend wurde mit D₂O auf 50 mL im Messzylinder aufgefüllt und, falls notwendig, nochmals der pH-Wert nachkorrigiert. Die Lösung wurde in ein braunes Schraubglas mit Weithalsöffnung überführt und kühl gelagert.

Gruppe B: Untersuchung verschiedener Puffersysteme und Additive

Weitere Puffersysteme und Additive wurden zu Vorversuchszwecken untersucht, wobei die Vorgehensweise der Probenaufarbeitung den Arbeitsschritten aus der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) entspricht.

Die Pufferkomponenten wurden jeweils in ein skaliertes 50 mL Probengefäß mit Schraubdeckel (Sarstedt AG & Co.) eingewogen und mit 25 mL D₂O versetzt. Es wurden 3 mL einer 50 mM TMSP-Stammlösung (\equiv 0.08886 g TMSP gelöst in 10 mL D₂O, Aliquot von 3 mL aufgefüllt auf 30 mL, entsprechend einer Endkonzentration von 5 mM) hinzugegeben. Der pH-Wert wurde mit 4 M DCI sowie 4 M NaOD oder deren Verdünnungen auf 7.6 eingestellt und die Lösung im skalierten Probengefäß (Sarstedt AG & Co.) auf ein Gesamtvolumen von 30 mL mit D₂O aufgefüllt.

Die unter dem Stickstoffstrom getrockneten Extrakte wurden zum einen nur mit dem Puffer-TMSP-D₂O-Gemisch und zum anderen zusätzlich mit einem Additiv, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), versetzt. Jeder Probenextrakt wurde nach der Probenaufarbeitung mittels Vortexer vermengt und nochmals für zehn Minuten zentrifugiert. 550 μ L des Extraktüberstandes wurden in ein 5 mm-NMR-Röhrchen überführt und direkt vermessen. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Gruppe C: Untersuchung verschiedener Pufferkonzentrationen

Für die Eignungsprüfung eines Kaliumhydrogenphosphatpuffers wurden eine 200 mM und eine 1,000 mM Pufferlösung angesetzt. Sechs unterschiedliche Spargelproben des Erntejahrganges 2014 wurden entsprechend Tabelle 28 eingewogen und nach der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) aufgearbeitet. Nach der Trocknung unter einem Stickstoffstrom wurden die Extrakte mit 800 μ L des jeweiligen Puffers versetzt und direkt vermessen. Jeder Versuch erfolgte in einer Doppelbestimmung.

Tabelle 28: Einwaagen der sechs Spargelproben zur Extraktion mit zwei unterschiedlich hoch konzentrierten Kaliumhydrogenphosphatpufferlösungen

Kodierung der Spargelprobe	Einwaage der Spargelprobe [mg]
14-DE-SH-Saf-Gi	200 mM Puffer: 75.06; 75.40 1,000 mM Puffer: 75.75; 75.66
14-DE-BWS-Lan-Gi	200 mM Puffer: 75.49; 75.28 1,000 mM Puffer: 75.48; 75.47
14-DE-BWS-Smi-Gi	200 mM Puffer: 75.32; 75.17 1,000 mM Puffer: 75.56; 75.65
14-DE-BYAb-Kug-Gr	200 mM Puffer: 75.18; 75.35 1,000 mM Puffer: 75.21; 75.37

7 Experimenteller Teil

14-DE-SH-Har-Ba	200 mM Puffer: 75.30; 75.09 1,000 mM Puffer: 75.79; 75.43
14-DE-BYSr-Gam-Gi	200 mM Puffer: 75.85; 75.24 1,000 mM Puffer: 75.97; 75.65

Gruppe D: Konzentrationsoptimierung des Kaliumhydrogenphosphatpuffers

Die Spargellyophilisate der sechs Proben aus Tabelle 28 wurden entsprechend der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) aufgearbeitet. In folgenden Punkten wurde von dieser Methode für die Aufarbeitung der Proben der Gruppe D abgewichen:

Die Proteine wurden im ersten Extraktionsschritt nun in einer anderen Kugelmühle, dem BeadRuptor 24, für drei Minuten bei 3.1 m/s mit der Hälfte des ursprünglichen Extraktionsvolumens von 1,425 µL, entsprechend 712.5 µL Methanol- d_4 gefällt. Die Trocknung unter dem Stickstoffstrom entfiel, da nur noch deuterierte Lösungen eingesetzt wurden. Nach einer fünfminütigen Ruhepause bei -20 °C wurde dieselbe Menge des deuterierten Kaliumhydrogenphosphatpuffers, welcher nun aus den wasserfreien Salzen hergestellt wurde, hinzugegeben. Hierfür wurde ein niedrigerer Konzentrationsbereich zwischen 50 mM und 100 mM (aufgrund der 1:2-Verdünnung entsprechend 100 mM und 200 mM in den Pufferstammlösungen) untersucht. Ebenfalls wurde der Pufferlösung Natirumazid zugegeben. Ein weiteres Mal wurde mit dem BeadRuptor 24 unter denselben Bedingungen (3.1 m/s, drei Minuten) extrahiert. Eine weitere fünfminütige Ruhephase bei -20 °C folgte und nach dem letzten Extraktionsschritt mittels BeadRuptor 24 (3.1 m/s, drei Minuten) wurden die Extrakte bei 16,099 g bei 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. 600 µL des Überstandes wurden in das 5 mm-NMR-Röhrchen überführt und direkt vermessen.

7.2.3.2 Wahl des Extraktionsmittels und der Trocknungsmethode

Im Rahmen der Methodenentwicklung der Probenaufarbeitung musste ein geeignetes Extraktionsmittel evaluiert, bzw. dasselbe für die anschließende NMR-spektroskopische Messung entfernt werden. In diesem Zuge wurden verschiedene Methodenschritte untersucht. Es wurden jeweils 30 Mal (75.00-75.99) mg des Lyophilisates einer Spargelprobe mit einem Mikro-Einwegspatel in ein rundzulaufendes 2 mL Eppendorf-Cap eingewogen. Zwei nach Punkt 7.2.3.3 entfettete Stahlkugeln und 1,425 µL des jeweiligen Lösungsmittels /-gemisches (Acetonitril, Methanol) wurden hinzugegeben. Folgende Lösungsmittelkombinationen wurden untersucht: Methanol 100 %, Methanol 66 % + Acetonitril 33 %, Methanol 50 % + Acetonitril 50 %, Methanol 33 % + Acetonitril 66 % sowie Acetonitril 100 %. Anschließend wurde das Gemisch mit Hilfe der Kugelmühle TissueLyser, QIAGEN GmbH extrahiert. Die Proben wurden

7 Experimenteller Teil

dreimal für je drei Minuten mit je einer fünfminütigen Ruhepause bei -20 °C zwischen den Mahlschritten extrahiert. Im Anschluss wurden die Suspensionen bei $16,099\text{ g}$ für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und $800\text{ }\mu\text{L}$ des Überstandes in ein neues 2 mL Extraktionsgefäß überführt.

Alle fünf Lösungsmittelversuche wurden mit je drei verschiedenen Trocknungsmethoden für 24 Stunden behandelt: Zum einen wurde die Trocknung mit Hilfe der Gefriertrocknungsanlage (einmal mit Trockenrechen, einmal mit Tellereinsatz) und zum anderen unter einem kontinuierlichen Stickstoffstrom in einem Metallblockthermostat, Gebr. Liebisch GmbH & Co. KG, vorgenommen. Bei der Gefriertrocknung der Extrakte wurden die Proben zunächst im geöffneten Zustand mit Parafilm überzogen und kleine Löcher hineingestochen, um das Abziehen der sublimierenden Gase zu ermöglichen. Sodann wurden die Proben bei -80 °C tiefgefroren und zum Zeitpunkt des Gefriertrocknungsbeginns schnellstmöglich in / an die Gefriertrocknungsanlage gebracht. Bei der Gefriertrocknung mit Hilfe des Trockenrechens mussten die Probengefäße vorsichtig in einen Rundkolben eingesetzt werden, sodass diese kontaminationsfrei an die Gummiaufsätze der Gefriertrocknungsanlage angebracht werden konnten. Die Proben, welche mittels Gefriertrocknung und Tellereinsatz lyophilisiert wurden, wurden in einer Standvorrichtung (Rack) für Eppendorf-Caps in das Innere der Anlage auf den Tellern platziert und nach Aufsetzen der Glocke das Vakuum gezogen.

Die Rückstände aller drei Trocknungsmethoden-Proben wurden sodann jeweils mit $800\text{ }\mu\text{L}$ eines $\sim 240\text{ mM}$ deuterierten Natriumhydrogenphosphatpuffers (Herstellung siehe Punkt 7.2.3.1, Tabelle 27 und Gruppe A) versetzt, mit Hilfe des Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., durchmischt und abermals für zehn Minuten bei $16,099\text{ g}$ bei 4 °C zentrifugiert. Schließlich wurden $550\text{ }\mu\text{L}$ des Überstandes in ein 5 mm NMR-Röhrchen überführt und direkt zur Messung eingesetzt. Für jeden Einzelversuch erfolgte eine Doppelbestimmung.

Die hierzu verwendete Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3) ist in Tabelle 30 zu sehen, wobei die Arbeitsschritte 4 und 7 der Durchführung durch die oben beschriebenen Änderungen ersetzt wurden.

7.2.3.3 Soxhlet-Extraktion zur Entfettung der Stahlkugeln

Die Stahlkugeln wurden von einem Fahrrad Einzelhandelsgeschäft bezogen. Das noch anhaftende Schmierfett wurde in einem vierstündigen Extraktionsschritt mit *n*-Hexan in einer Soxhlet-Apparatur vorgenommen. Die entfetteten Kugeln wurden sodann unter dem Abzug in einer Kristallisierschale getrocknet.

Der Aufbau der Soxhlet-Apparatur ist im Anhang in Abbildung 66 und die Vorgehensweise in der internen Standardarbeitsanweisung (intSOP #001-Version 1) in Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 29: Protokoll zur Soxhlet-Extraktion von Stahlkugeln zur Entfettung

intSOP:	#001-Version 1
Autor	Juliane Klare / Andreas Heinze / Thomas Hackl
Stand	20131201
Titel	Protokoll zur Soxhlet-Extraktion von Stahlkugeln zur Entfettung
Geräte und Materialien	Rundkolben, 250 mL, NS 29 Stahlkugeln, Ø 3 mm Soxhlet Extraktionshülse Heizpilz Kristallisierschale
Chemikalien	<i>n</i> -Hexan Siedesteine
Durchführung	Vorbereiten der Apparatur gemäß Abbildung 66 Einfüllen der Kugeln bis zur Hälfte der Hülsenhöhe Einfügen der befüllten Hülse in das Soxhlet Befüllen des Rundkolbens mit etwa 100 mL - 150 mL <i>n</i> -Hexan und Zugabe von ca. drei Siedesteinen Anstellen des Kühlwassers Einstellen des Heizpilzes auf mittlerer Stufe Beobachten des Beginns des Siedevorgangs und Extrahieren für einen ca. vierstündigen Zeitraum Ausstellen sowie Abkühlen des Heizpilzes und Kolbens, Deinstallation der Apparatur Trocknen der Stahlkugeln bei Raumtemperatur in einer Kristallisierschale unter dem Abzug

7.2.4 Probenaufarbeitung

Die Schritte der Einwaage, Extraktion, Zentrifugation und Überführung in das NMR-Röhrchen werden als „Probenaufarbeitung“ bezeichnet. Für einige Vorversuche wurde die Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30) verwendet, für alle Proben der Jahrgänge 2014 bis 2016, welche zur statistischen Auswertung herangezogen wurden, wurde nach der Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) gearbeitet.

Die Einwaagen liegen für alle Untersuchungen zwischen 75.00 mg und 75.99 mg. Für eventuelle Nachprüfungen sind alle Einwaagen den Laborjournalen „Eric Rottmann

Diplomarbeit“, „Torben Grube 6325762 Laborjournal-Diplom“ und „Laborjournal Juliane Klare“ zu entnehmen.

7.2.4.1 Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3)

Unter Punkt 7.2.3.2 wurde bereits das Vorgehen der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3) beschrieben; die Standardarbeitsanweisung sei im Folgenden in Tabelle 30 aufgeführt.

Tabelle 30: Protokoll zur polaren Extraktion von weißem Spargel nach Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3)

intSOP:	#004-Version 3
Autor	Juliane Klare / Torben Grube / Thomas Hackl
Stand	20150925
Titel	Protokoll zur polaren Extraktion von weißem Spargel nach Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3)
Geräte und Materialien	2 Gefriertrocknungsanlagen (Christ, 1 x mit Trockenrechen und 1 x mit Tellereinsatz) Aluminiumfolie Braunes Schraubglas mit Dichtung und Weithalsöffnung (50 mL) Eismaschine Erlenmeyerkolben 100 mL Kolbenhubpipette (Eppendorf 100 µL – 1,000 µL) Kugelmühle: TissueLyser Kühltruhe Maßkolben 10 mL Messzylinder 50 mL Mikro-Einwegspatel, Kunststoff der Firma Carl-Roth NMR-Röhrchen 5 mm (Deutero Boroeco-5-7) mit Deckel Pasteurpipetten

7 Experimenteller Teil

	<p>Reaktionsgefäße (2.0 mL Eppendorf-Cap, Typ: rund zulaufend; 1.5 mL Eppendorf-Cap; Typ: spitz zulaufend)</p> <p>Rundfilter 7 cm</p> <p>Rundkolben 250 mL</p> <p>Stahlkugeln (Durchmesser: 3 mm; entfettet durch Soxhlet-Extraktion mit <i>n</i>-Hexan)</p> <p>Stickstoff-Trockenblock</p> <p>Vortex-Schüttler (Scientific industries inc., Bohemia NY, USA, Typ: G-560E)</p> <p>Waage</p> <p>Wägeschiffchen</p> <p>Zentrifuge (Sartorius AG, Göttingen, Germany, Typ:1-14)</p>
Chemikalien	<ul style="list-style-type: none"> • Eis • Methanol (HPLC ≥ 99.9 %) • Flüssigstickstoff N₂ • Deuteriertes Wasser D₂O • Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat Na₂HPO₄ · 2 H₂O • Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat NaH₂PO₄ · 2 H₂O • Natriumtrimethylsilylpropionat TMSP • Salzsäure, deuteriert DCI • Natriumhydroxid, deuteriert NaOD
Durchführung	<p>Einwaage von (75.00-75.99) mg Lyophilisat in ein rund zulaufendes 2.0 mL Eppendorf-Cap. Die Einwaage wird notiert (einzuplanende Zeit: ein bis zwei Minuten pro Einwaage).</p> <p>Die Lösungsmittel sowie die Reaktionsgefäße werden mittels Eis gekühlt; zum Feuchtigkeitsschutz der Proben wird zwischen die Probenhalterung und das Eis eine Schicht aus Aluminiumfolie gelegt.</p> <p>Zugabe von zwei entfetteten Stahlkugeln</p> <p>Zugabe von 1425 µL des Methanols</p> <p>Drei Mal fünf Minuten Extraktion mit der Kugelmühle bei 30 Hz mit jeweils fünfminütiger Inkubationspause zwischen den Extraktionsschritten</p> <p>Zentrifugation des Ansatzes bei 16,099 g für 30 Minuten</p> <p>Überführen von 800 µL des Überstandes in ein spitz zulaufendes 1.5 mL Eppendorf-Cap</p>

7 Experimenteller Teil

	<p>Entfernung des Methanols mittels Stickstoffstrom bei 0.5 bar für ca. 24 h</p> <p>Herstellung einer TMSP-Stammlösung:</p> <p>Einwaage von 88.86 mg TMSP und quantitative Überführung mit D₂O in einen 10 mL Maßkolben (\equiv 50 mM), Auffüllen bis zur Marke, zur längeren Aufbewahrung Überführung in ein braunes Schraubglas mit Dichtung und Weithalsöffnung</p> <p>Herstellung des deuterierten Puffers für ein Volumen von 50 mL:</p> <p>Einwaage von 0.96 g NaH₂PO₄ · 2 H₂O und 1.07 g Na₂HPO₄ · 2 H₂O (\equiv ~240 mM) (oder entsprechende Mengen der anderen Puffersubstanzen (Gruppe A, B, C und D) unter Punkt 7.2.3.1)</p> <p>Überführen mit 45 mL D₂O in einen 50 mL Messzylinder</p> <p>500 μl der TMSP-Stammlösung in den 50 mL Messzylinder geben (\equiv 1:100-Verdünnung, = 0.5 mM TMSP)</p> <p>Kalibration der pH-Elektrode, anschließend mit D₂O abspülen.</p> <p>Einstellen des pH-Wertes mit DCI / NaOD (benötigt werden erfahrungsgemäß ca. 10 Tr. NaOD \equiv 0.5 mL) auf pH = 7.2 (\equiv pD = 7.6)</p> <p>Auffüllen der Lösung mit D₂O im Messzylinder auf 50 mL, abermalige Überprüfung des pH-Wertes, ggf. Nachkorrigieren</p> <p>Überführung in ein braunes Schraubglas mit Dichtung und Weithalsöffnung</p> <p>Aufnehmen des Lyophilisates mit 800 μl deuteriertem Puffer (~240 mM NaH₂PO₄ · 2 H₂O / Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 0.5 mM TMSP)</p> <p>Vortex für 10 Sekunden</p> <p>Zentrifugation bei 16,099 g für zehn Minuten</p> <p>Überführen von 600 μL in ein 5 mm NMR-Röhrchen, Verschließen des Röhrchens mit einer Kappe und Beschriftung des Röhrchens am Hals</p> <p>Extrakte und Verdünnungen werden möglichst sofort vermessen.</p>
Hinweise	<p>Alle verwendeten Glasgeräte müssen ggf. mit dem entsprechenden Lösungsmittel gespült werden. Die Reaktionsgefäße und Lösungen werden vor und während der Benutzung gekühlt.</p>

7.2.4.2 Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7)

Im Folgenden wird die Standardarbeitsanweisung der Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7) beschrieben. Die aus den Jahren 2015 und 2016 optimierte Standardarbeitsanweisung ist in Tabelle 31 zu sehen.

7 Experimenteller Teil

Für eine Dreifachbestimmung werden je drei Mal (75.00-75.99) mg der Probe mit einem Mikro-Einwegspatel in ein 2 mL Eppendorf-Cap eingewogen und die Einwaagen notiert. Im Anschluss werden je zwei Stahlkugeln, welche zuvor entfettet wurden (siehe Punkt 7.2.3.3), hinzugegeben und, bei nicht direkt anschließender Extraktion, das Extraktionsgefäß verschlossen.

Für die polare Extraktion werden 712.5 μL Methanol- d_4 auf das Lyophilisat gegeben, sodass die Proteine ausgefällt werden. Das Cap wird verschlossen und in der Kugelmühle „BeadRuptor 24“ für drei Minuten bei 3.1 m/s extrahiert. Die Proben werden entnommen und ruhen mindestens fünf Minuten bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ im Tiefkühlschrank, sodass sich die denaturierten Proteine, aber auch andere nicht lösliche Pflanzenbestandteile, absetzen können. Dieser Vorgang ist visuell feststellbar (Absetzen der festen Bestandteile auf dem Gefäßboden). Anschließend werden die Extraktionsgefäße geöffnet und 712.5 μL der deuterierten Pufferlösung (siehe Tabelle 31 Arbeitsschritt 3) hinzugegeben. Es folgen unter denselben Parametern ein zweiter Mahlschritt, eine weitere fünfminütige Ruhephase bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ und ein dritter Mahlschritt.

Die Proben werden mit Hilfe der Zentrifuge „Sigma 1-14“ mit 16,099 g im Kühlraum bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Nach 15 Minuten wird unterbrochen und alle Proben, welche im äußeren Ring angeordnet sind, um 180 ° um ihre eigene Achse gedreht, sodass der Bodensatz sich im unteren Teil des Extraktionsgefäßes sammeln kann und eine Ansammlung entlang der Gefäßwandung zu vermeiden. Es wird weitere 15 Minuten unter denselben Bedingungen zentrifugiert.

600 μL des klaren Überstandes werden sauber und ohne Bodensatz in ein 5 mm Boroeco NMR-Röhrchen überführt und umgehend mit einer Kappe verschlossen. Die Proben werden innerhalb von maximal zwei Tagen vermessen.

Tabelle 31: Protokoll zur polaren Extraktion von weißem Spargel nach Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7) für die 1D- ^1H -NOESY-, J-RES- und TOCSY-Experimente

intSOP	#004-Version 7
Autor	Juliane Klare / Torben Grube / Eric Rottmann / Dr. Thomas Hackl
Stand	20160313
Titel	Protokoll zur Probenaufarbeitung des Spargels für die Messungen von 1D- ^1H -NOESY-, J-RES- oder TOCSY-Experimenten

intSOP	#004-Version 7
Geräte und Materialien	Aluminiumfolie Braunes Schraubglas mit Dichtung und Weithalsöffnung (250 mL) BeadRuptor 24 (Omni International, The Homogenizer Company™) Eismaschine Kühltruhe Maßkolben 2 mL, 10 mL Messzylinder 250 mL Mikro-Einwegspatel, Kunststoff der Firma Carl-Roth NMR-Röhrchen 5 mm (Deutero Boroeco-5-7) mit Deckel Pasteurpipetten pH-Elektrode Kolbenhubpipette (Eppendorf 100 µL – 1,000 µL) Reaktionsgefäße (2.0 mL Eppendorf-Cap, Typ: rund zulaufend) Stahlkugeln (Durchmesser: 3 mm; entfettet durch Soxhlet-Extraktion mit <i>n</i> -Hexan) Waage Wägeschiffchen Zentrifuge (Sartorius AG, Göttingen, Germany, Typ:1-14)
Chemikalien	<ul style="list-style-type: none"> • Eis • Deuteriertes Methanol CD₃OD • Deuteriertes Wasser D₂O • Dikaliumhydrogenphosphat, wasserfrei K₂HPO₄ • Kaliumdihydrogenphosphat, wasserfrei KH₂PO₄ • Natriumtrimethylsilylpropionat TMSP • Natriumazid NaN₃ • Natriumhydroxid NaOD • Salzsäure DCI
Durchführung	<p>Einwaage von (75.00-75.99) mg Lyophilisat in ein rund zulaufendes 2.0 mL Eppendorf-Cap. Die Einwaage wird notiert (einzuplanende Zeit: ca. ein bis zwei Minuten pro Einwaage).</p> <p>Die Lösungsmittel sowie die Reaktionsgefäße werden mittels Eis gekühlt; zum Feuchtigkeitsschutz der Proben wird zwischen die Probenhalterung und das Eis eine Schicht aus Aluminiumfolie gelegt.</p>

<p>Zugabe von zwei zuvor entfetteten Stahlkugeln</p> <p>Herstellung des deuterierten Puffers (Anleitung für eine Menge von 200 mL):</p> <p>Herstellung einer TMSP-Stammlösung:</p> <p>Einwaage von 88.86 mg TMSP und Überführung in einen 10 mL Maßkolben mit D₂O (≅ 50 mM)</p> <p>Zur längeren Aufbewahrung Überführung in ein braunes Schraubglas mit Dichtung und Weithalsöffnung, 250 mL</p> <p>Herstellung einer Natriumazid-Stammlösung:</p> <p>Einwaage von 0.052 g NaN₃ und Überführen in einen 2 mL Maßkolben, Auffüllen zur Marke mit D₂O (≅ 0.4 M)</p> <p>Herstellung des Kaliumhydrogenphosphatpuffers für ein Volumen von 200 mL:</p> <p>Kalibration der pH-Elektrode, anschließend mit D₂O abspülen</p> <p>Einwaagen von 2.72 g KH₂PO₄ und 3.48 g K₂HPO₄ (≅ 200 mM)</p> <p>Überführen mit 100 mL D₂O in einen weithalsigen 250 mL Messzylinder</p> <p>Zugabe von 2 mL TMSP-Stammlösung (V = 200 mL; 1:100-Verdünnung ≅ 0.5 mM)</p> <p>Zugabe von 1 mL Natriumazidlösung (1:200-Verdünnung ≅ 2 mM)</p> <p>Einstellen des pH-Wertes mit DCI / NaOD (benötigt werden erfahrungsgemäß ca. 1 mL) auf pH = 7.0 (≅ pD = 7.4)</p> <p>Auffüllen der Lösung mit D₂O auf 200 mL, abermalige Überprüfung des pH-Wertes, ggf. Nacheinstellen</p> <p>Zugabe von 712.5 µL des Extraktionsmittels Methanol-d₄ zum Lyophilisat</p> <p>Drei Minuten Extraktion mit dem BeadRuptor 24 bei 3.1 m/s, danach Inkubationszeit von fünf Minuten bei -20 °C</p> <p>Zugabe von 712.5 µL Phosphatpuffer (Endkonzentration des Extraktes: 100 mM KH₂PO₄ / K₂HPO₄, 1 mM NaN₃, 0.25 mM TMSP)</p> <p>Drei Minuten Extraktion bei 3.1 m/s, anschließend Inkubationszeit von fünf Minuten bei -20 °C</p> <p>Drei Minuten Extraktion bei 3.1 m/s</p> <p>Zentrifugation des Extraktionsansatzes bei 16,099 g für 30 Minuten.</p> <p>Überführen von 600 µL in ein 5 mm NMR-Röhrchen, Verschließen des Röhrchens mit einer Kappe und Beschriftung am oberen Ende des Röhrchens</p> <p>Extrakte und Verdünnungen werden möglichst sofort und spätestens innerhalb von 2 Tagen vermessen.</p>
--

intSOP	#004-Version 7
Hinweise	Alle verwendeten Glasgeräte müssen ggf. mit dem entsprechenden Lösungsmittel gespült werden. Die Reaktionsgefäße und Lösungen werden vor und während der Benutzung gekühlt.

7.2.5 NMR-spektroskopische Messung

Methodenentwicklung

Für die Methodenentwicklung der NMR-spektroskopischen Messung wurden sechs Proben aus dem Jahr 2014, bzw. eine Mischprobe aus verschiedenen Spargelproben verwendet und mit Hilfe des 1D-¹H-NOESY-Experiments (noesygppr1d) vermessen (siehe Tabelle 32). Die Messungen erfolgten an einem 400 MHz Bruker® NMR-Spektrometer mit einer Avance II 400 MHz Bruker® Konsole. Es wurde ein SEI 400 MHz SB 5 mm Probenkopf mit Z-Gradienten verwendet. Die Messungen für die Methodenentwicklung weichen, ergänzend zu oben genannten Parametern, hinsichtlich folgender weiterer Parameter von Tabelle 32 ab: NS = 64, O1P = 4.84 ppm.

Metabolomanalyse

Alle Proben aus den Erntejahrgängen 2014-2016 (Tabelle 38, Tabelle 39, Tabelle 40, Tabelle 41 im Anhang) wurden im Rahmen dieser Analyse vermessen. Das 1D-¹H-NOESY-Experiment (Sequenzname: noesygppr1d) wurde zur Erfassung des metabolischen Fingerabdrucks jeder Einzelprobe der drei Jahrgänge gewählt (Messparameter siehe Tabelle 32). Alle Spektren wurden in einem Zeitraum von zwölf Monaten gemessen. Jedem Experiment wurde eine 200-sekündige Equilibrierungsphase vorgeschaltet, sodass sich die Probentemperatur der Solltemperatur angleichen konnte.

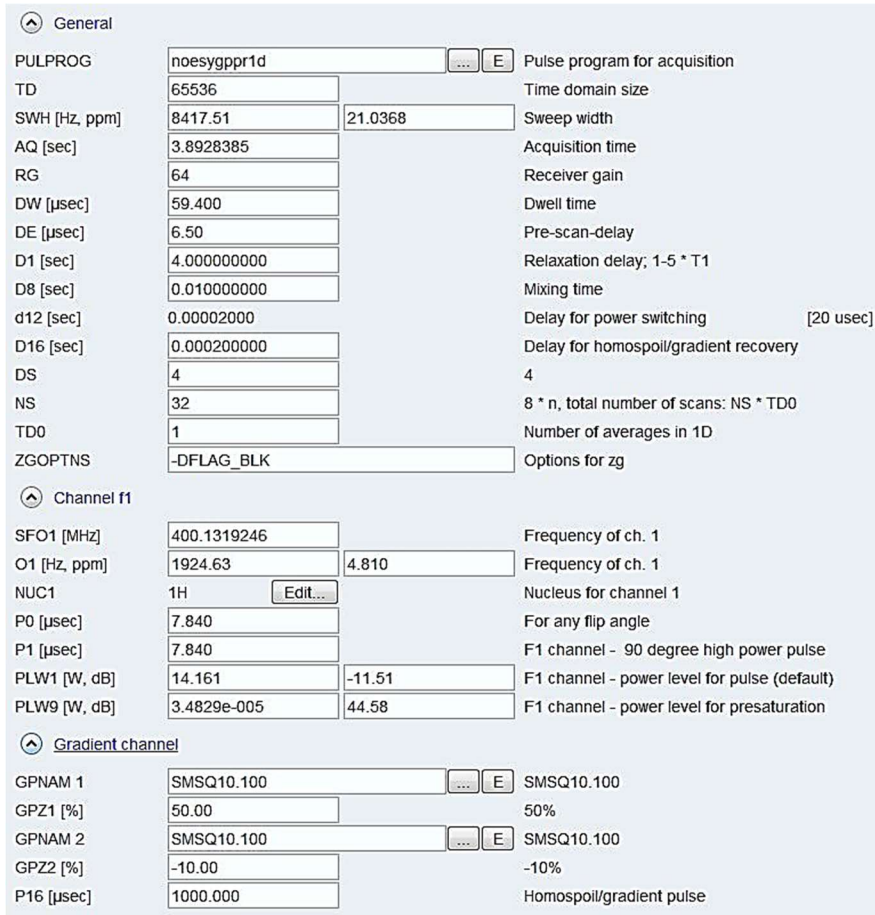
Die Metabolomanalyse wurde an demselben 400 MHz Bruker® NMR-Spektrometer wie bei der Methodenentwicklung, aber mit einer Avance III 400 MHz Bruker® Konsole durchgeführt. Hierdurch war die automatisierte Basislinienoptimierung „baseopt“ möglich. Es wurde ebenfalls der SEI 400 MHz SB 5 mm Probenkopf mit Z-Gradienten verwendet. Für die Lock-Stabilität diente das OD-Signal (4.81 ppm) des Wassers; TMSP wurde als Referenzsubstanz (0.00 ppm) verwendet. Beim Verschieben des Lock-Signals oder beobachteten Shimproblemen (¹³C-Sateliten, ²⁹Si-Satelliten) wurden die entsprechenden Maßnahmen ergriffen und die Messung wiederholt.

In regelmäßigen Abständen wurden alle zeitbedingt veränderlichen Parameter überprüft und neu kalibriert. Hierzu zählt der 3D-Shim, welcher eine erneute Kalibrierung der Shimspulen bewirkt und in ca. einmonatigen Abständen mit der Bruker®-Standard-Probe „Water Suppression“ (90 % H₂O, 10 % D₂O, 2 mM Succrose und DSS) durchgeführt wurde. Die

7 Experimenteller Teil

tägliche Shim-Überprüfung wurde mit der Bruker®-Standard-Probe „Lineshape“ überprüft (1 % CHCl₃, 0.2 % TMS in Aceton-*d*₆). Weiterhin wurde in zweiwöchigen Abständen eine Temperaturkalibrierung mit einer Bruker®-Standard-Probe „Temperatur Calibration“ (4 % Methanol in Methanol-*d*₄) vorgenommen. Die Ergebnisse der Temperaturkalibrierungen sind auf dem beiliegenden Datenträger nachzusehen.

Tabelle 32: Protokoll zur NMR-spektroskopischen Vermessung von extrahierten Spargelproben mittels 1D-¹H-NOESY

intSOP	#005-Version 6.5
Autor	Juliane Klare / Eric Rottmann / Torben Grube / Dr. Thomas Hackl
Stand	20160113
Titel	Protokoll zur NMR-spektroskopischen Untersuchung des Metaboloms von Spargel mittels 1D- ¹ H-NOESY-Experiments
Geräte und Materialien	400 MHz Bruker® NMR-Spektrometer Avance III 400 MHz, Ultra Shield, Bruker® Konsole
Chemikalien	Keine
Durchführung	<p>Vermessung der Extrakte bei 300 K in der Automation mit folgenden Einstellungen:</p> 

Identifizierung chemischer Marker

Zur Identifizierung chemischer Marker wurden acht Proben (2 x DE: 16-DE-BYSr-Gam-Gi, 16-DE-BYFr-Wol-Gr; 2 x GR: 16-GR-HH-Lale, 16-GR-HH-Coop-Met; 2 x ES: 16-ES-HH-Gar-Sel, 15-ES-Das-Univeg-Rew; 2 x PE: 16-PE-HH-TAL-Fru, 16-PE-HH-Cam-Ede II) ausgewählt, nach Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) aufgearbeitet und vermessen. Dabei wurden jeweils ein TOCSY- sowie ein J-RES -Spektrum (dipsi2esgpph,

7 Experimenteller Teil

jresgpprpf) aufgenommen. Die Proben wurden ausschließlich aus den Jahren 2015 oder 2016 ausgewählt.

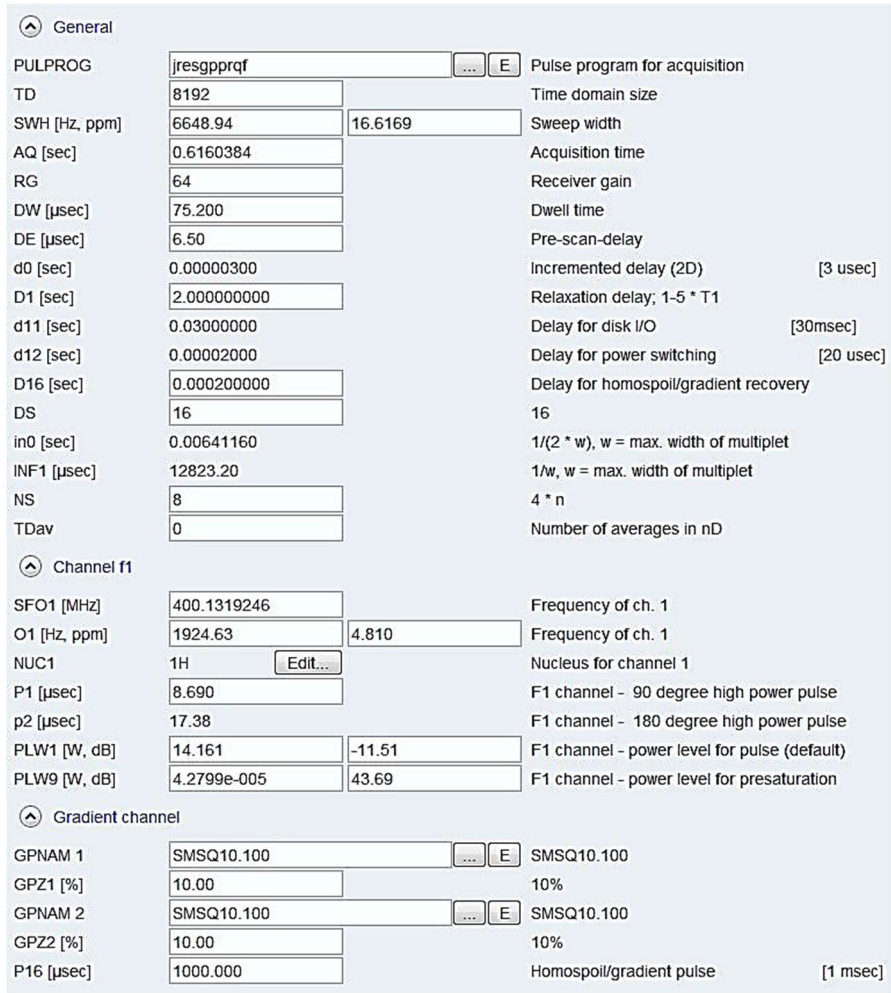
Für die Metabolitidentifizierung wurde ein 600 MHz Bruker® NMR-Spektrometer mit einer Avance III HD 600 MHz Bruker® Konsole herangezogen. Es wurde ein BBFO 600 MHz S3 5 mm Probenkopf mit Z-Gradienten eingesetzt. Die jeweiligen Messparameter sind in Tabelle 33 und Tabelle 34 aufgeführt.

Tabelle 33: Protokoll zur NMR-spektroskopischen Vermessung von extrahierten Spargelproben mittels TOCSY

intSOP	#005-Version 6.6
Autor	Juliane Klare / Eric Rottmann / Torben Grube / Dr. Thomas Hackl
Stand	20160313
Titel	Protokoll zur NMR-spektroskopischen Untersuchung des Metaboloms von Spargel mittels TOCSY-Experiments
Geräte und Materialien	600 MHz Bruker® NMR-Spektrometer Avance III HD 600 MHz, Ultra Shield, Bruker® Konsole
Chemikalien	Keine

Durchführung	Vermessung der Extrakte bei 300 K in der Automation mit folgenden Einstellungen:		
<p>⤴ General</p>			
PULPROG	dipsi2esgpph	Pulse program for acquisition	
TD	2048	Time domain size	
SWH [Hz, ppm]	7211.54	12.0166	Sweep width
AQ [sec]	0.1419947		Acquisition time
RG	114		Receiver gain
DW [µsec]	69.333		Dwell time
DE [µsec]	6.50		Pre-scan-delay
d0 [sec]	0.00005580		Incremented delay (2D)
D1 [sec]	1.50000000		Relaxation delay; 1-5 * T1
D9 [sec]	0.06000000		TOCSY mixing time
d11 [sec]	0.03000000		Delay for disk I/O [30 msec]
d12 [sec]	0.00002000		Delay for power switching [20 usec]
d13 [sec]	0.00000400		Short delay [4 usec]
D16 [sec]	0.00020000		Delay for homospoil/gradient recovery
DS	16		16
FACTOR1	10		FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2
in0 [sec]	0.00013860		1/(1 * SW) = 2 * DW
INF1 [µsec]	138.60		1/SW = 2 * DW
I1	20		loop for DIPSI cycle: ((p6*115.112) * I1) = mixing time
NS	64		8 * n
TAU [sec]	0.00001725		TAU=de+p1*2/3.1416+4u
⤴ Channel f1			
SFO1 [MHz]	600.1328152		Frequency of ch. 1
O1 [Hz, ppm]	2815.21	4.691	Frequency of ch. 1
NUC1	1H	Edit...	Nucleus for channel 1
P1 [µsec]	10.60		F1 channel - 90 degree high power pulse
p2 [µsec]	21.20		F1 channel - 180 degree high power pulse
P6 [µsec]	26.00		F1 channel - 90 degree low power pulse
P12 [µsec]	2000.00		F1 channel - 180 degree shaped pulse (Squa100.1000) [2 msec]
PLW0 [W, -dBW]	0	1000.00	0W
PLW1 [W, -dBW]	21	-13.22	F1 channel - power level for pulse (default)
PLW10 [W, -dBW]	3.4905	-5.43	F1 channel - power level for TOCSY-spinlock
PLW32 [W, -dBW]	3.7753e-006	54.23	F1 channel - power level for low power presaturation
SPNAM 1	Squa100.1000		File name for SP1
SPOAL1	0.500		Phase alignment of freq. offset in SP1
SPOFFS1 [Hz]	0		Offset frequency for SP1
SPW1 [W, -dBW]	0.0023596	26.27	F1 channel - shaped pulse 180 degree
⤴ Gradient channel			
GPNAM 1	SMSQ10.100		SMSQ10.100
GPNAM 2	SMSQ10.100		SMSQ10.100
GPNAM 3	SMSQ10.100		SMSQ10.100
GPNAM 4	SMSQ10.100		SMSQ10.100
GPZ1 [%]	1.00		1%
GPZ2 [%]	3.00		3%
GPZ3 [%]	31.00		31%
GPZ4 [%]	11.00		11%
P16 [µsec]	1000.00		Homospoil/gradient pulse

Tabelle 34: Protokoll zur NMR-spektroskopischen Vermessung von extrahierten Spargelproben mittels J-RES-Experiments

intSOP	#005-Version 6.7
Autor	Juliane Klare / Torben Grube / Eric Rottmann / Dr. Thomas Hackl
Stand	20160313
Titel	Protokoll zur NMR-spektroskopischen Untersuchung des Metaboloms von Spargel mittels J-RES-Experiments
Geräte und Materialien	600 MHz Bruker® NMR-Spektrometer Avance III HD 600 MHz, Ultra Shield, Bruker® Konsole
Chemikalien	Keine
Durchführung	<p>Vermessung der Extrakte bei 300 K in der Automation mit folgenden Einstellungen:</p> 

Alle gemessenen Spektren sind auf dem beiliegenden Datenträger einsehbar.

7.2.6 NMR-Analyse und Metabolitidentifikation

Die Fourier-Transformation, Phasenkorrektur und Basislinienkorrektur der 1D-¹H-NOESY-Spektren erfolgte automatisch mit Hilfe des Programms TopSpin 3.2.

Die ersten Schritte zur Identifizierung chemischer Marker wurden mit Hilfe der 400 MHz Bibliothek *Chenomx NMR Suite*, Version 5.2 (Chenomx Inc., Edmonton, Alberta, Canada) vorgenommen (Chenomx NMR Suite, 2020). Datenbanken wie z. B. die Human Metabolome Data Base (HMDB) oder die Food Data Base (FooDB) wurden zum weiteren Abgleich herangezogen (HMDB, 2020; FooDB, 2020). Die eindeutige Identifizierung von Metaboliten erfolgte durch Dotierung der NMR-Proben mit Standardsubstanzen. Am Beispiel von L-Tyrosin wurde das gefriergetrocknete Probenmaterial mit der Standardsubstanz (gelöst in Methanol-*d*₄; Einwaagen, Volumina, Konzentrationen siehe Tabelle 35) versetzt, nach der Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) aufgearbeitet sowie mit der Pulssequenz noesyggpr1d (Tabelle 32) vermessen.

Tabelle 35: Einwaagen und Konzentrationen des L-Tyrosin-Standards und der peruanischen Spargeprobe 16-PE-HH-Fru-Tal

Substanz / Probe	m [mg]	Bezogen auf V [mL]	Stammlösung (V _Y) / Probenvolumen (V _P)** [μL]	C _Y / C _P ** [mM]
L-Tyrosin (Y)	19.35	5		21.36
Probe 1	75.15	1.425	20(V _Y)/1425(V _P)	0.3
Probe 2	75.34	1.425	12(V _Y)/1425(V _P)	0.18
Probe 3	75.11	1.425	100(V _Y)/1,000//12(V _Y)/1,425(V _P)	0.018

Tabelle 36: Erläuterung der Größen aus Tabelle 35

Variable	Einheit	Beschreibung
m	mg	Einwaage
V	mL	Volumen
V _Y	μL	Volumen der Stammlösung
V _P	μL	Volumen der Probe
C _Y	mM	L-Tyrosin-Konzentration in der Stammlösung
C _P	mM	L-Tyrosin-Konzentration in der Probe

** Aufgefüllt wurde mit der jeweiligen Restmenge deuterierten Methanols (692.5 μL, 700.5 μL, 700.5 μL) sowie entsprechend Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) mit 712.5 μL deuteriertem Puffer.

7.2.7 Multivariate Datenanalyse

Zur Generierung einer reduzierten Datenmatrix zur multivariaten Datenanalyse wurde das Programm AMIX 3.9.14 Bruker® Biospin GmbH verwendet.

Für die Metabolomanalyse wurden ausschließlich *simple rectangular sized buckets* von 0.03 ppm Größe in dem Bereich von 0.125 ppm bis 9.5 ppm generiert. Spektrenabschnitte, welche Signale des Wassers (4.775 ppm – 4.925 ppm) oder Methanols (3.308 ppm – 3.339 ppm) enthalten, wurden exkludiert. Insgesamt wurden 312 *buckets* für die statistische Auswertung verwendet. Alle Spektren wurden normalisiert und auf eine einheitliche Varianz skaliert („*scaling to unit variance*“). Weiterhin wurden die Spektren für die *bucket table* Erstellung auf die Gesamtintensität („*scale to total intensity*“) skaliert und somit alle *buckets* eines Spektrums auf das jeweilige Gesamtintegral bezogen.

Die statistische Auswertung erfolgte in Kooperation mit der Forschungsstelle 3 (Marc Rurik, Prof. Dr.-Ing. Oliver Kohlbacher, Institut für Bioinformatik, Universität Tübingen):

837 Spektren (jede Probe wurde dreifach aufgearbeitet und vermessen) wurden je Probe gemittelt und für die *Principal Component Analysis* (PCA) verwendet. Als Klassifizierungsmodelle wurden zwei Systeme, die *Partial Least Square Discriminant Analysis* (PLS-DA) und *random forest* verglichen. Alle Berechnungen basieren auf einem Konfidenzintervall von 95 %. Der *random forest* Algorithmus wurde in einer 10-fach-Kreuzvalidierung auf die Datensätze angewandt, sodass die Aussagekraft des Vorhersagemodells abgeschätzt werden kann. Für den *random-forest*-Klassifikator wurde der Gini-Index als Split-Kriterium verwendet (Breiman *et al.*, 2018). Die Anzahl der *buckets*, welche für die Knoten herangezogen wurden, wurde mit Hilfe von „*Grid Search*“ optimiert. Die Anzahl der Entscheidungsbäume betrug 1,000, sodass das Klassifikationssystem ausreichend stabil ist. Zum Ausgleich der Probengruppenungleichgewichte wurde ein *SMOTE-Oversampling* angewandt.

7.2.8 Metabolomstabilität

Die Metabolomstabilität wurde in zwei Messreihen untersucht. Für jede Messreihe wurde jeweils eine Probe aufgearbeitet. Die Aufarbeitung der Probe für die Messreihe 1 erfolgte mit der Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3, Tabelle 30), jedoch mit dem 200 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ -Puffer; die Aufarbeitung der Probe für die Messreihe 2 erfolgte mit der Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31) mit dem wasserfreien $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer.

7 Experimenteller Teil

In Tabelle 37 sind die jeweiligen Zeitabstände zwischen den Messungen dargestellt. Über den Zeitraum beider Messreihen hinweg verblieb die jeweilige Probe bei Raumtemperatur (21 °C, klimatisierter Raum) im Autosampler des Spektrometers.

Tabelle 37: Messreihen 1 und 2 zur Bestimmung der Metabolomstabilität der jeweiligen Extrakte von weißem Spargel nach verschiedenen Aufarbeitungsmethoden (1 und 2)

Messreihe 1 [Datum]	Zeitpunkt nach der Probenherstellung	Messreihe 2 [Datum]	Zeitpunkt nach der Probenherstellung
25.08.2015	0 Tage	11.04.2017	0 Tage
26.08.2015	1 Tag	11.04.2017	9 Stunden
27.08.2015	2 Tage	12.04.2017	1 Tag
31.08.2015	6 Tage	13.04.2017	2 Tage
02.09.2015	8 Tage	14.04.2017	3 Tage
		15.04.2017	4 Tage
		16.04.2017	5 Tage
		17.04.2017	6 Tage
		18.04.2017	7 Tage
		19.04.2017	8 Tage

7.2.9 Proteingehaltsbestimmung der Spargelextrakte nach BRADFORD

Es wurden je drei unterschiedliche Extraktvolumina einer *Backlim*- und einer *Gijnlim*-Spargelprobe hinsichtlich ihrer Proteingehalte untersucht. Statt eines für Spargel typischen Proteins, welches für diesen Versuch nicht zur Verfügung stand, wurde für die Kalibrierreihe das Rinder-Serum-Albumin (BSA) verwendet.

Die Durchführung erfolgte gemäß Punkt 2.3 des Skripts zum Lebensmittelchemischen Praktikum „Nachweis von Ei- und Milchproteinen in Lebensmitteln mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (Disk-SDS-PAGE)“, welches auf „Lebensmittelanalytik“ von Matissek *et al.*, 2018 zurückgreift. In der Literatur wird sich auf Bradford, 1976 bezogen. Das Skript ist in Auszügen und teils gekürzter Form im Folgenden wiedergegeben (Universität Hamburg, 2014).

Punkt 2.3 des Skripts zum Lebensmittelchemischen Praktikum

„Nachweis von Ei- und Milchproteinen in Lebensmitteln mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (Disk-SDS-PAGE)

Grundlagen

a) *Proteinbestimmung nach Bradford*

Die Quantifizierung des Proteingehalts der Extrakte erfolgt nach einer photometrischen Methode. Als Farbreagenz wird Coomassie Brilliant Blue G 250 verwendet. Das Prinzip beruht auf der Anlagerung der negativ geladenen Farbstoffmoleküle an die Aminogruppe der Proteine, welche sodann bei 590 nm photometrisch vermessen werden. Die quantitative Bestimmung erfolgt über eine Rinderserumalbumin-(BSA)-Kalibriergerade.

b) *DISK-SDS-PAGE*

Die Elektrophorese beruht auf der Wanderung elektrisch geladener Teilchen in einem elektrischen Gleichstromfeld. Die Geschwindigkeit der Wanderung durch ein Polyacrylamidgel ist nach entsprechender Probenvorbereitung (Auffaltung der Proteine mittels 2-Mercaptoethanol) dem Molekulargewicht proportional. Die Proteinbanden können im Gel unspezifisch durch eine kolloidale Coomassie-Färbung durch die Anlagerung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 oder mittels Silberfärbung sichtbar gemacht werden.

Reagenzien

Proteinbestimmung nach Bradford

Lösung 1	10 mL Ethanol (96 %) 20 mL Phosphorsäure (88 %) 35 mg Coomassie Serva Blue G
Lösung 2	3 mL Lösung 1 3 mL Phosphorsäure (88 %) 1.5 mL Ethanol (96 %) 42.5 mL bidest. Wasser Die Lösung wird bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss aufbewahrt
Standardlösungen	400 µg BSA / mL 300 µg BSA / mL 200 µg BSA / mL 100 µg BSA / mL 50 µg BSA / mL

7 Experimenteller Teil

Probenvorbereitung

Probenpuffer (pH 6.8)	3.03 g Tris 2.5 mL β -Mercaptoethanol 5.0 mL Glycerin 2.0 g SDS 0.01 g Bromphenolblau 150 μ L Pyronin Y-Lösung (einprozentig in Wasser, w:v) 40 mL bidest. Wasser Lösung mit 4 M HCl auf pH 6.8, ad 50 mL mit bidest. Wasser
------------------------------	---

Molekulargewichtsmarker

Protein	Molekulargewicht [kDa]
α -Lactalbumin	14.4
Trypsininhibitor	20.1
Carboanhydrase	30.0
Ovalbumin	43.0
Rinderserumalbumin	67.0
Phosphorylase	94.0

Silberfärbung nach HEUKESHOVEN und DERNICK (1986)

Schritt	Lösung	V [mL]	Zeit [min]
Fixieren	15 mL Ethanol 5 mL Eisessig mit dest. Wasser ad 50 mL	50	30
Inkubieren	75 mL Ethanol 17.00 g Natriumacetat ad 250 mL mit dest. Wasser unmittelbar vor Anwendung zugeben: 0.50 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1.25 mL Glutardialdehyd	50	30 oder über Nacht
Waschen	bidest. Wasser	5 • 50	5 • 5
Versilbern	0.5 g AgNO_3 50 μ L Formaldehyd (37 Gew-%)	50	20

7 Experimenteller Teil

Entwickeln	25 g Na ₂ CO ₃ mit bidest. Wasser ad 1,000 mL pH 11.8 (einstellen mit NaHCO ₃) unmittelbar vor Anwendung: 300 mL Entwicklungslösung und 30 µL Formaldehyd (37 Gew.-%) zusammengeben	2 • 50	1, abgießen, 3-10 (je nach Intensivität der Färbung)
Stoppen	18.6 g Titriplex (EDTA) mit bidest. Wasser ad 1,000 mL	50	10

Durchführung

1. Probenvorbereitung

Die Probe wird homogenisiert, in ein Pyrexglas eingewogen und mit PBS-Lösung extrahiert. Anhand von Proteingehalt-Literaturwerten für die jeweiligen Proben und Referenzsubstanzen sind entsprechend die Extrakte herzustellen. Die Gesamtproteinkonzentration des Extraktes soll ca. 10 mg/mL betragen. Die Aufarbeitung der Referenzproben erfolgt entsprechend. Mittels Proteinbestimmung nach BRADFORD werden bei den Proben und den Referenzsubstanzen die Proteingehalte bestimmt und auf 250 µg/mL eingestellt.

2. Reduktion der Proteine

Die mit Probenpuffer versetzten Proben und Referenzsubstanzen werden für 3 Minuten in einem Wasserbad auf 90 °C erhitzt, um die Proteine zu reduzieren und mit dem Aniontensid SDS zu belegen.

3. Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE

Ein Fertiggel wird in die Trennkammer eingesetzt und Trennpuffer dazugegeben. 20 µL Proben-, Referenz- und Markerlösung werden aufgegeben und die Elektrophoresekammer verschlossen. Der Lauf wird beendet, wenn der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff die Anode erreicht hat.

4. Silberfärbung

Die Durchführung der Färbung erfolgt nach obiger Beschreibung.

5. Auswertung

Beispielhafte Auswertung anhand von Milch- und Eiprodukten:

7 Experimenteller Teil

In Abb. 3 ist bei 67 kDa das Rinderserumalbumin (BSA) zu erkennen. Bei der untersuchten Probe kann durch Betrachten des Proteinmusters auf das eingesetzte Protein geschlossen werden, welches sodann photometrisch vermessen wird.

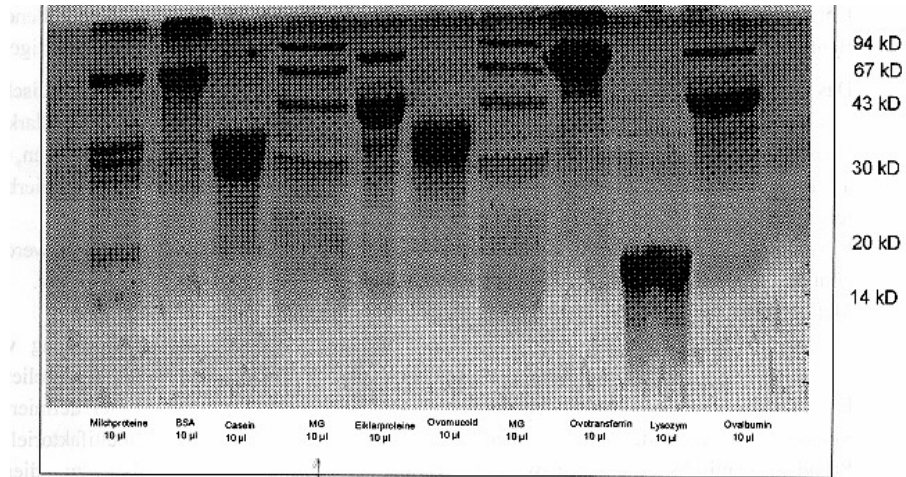


Abb. 3: Ei- und Milchstandardproteine nach Trennung mittels Disk-SDS-PAGE

8 Literaturliste

- Adetiba, E., Olugbara, O.O., 2015. Lung Cancer Prediction Using Neural Network Ensemble with Histogram of Oriented Gradient Genomic Features Lung Cancer Prediction Using Neural Network Ensemble with Histogram of Oriented Gradient Genomic Features. *The Scientific World Journal*, 2015(ID 786013), pp.1–17.
- Ali, K., Maltese, F., Toepfer, R., Choi, Y. H., Verpoorte, R., 2011. Metabolic characterization of Palatinate German white wines according to sensory attributes, varieties, and vintages using NMR spectroscopy and multivariate data analyses. *Journal of Biomolecular NMR*, 49(3–4), pp.255–266.
- Allwood, J. W., De Vos, R. C. H., Moing, A., Deborde, C., Erban, A., Kopka, J., Goodacre, R., Hall, R. D., 2011. *Plant Metabolomics and Its Potential for Systems Biology Research : Background Concepts , Technology , and Methodology* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385118-5.00016-5>.
- Almeida, C., Duarte, I. F., Barros, A., Rodrigues, J., Spraul, M., Gil, A. M., 2006. Composition of beer by ^1H NMR spectroscopy: Effects of brewing site and date of production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), pp.700–706.
- Alonso-Salces, R. M., Héberger, K., Holland, M. V., Moreno-Rojas, J. M., Mariani, C., Bellan, G., Reniero, F., Guillou, C., 2010. Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chemistry*, 118(4), pp.956–965. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.061>.
- Alonso-Salces, R. M., Moreno-Rojas, J. M., Holland, M. V., Reniero, F., Guillou, C., Héberger, K., 2010. Virgin olive oil authentication by multivariate analyses of ^1H NMR fingerprints and $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{2}\text{H}$ data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), pp.5586–5596.
- Anastasiadi, M., Zira, A., Magiatis, P., Haroutounian, S. A., Leandros Skaltsounis, A., Mikros, E., 2009. ^1H NMR-based metabonomics for the classification of Greek wines according to variety, region, and vintage. comparison with HPLC data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(23), pp.11067–11074.
- Arana, V. A., Medina, J., Alarcon, R., Moreno, E., Heintz, L., Schäfer, H., Wist, J., 2015. Coffee's country of origin determined by NMR: The Colombian case. *Food Chemistry*, 175, pp.500–506. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.160>.
- Baker, D., Sali, A., 2001. Protein Structure Prediction and Structural Genomics. *Science*, 294(October), pp.93–97.
- Baker, J. M., Ward, J. L., Beale, M. H., 2012. Combined NMR and Flow Injection ESI-MS for Brassicaceae Metabolomics. *Plant Metabolomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 860, pp.177–191. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978->

1-61779-594-7.

- Barding, G. A. Jr., Béni S., Fukao, T., Bailey-Serres, J., Larive, C. K., 2013. Comparison of GC-MS and NMR for metabolite profiling of rice subjected to submergence stress. *Journal of Proteome Research*, 12(2), pp.898–909.
- Beckonert, O., Keun, H. C., Ebbels, T. M. D., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., 2007. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature protocols*, 2(11), pp.2692–2703. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18007604>.
- Behnken, H. N., Fellenberg, M., Koetzler, M. P., Jirmann, R., Nagel, T., Meyer B., 2012. Resolving the problem of chromatographic overlap by 3D cross correlation (3DCC) processing of LC, MS and NMR data for characterization of complex glycan mixtures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(5), pp.1427–1437.
- Benzie, I. F. F., Wachtel-Galor, S., 2011. Chapter 1 Herbal Medicine. *NCBI Bookshelf*, pp.1–11.
- Beretta, G., Caneva, E., Regazzoni, L., Bakhtyari, N. G., Facino, R. M., 2008. A solid-phase extraction procedure coupled to ¹H NMR, with chemometric analysis, to seek reliable markers of the botanical origin of honey. *Analytica Chimica Acta*, 620(1–2), pp.176–182.
- Bertelli, D., Lolli, M., Papotti, G., Bortolotti, L., Serra, G., Plessi, M., 2010. Detection of honey adulteration by sugar syrups using one-dimensional and two-dimensional high-resolution nuclear magnetic resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), pp.8495–8501.
- Bharti, S. K., Roy, R., 2014. Metabolite Identification in NMR-based Metabolomics. *Current Metabolomics*, 2, pp.163–173.
- Bingol, K., Bruschweiler-Li, L., Yu, C., Somogyi, A., Zhang, F., Bruschweiler, R., 2015. Metabolomics beyond Spectroscopic Databases: A Combined MS/NMR Strategy for the Rapid Identification of New Metabolites in Complex Mixtures. *Analytical Chemistry*, 87(7), pp.3864–3870.
- Bingol, K., Li, D.-W., Bruschweiler-Li, L., Cabrera, O. A., Megraw, T., Zhang, F., Bruschweiler, R., 2015. Unified and isomer-specific NMR metabolomics database for the accurate analysis of ¹³C-¹H HSQC spectra. *ACS Chemical Biology*, 10(2), pp.452–459.
- Bingol, K., Bruschweiler, R., 2015a. NMR/MS translator for the enhanced simultaneous analysis of metabolomics mixtures by NMR spectroscopy and mass spectrometry: Application to human urine. *Journal of Proteome Research*, 14(6), pp.2642–2648.
- Bingol, K., Bruschweiler, R., 2015b. Two elephants in the room: New hybrid nuclear magnetic resonance and mass spectrometry approaches for metabolomics. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 18(5), pp.471–477.

8 Literaturliste

- Boffo, E. F., Tavares, L. A., Tobias, A. C. T., Ferreira, M. M. C., Ferreira, A. G., 2012. Identification of components of Brazilian honey by ¹H NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods. *LWT - Food Science and Technology*, 49(1), pp.55–63.
- Bradford, M. M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. , 254, pp.248–254.
- Brecht, J. K., Sargent, S. A., Brecht, P. E., Saenz, J., Rodowick, L., 2019. Protecting Perishable Foods During Transport by Truck and Rail. *IFAS Extension*.
- Breiman, L., 1984. Chapter 11 Classification Algorithms and Regression Trees. , pp.246–280.
- Breiman, L., Cutler, A., Liaw, A., Wiener, M., 2018. Package “randomForest.” *Package `randomForest`*, 4.6(14), p.29.
- Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, Qualitätskontrolle, Q., 2005. Qualitätskontrolle Obst & Gemüse. *European journal of immunology*, 44(6), p.85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24903051>.
- Capitani, D., Mannina, L., Proietti, N., Sobolev, A., Tomassini, A., Miccheli, A., Di Cocco, M. E., Capuani, G., De Salvador, F., R., 2013. Metabolic profiling and outer pericarp water state in zespri, Cl.GI, and hayward kiwifruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), pp.1727–1740.
- Capitani, D., Mannina, L., Proietti, N., Sobolev, A. P., Tomassini, A., Miccheli, A., Di Cocco, M. E., Capuani, G., De Salvador, R., Delfini, M., 2010. Monitoring of metabolic profiling and water status of Hayward kiwifruits by nuclear magnetic resonance. *Talanta*, 82(5), pp.1826–1838. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2010.07.080>.
- Chang, J.-M., Zeng, H., Han, R., Chang, Y.-M., Shah, R., Salafia, C. M., Newschaffer, C., Miller, R. K., Katzman, P., Moye, J., Fallin, M., Walker, C. K., Coen, L., 2017. Autism risk classification using placental chorionic surface vascular network features. *BMC Medical Informatics and Decision Making*, 17(162), pp.1–13.
- Cheng, T., Sudderth, J., Yang, C., Mullen, A., R., Jin, E. S., Matés, J. M., DeBerardinis, R. J., 2011. Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(21), pp.8674–8679. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1016627108>.
- Cifuentes, A., 2009. Food analysis and foodomics. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), p.7109.
- Clayton, T. A., Lindon, J. C., Cloared, O., Antti, H., Charuel, C., Hanton, G., Provost, J.-P., Le Net, J.-L., Baker, D., Walley, R. J., Everett, J. R., Nicholson, J. K., 2006. Pharmacometabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature*, 440(7087), pp.1073–1077.

- Consonni, R., Cagliani, L. R., Stocchero, M., Porretta, S., 2010. Evaluation of the production year in Italian and Chinese tomato paste for geographical determination using O2PLS models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, pp.7520–7525.
- Consonni, R., Ordoudi, S. A., Cagliani, L. R., Tsiangali, M., Tsimidou, M. Z., 2016. On the traceability of commercial saffron samples using ¹H-NMR and FT-IR metabolomics. *Molecules*, 21(3), pp.1–13.
- Consonni, R., Cagliani, L. R., Stocchero, M., Porretta, S., 2009. Triple concentrated tomato paste: Discrimination between Italian and Chinese products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, pp.4506–4513.
- Consonni, R., Cagliani, L. R., 2008. Geographical Characterization of Polyfloral and Acacia Honeys by Nuclear Magnetic Resonance and Chemometrics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, pp.6873–6880.
- Consonni, R., Cagliani, L. R., 2010. *Nuclear Magnetic Resonance and Chemometrics to Assess Geographical Origin and Quality of Traditional Food Products* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1076-5670\(10\)63004-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1076-5670(10)63004-2).
- Covington, A. K., Paabo, M., Robinson, R. A., Bates, R. G., 1968. Use of the Glass Electrode in Deuterium Oxide and the Relation between the Standardized pD (pa.) Scale and the Operational pH in Heavy Water. *Analytical Chemistry*, 40, pp.700–706.
- Creydt, M., Hudzik, R., Rurik, M., Kohlbacher, O., Fischer, M., 2018. Food Authentication : Small-Molecule Profiling as a Tool for the Geographic Discrimination of German White Asparagus.
- CVUA-MEL, 2009. CVUA-MEL 2009.
- D’Imperio, M., Gobbino, M., Picanza, A., Costanzo, S., Della Corte, A., Mannina, L., 2010. Influence of harvest method and period on olive oil composition: An NMR and statistical study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(20), pp.11043–11051.
- Dai, H., Xiao, C., Liu, H., Hao, F., Tang, H., 2010. Combined NMR and LC-DAD-MS analysis reveals comprehensive metabolomic variations for three phenotypic cultivars of *salvia miltiorrhiza bunge*. *Journal of Proteome Research*, 9(3), pp.1565–1578.
- Dambrot, S. M., 2014. Promising proteins: Scientists develop new drug discovery tool using spectroscopy and simulation. , pp.1–8.
- Deutsches Patent- und Markenamt, 2012. Merkblatt über den Schutz von geografischen Angaben und Ursprungsbezeichnungen für Agrarerzeugnisse und Lebensmittel. , (1151/2012).
- Dias, D. A., Jones, O. A. H., Beale, D. J., Boughton, B. A., Benheim, D., Kouremenos, K. A., Wolfender, J.-L., Wishart, D. S., 2016. Current and Future Perspectives on the Structural Identification of Small Molecules in Biological Systems. *metabolites*, 6(46), pp.1–29.

- Dietzsch, F., 2012. Seminararbeit im Modul „TM4 Nichtlineare Statistik“: Kreuzvalidierung.
- Diniz, P. P. V. P., Morton, B. A., Tngrian, M., Kachani, M., Barrón, E. A., Gavidia, C. M., Gilman, R. H., Angulo, N. P., Brenner, E. C., Lerner, R., Chomel, B. B., 2013. Infection of Domestic Dogs in Peru by Zoonotic Bartonella Species: A Cross-Sectional Prevalence Study of 219 Asymptomatic Dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(9).
- Dona, A. C., Jiménez, B., Schäfer, H., Humpfer, E., Spraul, M., Lewis, M. R., Pearce, J. T. M., Holmes, E., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., 2014. Precision High-Throughput Proton NMR Spectroscopy of Human Urine, Serum, and Plasma for Large-Scale Metabolic Phenotyping. *Analytical Chemistry*, 86(19), pp.9887–9894. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac5025039> [Accessed July 8, 2016].
- Dona, A. C., Kyriakides, M., Scott, F., Shephard, E. A., Varshavi, D., Veselkov, K., Everett, J. R., 2016. A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 14, pp.135–153.
- Donarski, J. A., Jones, S. A., Charlton, A. J., 2008. Application of Cryoprobe 1 H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis for the Verification of Corsican Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp.5451–5456.
- Du, Y.-Y., Bai, G.-Y., Zhang, X., Liu, M.-L., 2007. Classification of Wines Based on Combination of 1 H NMR Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Chinese Journal of Chemistry*, 25, pp.930–936.
- Duddek, H., 2007. ¹H, ¹H, ¹H, Relayed-COSY und TOCSY. *Multipuls-NMR in der Organischen Chemie - TOCSY*, pp.1–11.
- Emwas, A.-H., Roy, R., McKay, R. T., Ryan, D., Brennan, L., Tenori, L., Luchinat, C., Gao, X., Zeri, A. C. Gowda, G. A. N., Raftery, D., Steinbeck, C., Salek, R. M., Wishart, D. S., 2016. Recommendations and Standardization of Biomarker Quantification Using NMR-Based Metabolomics with Particular Focus on Urinary Analysis. *Journal of Proteome Research*, 15(2), pp.360–373.
- Engelhardt, A., 2010. Feature selection: All-relevant selection with the Boruta package. *CYBAEA*, pp.1–7.
- Esslinger, S., Riedl, J., Fauhl-Hasek, C., 2014. Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control. *Food Research International*, 60(June 2014), pp.189–204.
- Fan, T. W. M., Lane, A. N., 2016. Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 92–93, pp.18–53.
- Fatma, Y. B. A.-B., Pianelli, K., Dieuaide-Noubhani, M., Le Menn, A., Deborde, C., Maucourt, M., Andrieu, M.-H., Rolin, D., Rothan, C., Moing, A., Bouzid, S., Cabasson, C., 2012.

- ¹H-NMR metabolomics: Profiling method for a rapid and efficient screening of transgenic plants. *African Journal of Biotechnology*, 11(52), pp.11386–11399. Available at: <http://www.academicjournals.org/AJB>.
- Fauhl, C., Reniero, F., Guillou, C., 2000. ¹H-NMR as a tool for the analysis of mixtures of virgin olive oil with oils of different botanical origin. *Magn.Reson.Chem.*, 38(6), pp.436–443.
- Felbinger, C., Schelm, S., Fischer, M., 2015. Food Fraud – Hindernisse und Lösungsweg bei der Authentizitätsbestimmung von Lebensmitteln. , 10, pp.25–30.
- Fellenberg, M., Behnken, H. N., Nagel, T., Wiegandt, A., Baerenfaenger, M., Meyer, B., 2013. Glycan analysis: Scope and limitations of different techniques - A case for integrated use of LC-MS(/MS) and NMR techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(23), pp.7291–7305.
- Fernie, A. R., Morgan, J. A., 2013. Analysis of metabolic flux using dynamic labelling and metabolic modelling. *Plant, Cell and Environment*, 36(9), pp.1738–1750.
- Ferri, E., Galimberti, A., Casiraghi, M., Airoldi, C., Ciaramelli, C., Palmioli, A., Mezzasalma, V., Bruni, I., Labra, M., 2015. Towards a Universal Molecular Approach for the Quality Control of New Foodstuffs. *BioMed Research International*, 2015, pp.37–60. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118864463.ch04>.
- Fiehn, O., 2001. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genom*, 2(082/10), pp.155–168.
- Filichkin, S., Priest, H. D., Megrwa, M., Mockler, T. C., 2015. Alternative splicing in plants : directing traffic at the crossroads of adaptation and environmental stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 24, pp.125–135. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2015.02.008>.
- Fink, J. R., Inda, A. V., Bavaresco, J., Barrón, V., Torrent, J., Bayer, C., 2016. Adsorption and desorption of phosphorus in subtropical soils as affected by management system and mineralogy. *Soil & Tillage Research*, 155, pp.62–68. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2015.07.017>.
- Fischer, M., 2015. Food Profiling – Identität und Herkunft von Lebensmitteln. *HSFS*, pp.1–27.
- Freie Universität Berlin, 2006. Extraktionen. *Organisch-chemische Praktika*, p.2006.
- Le Gall, G., Colquhoun, I. J., Davis, A. L., Collins, G. J., Verhoeyen, M. E., 2003. Metabolite Profiling of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Using ¹H NMR Spectroscopy as a Tool To Detect Potential Unintended Effects Following a Genetic Modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp.2447–2456.
- Gates, S. C., Sweeley, C. C., 1978. Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography. *Clinical Chemistry*, 24(10), pp.1663–1673.
- GESTIS-Stoffdatenbank, 2020. Charakterisierung stoffgruppenschlüssel 122200. *Institut für*

- Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung*, pp.1–12.
- GfK, 2014. Immer mehr Verbraucher kaufen, was ihren Werten entspricht: Regionalität + Nachhaltigkeit sind eine starke Wertekombination. *Consumer Scan*, 3, pp.1–7.
- Giraudeau, P., Silvestre, V., Akoka, S., 2015. Optimizing water suppression for quantitative NMR-based metabolomics : a tutorial review. *Metabolomics*, pp.1041–1055. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-015-0794-7>.
- Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schütz, B., Bansbach, M., Schäfer, H., Spraul, M., 2013. Targeted and nontargeted wine analysis by ¹H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. differentiation of important parameters: Grape variety, geographical origin, year of vintage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23), pp.5610–5619.
- Gowda, G. A. N., Djukovic, D., 2015. Overview of Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Opportunities and Challenges. *Methods Mol Biol.*, 1198, pp.3–12.
- Gowda, N. G. A., Raftery, D., 2015. Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? *Journal of Magnetic Resonance*, 260, pp.144–160.
- Grauso, L., Emrick, S., Lanzotti, V., 2019. Metabolomics of the alimurgic plants *Taraxacum officinale* , *Papaver rhoeas* and *Urtica dioica* by combined NMR and GC – MS analysis. , (April), pp.535–546.
- Graveley, B. R., 2001. Alternative splicing : increasing diversity in the proteomic world. *TRENDS in Genetics*, 17(2), pp.100–107.
- Van Der Greef, J., Smilde, A. K., 2005. Symbiosis of chemometrics and metabolomics: Past, present, and future. *Journal of Chemometrics*, 19(5–7), pp.376–386.
- Green, K. D., Garneau-tsodikova, S., Arbor, A., 2010. 5.15 Posttranslational Modification of Proteins. *Elsevier Ltd.*, pp.433–468.
- Griffiths, W. J., Wang, Y., 2009. Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chemical Society Reviews*, 38(7), p.1882. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b618553n>.
- Gromski, P. S., Muhamadali, H., Ellis, D. I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M. L., Goodacre, R., 2015. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica Chimica Acta*, 879, pp.10–23. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.012>.
- Hall, R., Beale, M., Fiehn, O., 2002. Plant metabolomics the missing link in functional genomics strategies. *The Plant Cell*, 14(July), pp.1437–1440. Available at: <http://www.plantcell.org/content/14/7/1437.short> [Accessed October 23, 2014].
- Hall, R. D., 2006. Plant metabolomics: From holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist*, 169(3), pp.453–468.
- Herrero, M., Simó, C., Garcia-Canas, V., Ibáñez, E., Cifuentes, A., 2011. FOODOMICS: MS-

- BASED STRATEGIES IN MODERN FOOD SCIENCE AND NUTRITION. *Mass Spectrometry Reviews*, 31, pp.49–69.
- Herrmann, L., 2015. *DNA-basierte Methoden zur Differenzierung der ecuadorianischen Kakaosorten Arriba und CCN-51 Dissertation*. Universität Hamburg.
- Herrmann, R., Maruhn, T., Gießen, J., 2008. Der Schutz geographischer Herkunftsangaben : Herausforderungen für agrarökonomische , rechtswissenschaftliche und interdisziplinäre Forschung. *German Journal of Agricultural Economics*, 57(2081), pp.321–324.
- Hirschfeld, T., 1980. The Hy-phen-ated Methods. *Analytical Chemistry*, 52(2), pp.903–906.
- Hohmann, M., Christoph, N., Wachter, H., Holzgrabe, U., 2014. ¹H NMR profiling as an approach to differentiate conventionally and organically grown tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, pp.8530–8540.
- Holmes, E., Tang, H., Wang, Y., Seger, C., 2006. The Assessment of Plant Metabolite Profiles by NMR-Based Methodologies. *Planta medica*, 72, pp.771–785.
- Horning, E., Horning, M., 1971. Human Metabolic Profiles Obtained by GC/MS. *J Chromatogr Sci*, 9(3), pp.129–140.
- Hoult, D. I., Busby, S. J. W., Gadian, D. G., Radda, G. K., Richards, R. E., Seeley, P. J., 1974. Observation of tissue metabolites using ³¹P nuclear magnetic resonance. *Nature*, 252(5481), pp.285–287.
- Huo, Y., Kamal, G. M., Wang, J., Liu, H., Zhang, G., Hu, Z., Anwar, F., Du, H., 2017. ¹H NMR-based metabolomics for discrimination of rice from different geographical origins of China. *Journal of Cereal Science*, 76, pp.243–252. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2017.07.002>.
- Hwang, T.-L., Shaka, A. J., 1995. Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Waveforms and Pulsed Field Gradients. *Journal of Magnetic Resonance*, 112, pp.275–279.
- Ioannidis, J. P. A., Greenland, S., Hlatky, M. A., Khoury, M. J., Macleod, M. R., Moher, D., Schulz, K. F., Tibshirani, R., 2016. Research: increasing value, reducing waste 2: Increasing value and reducing waste in research design, conduct, and analysis Prof. *PMC*, 383(9912), pp.166–175.
- Jones, P. A., Baylin, S. B., 2007. Review The Epigenomics of Cancer. *Cell*, 128, pp.683–692.
- Khan, S. A., Liu, X., Li, H., Zhu, Y., Fan, W., Zhou, P., Rehman, Z., 2016. ¹H NMR-based serum metabolic profiling of *Carassius auratus gibelio* under the toxicity of Pb²⁺ and Cd²⁺. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13(11), pp.2597–2608.
- Kim, H. K., Choi, Y. H., Verpoorte, R., 2010. NMR-based metabolomic analysis of plants.

- Nature protocols*, 5 (3), pp.536–549.
- Kjeldahl, K., Bro, R., 2010. Some common misunderstandings in chemometrics. *Journal of Chemometrics*, 24(7–8), pp.558–564.
- Klare, J., Rurik, M., Rottmann, E., Bollen, A., Kohlbacher, O., Fischer, M., Hackl, T., 2020. Determination of the Geographical Origin of *Asparagus officinalis* L. by ^1H NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, pp. 14353-14363. Available at <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05642>.
- Kortesniemi, M., Slupsky, C. M., Ollikka, T., Kauko, L., Spevacek, A. R., Sjövall, O., Yang, B., Kallio, H., 2016. NMR profiling clarifies the characterization of Finnish honeys of different botanical origins. *Food Research International*, 86, pp.83–92.
- Kruk, J., Doskocz, M., Jodłowska, E., Zacharzewska, A., Lakomiec, J., Czaja, K., Kujawski, J., 2017. NMR Techniques in Metabolomic Studies : A Quick Overview on Examples of Utilization. , 48, pp.1–21.
- Larive, C. K., Barding, G. A., Dinges, M. M., 2015. NMR spectroscopy for metabolomics and metabolic profiling. *Analytical Chemistry*, 87(1), pp.133–146.
- Lee, J. E., Lee, B.-J., Chung, J.-O., Hwang, J.-A., Lee, S.-J., Lee, C.-H., Hong, Y.-S., 2010. Geographical and Climatic Dependencies of Green Tea (*Camellia sinensis*) Metabolites: A ^1H NMR-Based Metabolomics Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), pp.10582–10589.
- Lee, J. E., Lee, B.-J., Chung, J.-O., Kim, H.-N., Kim, E.-H., Jung, S., Lee, H., Lee, S.-J., Hong, Y.-S., 2015. Metabolomic unveiling of a diverse range of green tea (*Camellia sinensis*) metabolites dependent on geography. *Food Chemistry*, 174, pp.452–459. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.086>.
- LFL Bayern, 2016. 9. Produkttag Spargel. 9. *Produkttag Spargel*, pp.1–4.
- Li, X., Luo, H., Huang, T., Xu, L., Shi, X., Hu, K., 2019. Statistically correlating NMR spectra and LC-MS data to facilitate the identification of individual metabolites in metabolomics mixtures. , pp.1301–1309.
- Liebeke, M., Bundy, J. G., 2011. Tissue disruption and extraction methods for metabolic profiling of an invertebrate sentinel species. *Metabolomics*, 8, pp.819–830.
- Lolli, M., Bertelli, D., Plessi, M., Sabatini, A. G., Restani, C., 2008. Classification of Italian honeys by 2D HR-NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), pp.1298–1304.
- Longobardi, F., Ventrella, A., Napoli, C., Humpfer, E., Schütz, B., Schäfer, H., Kontominas, M. G., Sacco, A., 2012. Classification of olive oils according to geographical origin by using ^1H NMR fingerprinting combined with multivariate analysis. *Food Chemistry*, 130(1), pp.177–183. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.045>.
- López-Rituerto, E., Savorani, F., Avenozza, A., Busto, J. H., Peregrina, J. M., Balling

- Engelsen, S., 2012. Investigations of la Rioja terroir for wine production using ^1H NMR metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(13), pp.3452–3461.
- Mallamace, D., Corsaro, C., Salvo, A., Cicero, N., Macaluso, A., Giangrosso, G., Ferrantelli, V., Dugo, G., 2014. A multivariate statistical analysis coming from the NMR metabolic profile of cherry tomatoes (The Sicilian Pachino case). *Physica A*, 401(112–117).
- Mannina, L., D'Imperio, M., Capitani, D., Rezzi, S., Guillou, C., Mavromoustakos, T., Molero Vilchez, M. D., Herrera Fernández, A., Thomas, F., Aparicio, R., 2009. ^1H NMR-based protocol for the detection of adulterations of refined olive oil with refined hazelnut oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(24), pp.11550–11556.
- Mannina, L., Patumi, M., Proietti, N., Bassi, D., Segre, A. L., 2001. Geographical Characterization of Italian Extra Virgin Olive Oils Using High-Field ^1H NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), pp.2687–2696. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf001408i>.
- Mannina, L., Fontanazza, G., Patumi, M., Ansanelli, G., Segre, A. L., 2001. Italian and Argentine olive oils: a NMR and gas chromatographic study. *Grasas y Aceites*, 52(6), pp.380–388. Available at: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/348/350>.
- Mannina, L., Marini, F., Gobbino, M., Sobolev, A. P., Capitani, D., 2010. NMR and chemometrics in tracing European olive oils: The case study of Ligurian samples. *Talanta*, 80(5), pp.2141–2148. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.11.021>.
- Mannina, L., Sobolev, A. P., 2011. High resolution NMR characterization of olive oils in terms of quality, authenticity and geographical origin. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 49(SUPPL. 1).
- Mannina, L., Sobolev, A. P., Viel, S., 2012. Liquid state ^1H high field NMR in food analysis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 66, pp.1–39.
- Markley, J. L., Brüschweiler, R., Edison, A. S., Eghbalnia, h. R., Powers, R., Raftery, D., Wishart, D. S., 2017. The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 43, pp.34–40.
- Marshall, D. D., Lei, S., Worley, B., Huang, Y., Garcia-Garcia, A., Franco, R., Dodds, E. D., Powers, R., 2015. Combining DI-ESI–MS and NMR datasets for metabolic profiling. *Metabolomics*, 11(2), pp.391–402.
- Marshall, D. D., Powers, R., 2017. Beyond the paradigm: Combining mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for metabolomics. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 100(1–16), p.1. Marshall DD, Powers R. Beyond the paradigm: Com.
- Massart, D. L., Smeyers-Verbeke, J., Capron, X., Schlesier, K., 2005. Visual Presentation of

- Data by Means of Box Plots. *LC-GC Europe*, 18(4), pp.215–218. Available at:
<http://www.mendeley.com/research/visual-presentation-of-data-by-means-of-box-plots%5Cnhttp://www.lcgceurope.com/lcgceurope/data/articlestandard/lcgceurope/132005/152912/article.pdf%5Cnwww.lcgceurope.com>.
- Massart, D. L., Vander Heyden, Y., 2004. From Tables to Visuals: Principal Component Analysis, Part 1. *LC-GC Europe*, 17(11), pp.586–591.
- Mattick, J. S., Makunin, I. V., 2006. Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics*, 15(1), pp.17–29.
- McKay, R. T., 2011. How the 1D-NOESY suppresses solvent signal in metabonomics NMR spectroscopy: An examination of the pulse sequence components and evolution. *Concepts in Magnetic Resonance Part A: Bridging Education and Research*, 38 A(5), pp.197–220.
- Meiss, E., Werner, P., John, C., Scheja, L., Herbach, N., Heeren, J., Fischer, M., 2016. Metabolite targeting : development of a comprehensive targeted metabolomics platform for the assessment of diabetes and its complications. *Metabolomics*, p.15.
- Miller, J. M., Miller, J. C., 2010. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*,
- Mo, H., Raftery, D., 2008a. Improved residual water suppression: WET180. *Journal of Biomolecular NMR*, 41, pp.105–111.
- Mo, H., Raftery, D., 2008b. Pre-SAT180, a simple and effective method for residual water suppression. *Journal of Magnetic Resonance*, 190(1), pp.1–12.
- Nations, U., 2019. *GLOBALLY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELLING OF CHEMICALS (GHS)*,
- Neidig, K.-P., 2006. *Amix-Viewer & Amix Software Manual*,
- Nemkov, T., Hansen, K. C., D'Alessandro, A., 2017. A three-minute method for high-throughput quantitative metabolomics and quantitative tracing experiments of central carbon and nitrogen pathways. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 31(8), pp.663–673.
- Nicholson, J. K., O'Flynn, M. P., Sadler, P. J., Macleod, A. F., Juul, S. M., Sönksen, P. H., 1984. Proton-nuclear-magnetic-resonance studies of serum, plasma and urine from fasting normal and diabetic subjects. *The Biochemical journal*, 217(2), pp.365–75. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1153226&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nicholson, J. K., Lindon, J. C., 2008. SYSTEMS BIOLOGY Metabonomics. *nature*, 455, pp.1054–1056.
- Nicholson, J. K., Lindon, J. C., Holmes, E., 2008. “Metabonomics”: Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate

- statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29(11), pp.1181–1189.
- Ohno, A., Oka, K., Sakuma, C., Okuda, H., Fukuhara, K., 2011. Characterization of Tea Cultivated at Four Different Altitudes Using H-1 NMR Analysis Coupled with Multivariate Statistics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), pp.5181–5187.
- Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B., Baganz, F., 1998. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, 16(9), pp.373–378. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779998012141>.
- Ordoudi, S. A., Cagliani, L. R., Lalou, S., Naziri, E., Tsimidou, M. Z., Consonni, R., 2015. ¹H NMR-based metabolomics of saffron reveals markers for its quality deterioration. *Food Research International*, 70, pp.1–6.
- Palaric, C., Pilard, S., Fontaine, J.-X., Boccard, J., Mathiron, D., Rigaud, S., Cailleu, D., Mesnard, F., Gut, Y., Renaud, T., Petit, A., Beaumal, J.-Y., Molinié, R., 2019. Processing of NMR and MS metabolomics data using chemometrics methods : a global tool for fungi biotransformation reactions monitoring. *Metabolomics*, 15(8), pp.1–13. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1567-5>.
- Papotti, G., Bertelli, D., Graziosi, R., Silvestri, M., Bertaccini, L., Durante, C., Plessi, M., 2013. Application of one- and two-dimensional NMR spectroscopy for the characterization of protected designation of Origin Lambrusco wines of modena. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), pp.1741–1746.
- Powers, R., 2009. NMR metabolomics and drug discovery. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 47(SUPPL. 1).
- Přichystal, J., Schug, K. A., Lemr, K., Novák, J., Havlicek, V., 2016. Structural Analysis of Natural Products. *Analytical Chemistry*, 88(21), pp.10338–10346.
- Rezzi, S., Axelson, D. E., Héberger, K., Reniero, F., Mariani, C., Guillou, C., 2005. Classification of olive oils using high throughput flow ¹H NMR fingerprinting with principal component analysis, linear discriminant analysis and probabilistic neural networks. *Analytica Chimica Acta*, 552(1–2), pp.13–24.
- Richard, A., Louise, P. H., 2011. SAC review “ Omic ” technologies : proteomics and metabolomics Learning objectives : Ethical issues : , pp.189–195.
- Richter, B., Gurk, S., Wagner, D., Bockmayr, M., Fischer, M., 2019. Food authentication : Multi-elemental analysis of white asparagus for provenance discrimination. , 286(August 2018), pp.475–482.
- Richter, B., Rurik, M., Gurk, S., Kohlbacher, O., Fischer, M., 2019. Food monitoring : Screening of the geographical origin of white asparagus using FT-NIR and machine learning. *Food Control*, 104(April), pp.318–325. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.04.032>.

- Sacchi, R., Addeo, F., Paolillo, L., 1997. ^1H and ^{13}C NMR of virgin olive oil. An overview. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 35, pp.S133–S145. Available at: [http://doi.wiley.com/10.1002/\(SICI\)1097-458X\(199712\)35:13%3CS133::AID-OMR213%3E3.0.CO;2-K](http://doi.wiley.com/10.1002/(SICI)1097-458X(199712)35:13%3CS133::AID-OMR213%3E3.0.CO;2-K).
- Salek, R. M., Neumann, S., Schober, D., Hummel, J., Billiau, K., Kopka, J., Correa, E., Reijmers, T., Rosato, A., Tenori, L., Turano, P., Marin, S., Deborde, C., Jacob, D., Rolin, D., Dartigues, B., Conesa, P., Haug, K., Rocca-Serra, P., O'Hagan, S., Hao, J., van Vliet, M., Sysi-Aho, M., Ludwig, C., Bouwman, J., Cascante, M., Ebbels, T., Griffin, J. L., Moing, A., Nikolski, M., Oresic, M., Sansone, S.-A., Viant, M. R., Goodacre, R., Günther, U. L., Hankemeier, T., Luchinat, C., Walther, D., Steinbeck, C., 2015. COordination of Standards in MetabOmicS (COSMOS): facilitating integrated metabolomics data access. *Metabolomics*, 11(6), pp.1587–1597.
- Sandusky, P., Raftery, D., 2005. Use of selective TOCSY NMR experiments for quantifying minor components in complex mixtures: Application to the metabonomics of amino acids in honey. *Analytical Chemistry*, 77(8), pp.2455–2463.
- Link, H., Fuhrer, T., Gerosa, L., Zamboni, N., Sauer, U., 2015. Real-time metabolome profiling of the metabolic switch between starvation and growth. *Nature Methods*, 12(11), pp.1091–1097.
- Schievano, E., Peggion, E., Mammi, S., 2010. ^1H nuclear magnetic resonance spectra of chloroform extracts of honey for chemometric determination of its botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), pp.57–65.
- Schlicht, C., Rossmann, A., Brunner, E., 2006. Anwendung der multielement-multikomponenten isotopenverh??ltismassenspektrometrie (IRMS) zur pr??fung der geographischen herkunft von spargel. *Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 1(2), pp.97–105.
- Seaborn, 2020. seaborn.boxplot. , pp.1–9.
- Shanaiah, N., Desilva, M. A., Gowda, G. A. N., Raftery, M. A., Hainline, B. E., Raftery, D., 2007. Class selection of amino acid metabolites in body fluids using chemical derivatization and their enhanced ^{13}C NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(28), pp.11540–4. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34547423744&partnerID=tZOtx3y1>.
- Sims, J. K., Manteiga, S., Lee, K., 2013. Towards high resolution analysis of metabolic flux in cells and tissues. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(5), pp.933–939. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.07.001>.
- Sobolev, A. P., Mannina, L., Proietti, N., Carradori, S., Daglia, M., Giusti, A. M., Antiochia, R., Capitani, D., 2015. Untargeted NMR-based methodology in the study of fruit

- metabolites. *Molecules*, 20(3), pp.4088–4108.
- Son, H.-S., Hwang, G.-S., Ahn, H. J., Park, W.-M., Lee, C.-H., Hong, Y.-S., 2009. Characterization of wines from grape varieties through multivariate statistical analysis of ¹H NMR spectroscopic data. *Food Research International*, 42(10), pp.1483–1491.
- Son, H.-S., Kim, K.-M., van den Berg, F., Hwang, G.-S., Park, W.-M., Lee, C.-H., Hong, Y.-S., 2008. ¹H Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomic Characterization of Wines by Grape Varieties and Korea Cabernet Sauvignon 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp.8007–8016.
- Son, H.-S., Hwang, G.-S., Kim, K. M., Ahn, H. J., Park, W.-M., van den Berg, F., Hong, Y.-S., Lee, C.-H., 2009. Metabolomic Studies on Geographical Grapes and Their Wines Using ¹H NMR Analysis Coupled with Multivariate Statistics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), pp.1481–1490. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf803388w>.
- Spraul, M., Schütz, B., Humpfer, E., Mörtter, M., Schäfer, H., Koswig, S., Rinke, P., 2009. Mixture analysis by NMR as applied to fruit juice quality control. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 47(SUPPL. 1).
- Spraul, M., Schütz, B., Rinke, P., Koswig, S., Humpfer, E., Schäfer, H., Mörtter, M., Fang, F., Marx, U. C., Minoja, A., 2009. NMR-based multi parametric quality control of fruit juices: SGF profiling. *Nutrients*, 1(2), pp.148–155. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3257600&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 22, 2014].
- Statista, 2020a. Anbaufläche von Spargel in Deutschland in den Jahren 2007 bis 2020.
- Statista, 2020b. Erntemenge der führenden Anbauländer von Spargel weltweit im Jahr 2018 (in Tonnen).
- Statista, 2020c. Erntemenge von Spargel in Deutschland in den Jahren 2000 bis 2020.
- Statista, 2020d. Erntemenge von Spargel in Deutschland in den Jahren 2018 bis 2020 nach Bundesländern (in Tonnen).
- Statista, 2020e. Monatliche Menge der Importe und Exporte von frischem oder gekühltem Spargel in Deutschland von Januar 2018 bis Januar 2020 (in Tonnen).
- Strobl, P., 2015. Spargelsorten mit Erfolgspotential. 6. *Produkttag Spargel der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft Vortrag*.
- Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Azam, K., Vadivelu, I., Burant, C., Edison, A., Fiehn, O., Higashi, R., Nair, K. S., Sumner, S., Subramaniam, S., 2016. Metabolomics Workbench: An international repository for metabolomics data and metadata, metabolite standards, protocols, tutorials and training, and analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), pp.D463–D470.
- Tayyari, F., Gowda, G. A. N., Gu, H., Raftery, D., 2013. ¹⁵N-Cholamine - A smart isotope tag

- for combining NMR- and MS-based metabolite profiling. *Analytical Chemistry*, 85(18), pp.8715–8721.
- Tomassini, A., Sciubba, F., Di Cocco, M. E., Capuani, G., Delfini, M., Aureli, W., Miccheli, A., 2016. ¹H NMR-Based Metabolomics Reveals a Pedoclimatic Metabolic Imprinting in Ready-to-Drink Carrot Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, pp.5284–5291.
- Tomassini, A., Capuani, G., Delfini, M., Miccheli, A., 2013. *NMR-Based Metabolomics in Food Quality Control* 1st ed., Copyright © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59528-7.00011-9>.
- Tomita, S., Nemoto, T., Matsuo, Y., Shoji, T., Tanaka, F., Nakagawa, H., Ono, H., Kikuchi, J., Ohnishi-Kameyama, M., Sekiyama, Y., 2015. A NMR-based, non-targeted multistep metabolic profiling revealed l-rhamnitol as a metabolite that characterised apples from different geographic origins. *Food Chemistry*, 174, pp.163–172.
- Torrent, J., Liu, Q. S., Barrón, V., 2010. Geoderma Magnetic minerals in Calcic Luvisols (Chromic) developed in a warm Mediterranean region of Spain : Origin and paleoenvironmental significance. *Geoderma*, 154(3–4), pp.465–472. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2008.06.020>.
- Transamerika, 2009. Peru (Südamerika): Geographie und Landkarte. , pp.1–6.
- Trygg, J., Holmes, E., Lundstedt, T., 2007. Chemometrics in Metabonomics. *Journal of Proteome Research*, 6(2), pp.469–479.
- Universität Hamburg, 2014. Lebensmittelchemisches Praktikum.
- Universität Köln, 2001. Stichprobenumfang. , pp.9–10.
- Viggiani, L., Antonietta, M., Morelli, C., 2008. Characterization of Wines by Nuclear Magnetic Resonance : A Work Study on Wines from the Basilicata Region in Italy
Characterization of Wines by Nuclear Magnetic Resonance : A Work Study on Wines from the Basilicata Region in Italy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), pp.8273–8279.
- Vlahov, G., 1999. Application of NMR to the study of olive oils. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 35(4), pp.341–357.
- Ward, J. L., Baker, J. M., Miller, S. J., Deborde, C., Maucourt, M., Biais, B., Rolin, D., Moing, A., Moco, S., Vervoort, J., Lommen, A., Schäfer, H., Humpfer, E., Beale, M. H., 2010. An inter-laboratory comparison demonstrates that [¹H]-NMR metabolite fingerprinting is a robust technique for collaborative plant metabolomic data collection. *Metabolomics*, 6(2), pp.263–273.
- Wei, F., Furihata, K., Koda, M., Hu, F., Kato, R., Miyakawa, T., Tanokura, M., 2012. ¹³C NMR-based metabolomics for the classification of green coffee beans according to variety and origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(40), pp.10118–10125.

- Weindl, D., 2015. *NON-TARGETED MASS ISOTOPOLOME ANALYSIS TO GAIN INSIGHTS INTO CANCER CELL METABOLISM*. L'UNIVERSITÉ DU LUXEMBOURG.
- Werner, P., Meiss, E., Scheja, L, Heeren, J., Fischer, M., 2017. Metabolite profiling : development and application of an UHR- QTOF-MS (/ MS) method approach for the assessment of metabolic changes in high fat diet fed mice. *Metabolomics*, 13(4), pp.1–10.
- Wishart, D. S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A. C., Young, N., Cheng, D., Jewell, K., Arndt, D., Sawhney, S., Fung, C., Nikolai, L., Lewis, M., Coutouly, M.-A., Forsythe, I., Tang, P., Shrivastava, S., Jeroncic, K., Stothard, P., Amegbey, G., Block, D., Hau, D. D., Wagner J., Miniaci, J., Clements, M., Gebremedhin, M., Guo, N., Zhang, Y., Duggan, G. E., MacInnis, G. D., Weljie, A. M., Dowlatabadi, R., Bamforth, F., Clive, D., Greiner, R., Li, L., Marrie, T., Sykes, B. D., Vogel, H. J., Querengesser, L., 2007. HMDB: The human metabolome database. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL. 1), pp.521–526.
- Wishart, D. S., 2008. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science and Technology*, 19(9), pp.482–493.
- Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Eisner, R., Young, N., Gautam, B., Hau, D. D., Psychogios, N., Dong, E., Bouatra, S., Mandal, R., Sinelnikov, I., Xia, J., Jia, L., Cruz, J. A., Lim, E., Sobsey, C. A., Shrivastava, S., Huang, P., Liu, P., Fang, L., Peng, J., Fradette, R., Cheng, D., Tzur, D., Clements, M., Lewis, A., De Souza, A., Zuniga, A., Dawe, M., Xiong, Y., Clive, D., Greiner, R., Nazyrova, A., Shykhutdinov, R., Li, L., Vogel, H. J., Forsythe, I., 2009. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Research*, 37(October 2008), pp.603–610.
- Wishart, D. S., Jewison, R., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djoumbou, Y., Mandal, R., Aziat, F., Dong, E., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Arndt, D., Xia, J., Liu, P., Yallou, F., Bjorn Dahl, T., Perez-Pineiro, R., Eisner, R., Allen, F., Neveu, V., Greiner, R., Scalbert, A., 2013. HMDB 3.0 — The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Research*, 41(November 2012), pp.801–807.
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo, A. C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Karu, N., Sayeeda, Z., Lo, E., Assempour, N., Berjanskii, M., Singhal, S., Arndt, D., Liang, Y., Badran, H., Grant, J., Serra-Cayuela, A., Liu, Y., Mandal, R., Neveu, V., Ron, A., Knox, C., Wilson, M., Manach, C., Scalbert, A., 2018. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(November 2017), pp.608–617. Available at: <http://academic.oup.com/nar/article/doi/10.1093/nar/gkx1089/4616873>.
- Wollschläger, D., 2015. Vorhersagegüte prädiktiver Modelle. *Grundlagen der Datenanalyse mit R*, pp.497–503.

- Worley, B., Powers, R., 2014. MVAPACK: A complete data handling package for NMR metabolomics. *ACS Chemical Biology*, 9(5), pp.1138–1144.
- Wu, H., Southam, A. D., Hines, A., Viant, M. R., 2008. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Analytical Biochemistry*, 372, pp.204–212.
- Xiao, C., Hao, F., Qin, X., Wang, Y., Tang, H., 2009. An optimized buffer system for NMR-based urinary metabonomics with effective pH control, chemical shift consistency and dilution minimization. *Analyst*, 134, pp.916–925.
- Yang, C., Harrison, C., Jin, E. S., Chuang, D. T., Sherry, A. D., Malloy, C. R., Merritt, M. E., DeBerardinis, R. J., 2014. Simultaneous steady-state and dynamic ^{13}C NMR can differentiate alternative routes of pyruvate metabolism in living cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 289(9), pp.6212–6224.
- Yang, Y., Lane, A. N., Ricketts, C. J., Sourbier, C., Wei, M.-H., Shuch, B., Pike, L., Wu, M., Rouault, T. A. Boros, L. G., Fan, T. W.-M., Linehan, W. M., 2013. Metabolic Reprogramming for Producing Energy and Reducing Power in Fumarate Hydratase Null Cells from Hereditary Leiomyomatosis Renal Cell Carcinoma. *PLoS ONE*, 8(8), pp.1–14.
- Yang, Z., 2006. Online hyphenated liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy-mass spectrometry for drug metabolite and nature product analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40(3), pp.516–527.
- Ye, T., Mo, H., Shanaia, N., Gowda, G. A. N., Zhang, S., Ratery, D., 2009. Chemosensitive ^{15}N tag for sensitive and high-resolution nuclear magnetic resonance profiling of the carboxyl-containing metabolome. *Analytical Chemistry*, 81(12), pp.4882–4888.
- Yoon, D., Kim, S., Lee, M., Yoon, C., Kim, S., 2016. ^1H -NMR-based metabolomic study on toxicity of methomyl and methidathion in fish. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 51(12), pp.824–831. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2016.1208460>.
- Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., Wang, X., 2012. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *The Analyst*, 137(2), pp.293–300. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C1AN15605E>.
- Zhang, A. H., Sun, H., Qiu, S., Wang, X.-j., 2013. NMR-based metabolomics coupled with pattern recognition methods in biomarker discovery and disease diagnosis. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 51(9), pp.549–556.
- Zhao, H., Xu, J., Ghebrezadik, H., Hylands, P. J., 2015. Metabolomic quality control of commercial Asian ginseng, and cultivated and wild American ginseng using ^1H NMR and multi-step PCA. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 114, pp.113–120. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.05.010>.

8 Literaturliste

Zheng, G., Price, W. S., 2010. Solvent signal suppression in NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 56(3), pp.267–288. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnmrs.2010.01.001>.

Zielinski, A. A. F., Haminiuk, C. W. I., Nunes, C. A., Schnitzler, E., van Ruth, S. M., Granato, D., 2014. Chemical Composition, Sensory Properties, Provenance, and Bioactivity of Fruit Juices as Assessed by Chemometrics: A Critical Review and Guideline. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(3), pp.300–316.

Weiterführende Literatur:

BMRB, 2020: A Repository for Data from NMR Spectroscopy on Proteins, Peptides, Nucleic Acids, and other Biomolecules
<http://www.bmrwisc.edu/>, 11.12.2020

CHEMISTRY GLOSSARY, 2020: Periodic Table of the Elements
<https://glossary.periodni.com/glossary.php?en=period>, 09.12.2020

ChemSketch, 2020: ACD/ChemSketch - A Free Comprehensive Chemical Drawing Package, version 2020.1.1, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada,
www.acdlabs.com, 14.09.2020

Chenomx NMR Suite, 2020: Chenomx NMR Suite Software Version 5.2
<https://www.chenomx.com/>, 09.12.2020

European Commission, 2020a: Lebensmittel und landwirtschaftliche Erzeugnisse
https://ec.europa.eu/agriculture/quality/schemes/foodstuff_de, 09.12.2020

European Commission, 2020b: Landwirtschaft und ländliche Entwicklung DOOR (Database Of Origin & Registration)
https://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html?locale=de&recordStart=0&filter.dossierNumber=&filter.comboName=spargel&filterMin.milestone__mask=&filterMin.milestone=&filterMax.milestone__mask=&filterMax.milestone=&filter.country=&filter.category=&filter.type=&filter.status=, 09.12.2020

FooDB, 2020: The Food Data Base Version 1.0
www.foodb.ca, 09.12.2020

Haller, D., Grune, T., Rimbach, G., 2013: Biofunktionalität der Lebensmittelinhaltsstoffe. 1. Auflage 2012, Springer Spektrum, Wiesbaden, ISBN: 978-3-642-29374-0.

HMDB, 2020: The Human Metabolome Database

<http://www.hmdb.ca/metabolites>, 22.09.2020

HMDB L-Tyrosin, 2020: ¹H-NMR-Spektrum einer L-Tyrosin-Probe

http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/4862#details, 09.12.2020

Keeler, J., 2010: Understanding NMR Spectroscopy. Second Edition 2010, John Wiley & Sons Ltd., The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, United Kingdom. ISBN: 978-0-470-74609-7.

Lambert, J. B., Gronert, S., Shurvell, H. F., Lightner, D. A., 2012: Spektroskopie - Strukturaufklärung in der Organischen Chemie. 2. aktualisierte Auflage, 2012, Pearson Studium, München. ISBN: 3868941460.

Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Homes, E., 2007: The Handbook of Metabonomics and Metabolomics. First Edition 2007, Elsevier, Radarweg 29, PP Box 211, Amsterdam. ISBN-13: 978-0-44-452841-4, ISBN-10: 0-44-45-2841-5.

Löbell, G., Löbell, E., 2000: Spargel Kultur.Mythos.Gesundheit.Rezepte. 1. Auflage, 2000, Umschau Braus GmbH Verlagsgesellschaft, Frankfurt. ISBN: 3865282547.

Marini, F., 2013: Chemometrics in Food Chemistry. First Edition 2013, Elsevier, Oxford. ISBN: 978-0-444-59528-7.

Masclef, A., 1987: Atlas des plantes de France. 1. Édition, Belin, Paris. ISBN : 978-2-7011-1092-9.

Matissek, R., Fischer, M., Steiner, G., 2018: Lebensmittelanalytik. 6. Auflage 2018, Berlin, Springer-Verlag, Heidelberg. ISBN: 978-3-662-55722-8.

Metabolomics Society, 2014: Databases

<http://metabolomicssociety.org/resources/metabolomics-databases>, 09.12.2020

METLIN, 2020: Metabolomics Data Analysis

http://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage, 16.09.2020

Pett, M. A., 2016: Nonparametric Statistics for Health Care Research – Statistics for Small Samples and Unusual Distributions. Second Edition 2016, SAGE Publications, Inc. 2455 Teller Road, Thousand Oaks, California 91320. ISBN: 978-1-4522-8196-4.

Quartier Christ, 2011: Vom Anbau bis in den Verkauf

http://www.quartier-christ.de/spargel_anbau.php, 09.12.2020

Souci, S. W., Fachmann, W., Kraut, H., 2008: Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen. 7. überarbeitete Auflage 2008, medpharm Scientific Publisher, Stuttgart. ISBN: 9783804711426.

Spraul, M., 2014: Treffen im Rahmen der Projektentstehung mit Manfred Spraul

SMRS, 2004: The Standard Metabolic Reporting Structure

<http://smrsgroup.sourceforge.net/>, 30.01.2018

Universität Hamburg, 2016: Skripts zum Lebensmittelchemischen Praktikum

9 Anhang

9.1 Abbildungen

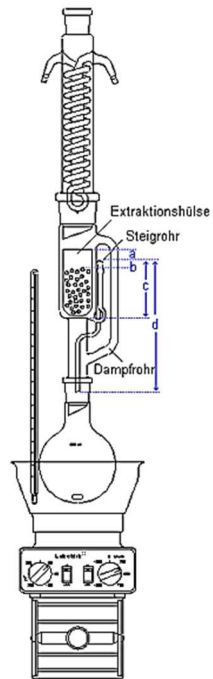


Abbildung 66: Aufbau einer Soxhlet-Apparatur (Freie Universität Berlin, 2006)

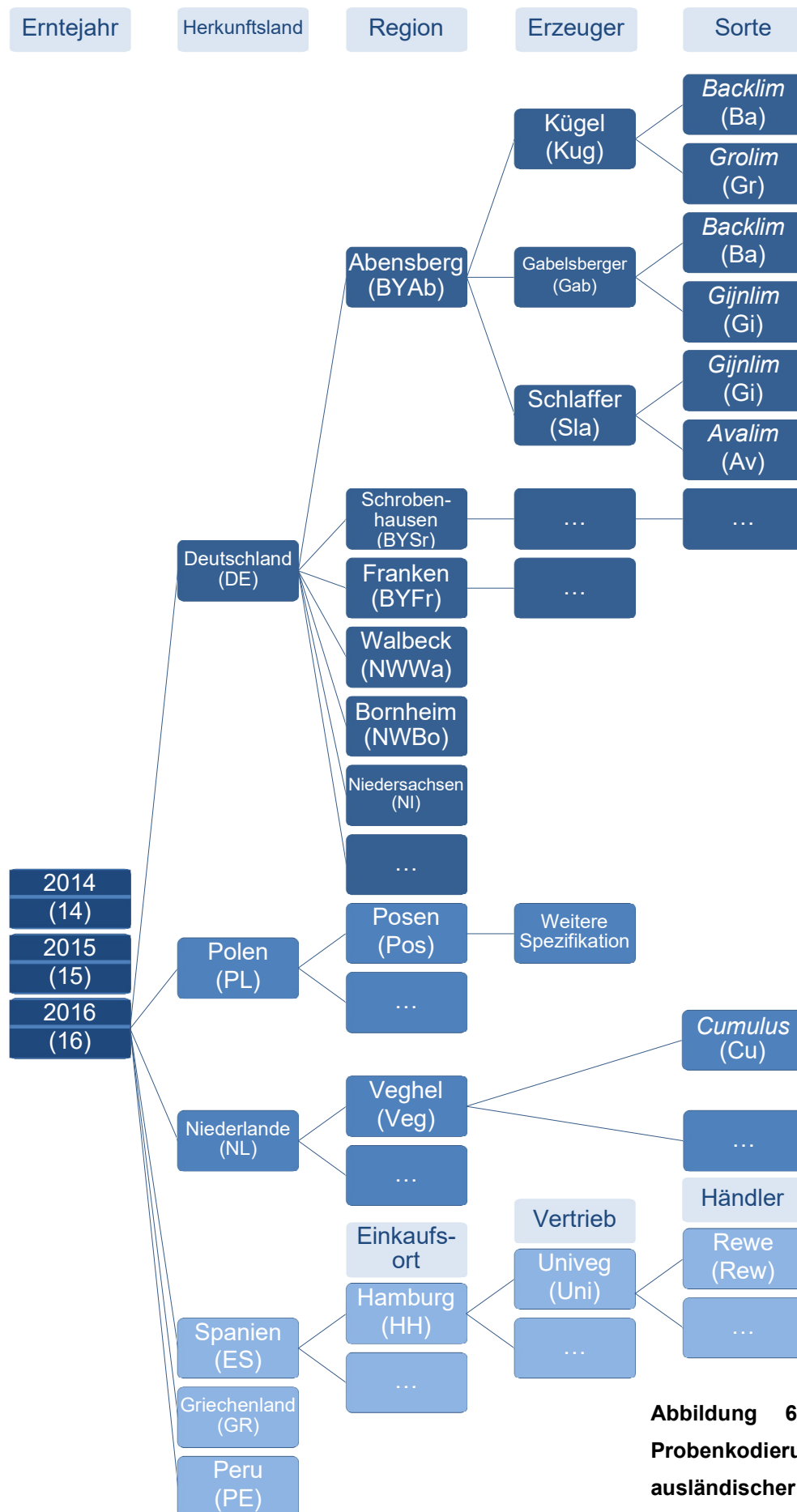


Abbildung 67: Schema zur Probenkodierung deutscher und ausländischer Spargelproben

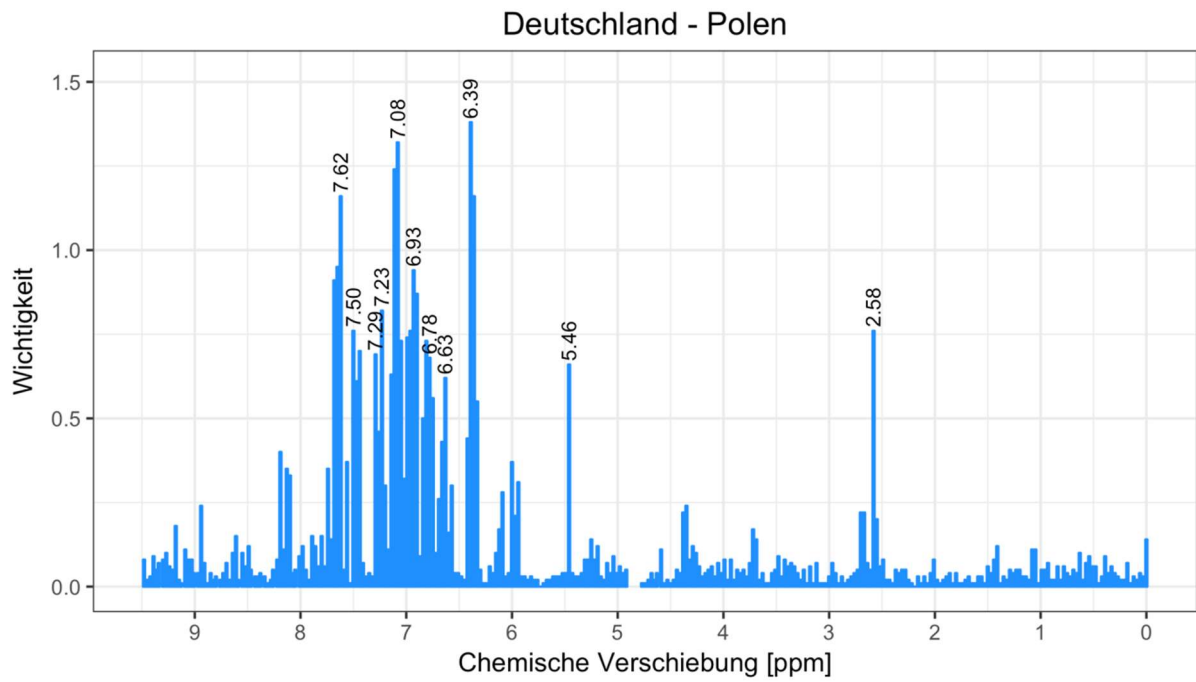


Abbildung 68: *Importance plot* der 1D-¹H-NOESY-Spektren deutscher und polnischer Spargelproben

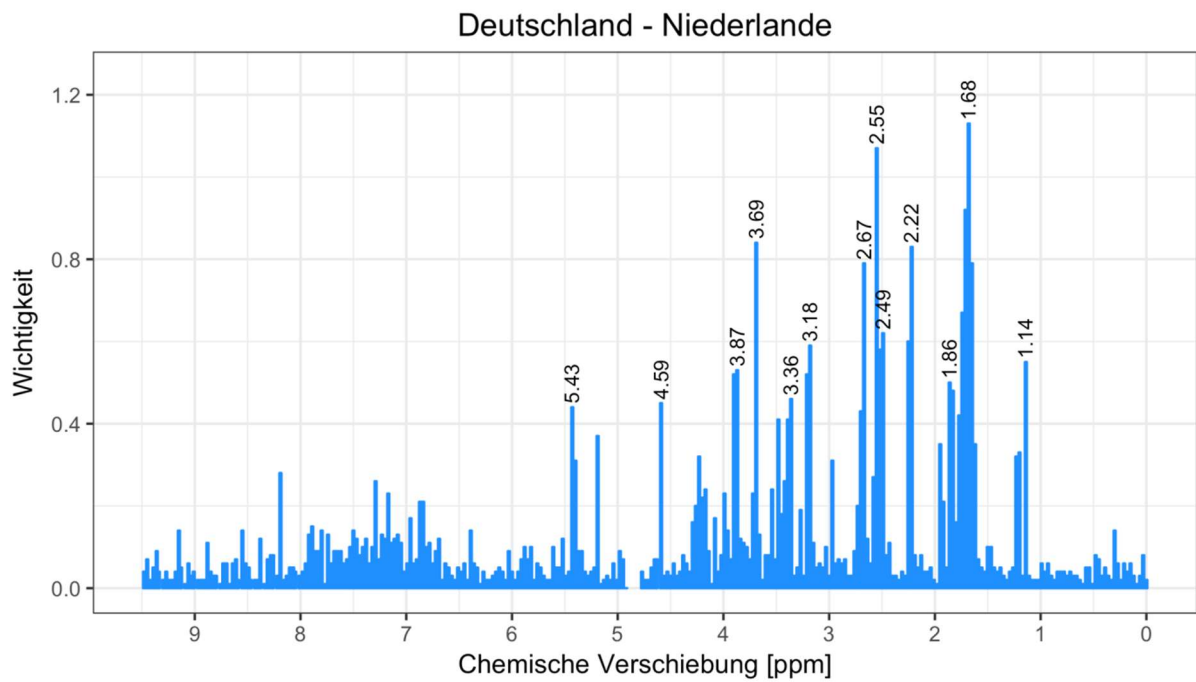


Abbildung 69: *Importance plot* der 1D-¹H-NOESY-Spektren deutscher und niederländischer Spargelproben

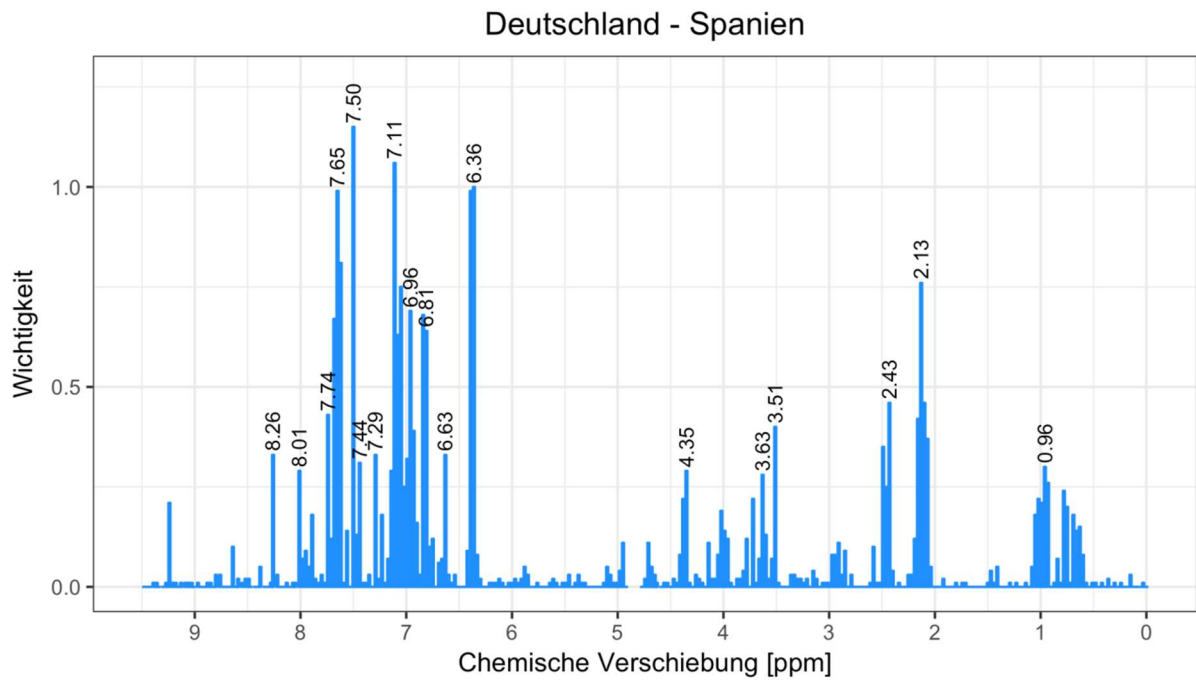


Abbildung 70: *Importance plot* der 1D-¹H-NOESY-Spektren deutscher und spanischer Spargelproben

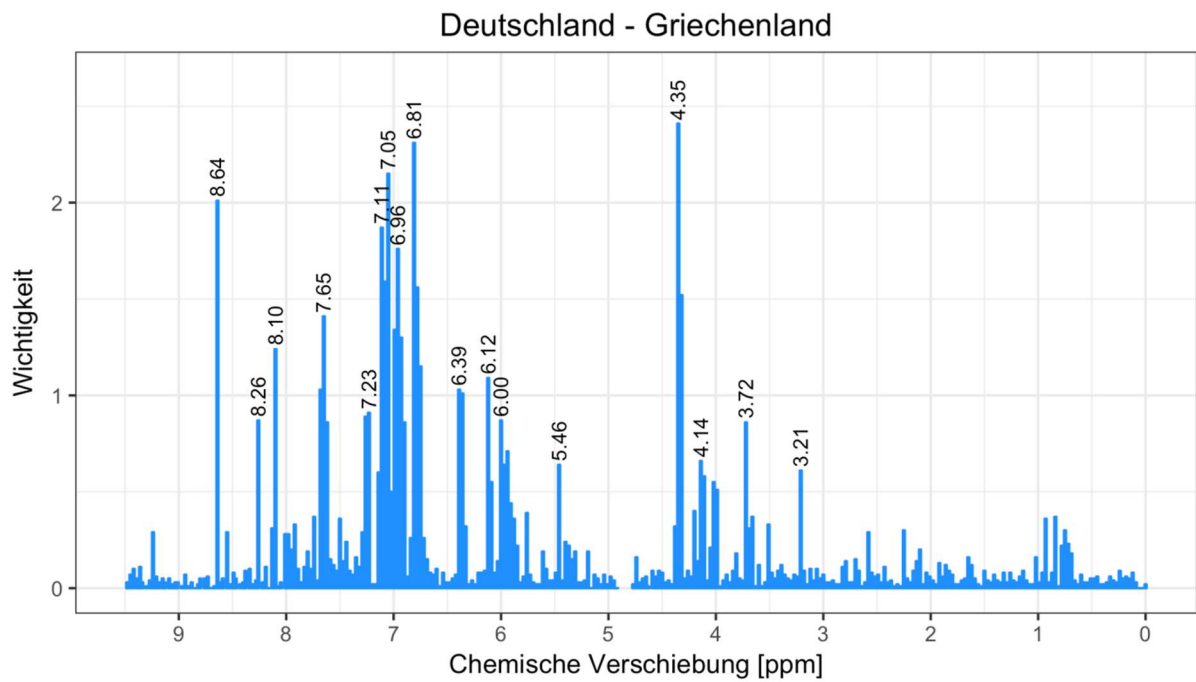


Abbildung 71: *Importance plot* der 1D-¹H-NOESY-Spektren deutscher und griechischer Spargelproben

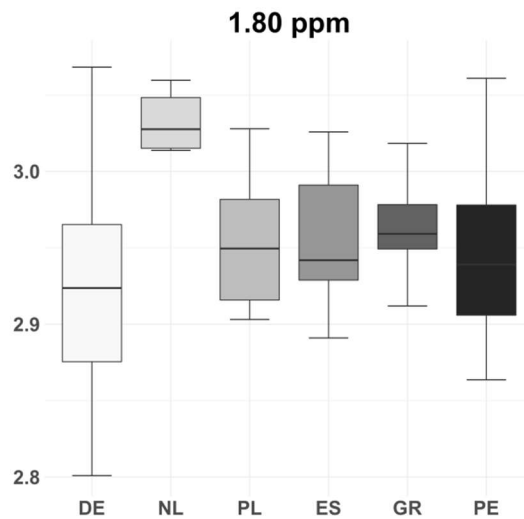


Abbildung 72: *Box plot* des *buckets* bei 1.80 ppm für die Separierung von niederländischen Spargelproben; Intensitäten logarithmiert

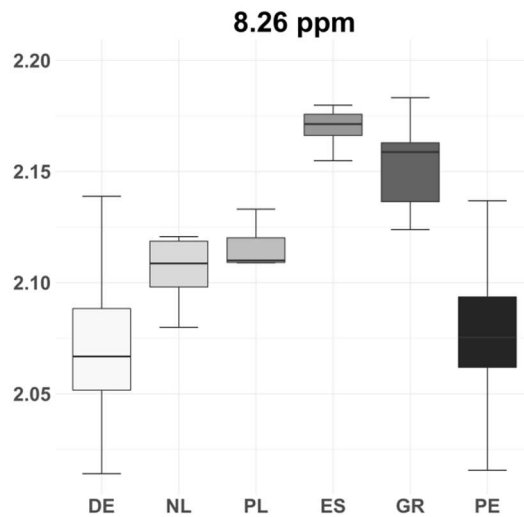


Abbildung 73: *Box plot* des *buckets* bei 8.26 ppm für die Separierung von niederländischen und polnischen (NB) sowie spanischen und griechischen (MT) Spargelproben; Intensitäten logarithmiert

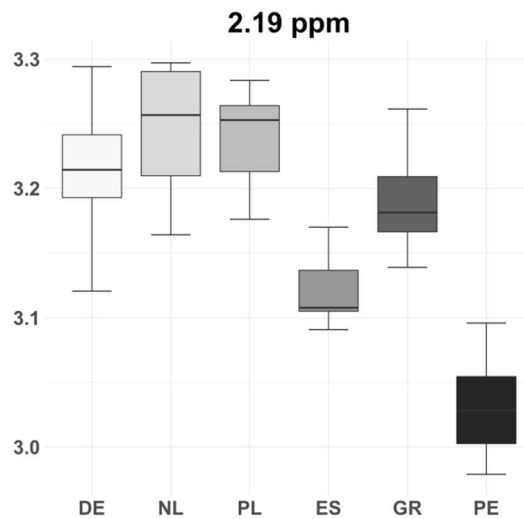


Abbildung 74: *Box plot* des *buckets* bei 2.19 ppm für die Separierung von spanischen Spargelproben; Intensitäten logarithmiert

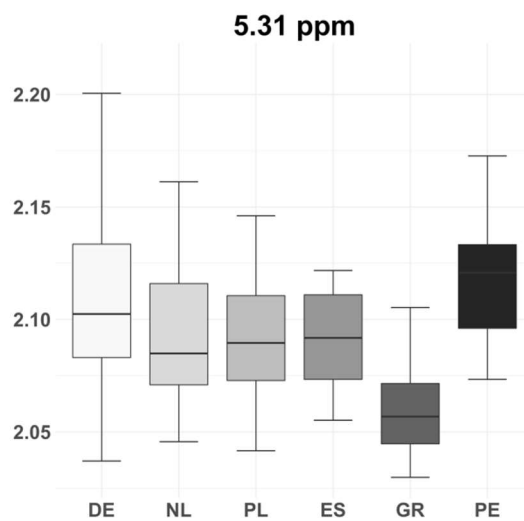


Abbildung 75: *Box plot* des *buckets* bei 5.31 ppm für die Separierung von griechischen Spargelproben; Intensitäten logarithmiert

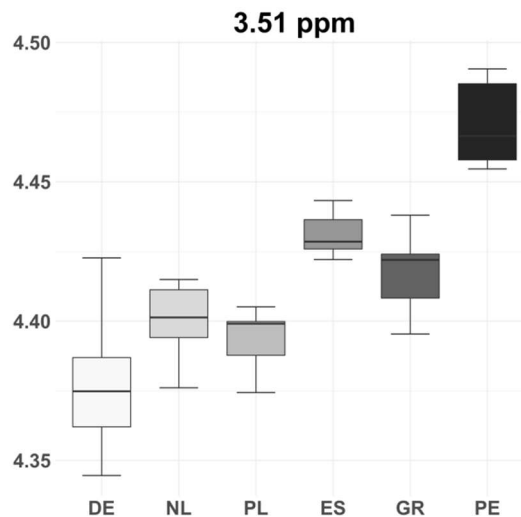


Abbildung 76: *Box plot* des *buckets* bei 3.51 ppm für die Separierung von spanischen und peruanischen Spargelproben; Intensitäten logarithmiert

9.2 Tabellen

Tabelle 38: Probenkodierung Spargel Deutschland 2014

Regionen	Name	Ort	Abkürzungs-Code
Bayern Schrobenhausen (BYSr)	Andreas Sigllechner	Hohenwart	14-DE-BYSr-Sig-Vi
	Johann Tyroller	Schrobenhausen	14-DE-BYSr-Tyr-Gr?
	Paul Gamperl	Inchenhofen	14-DE-BYSr-Gam-Gi
Bayern Abensberg (BYAb)	Wolfgang Kügel	Sandharlanden	14-DE-BYAb-Kug-Gr
	Josef Gabelsberger	Offenstetten	14-DE-BYAb-Gab-Ba
	Wolfgang Schlaffer	Train/Neukirchen	14-DE-BYAb-Sla-Av
Bayern Franken (BYFr)	Spargel-Erzeugerverband Franken e.V.	Nürnberg-Buch	14-DE-BYFr-ErzV-Gi
	Spargel-Erzeugerverband Franken e.V.	Nürnberg-Buch	14-DE-BYFr-ErzV-Ba
	Siegfried Zenk	Hausen	14-DE-BYFr-Zen-Ba
	Hans Wolf	Prichsenstadt	14-DE-BYFr-Wol-Gr

9 Anhang

Nordrhein- Westfalen	Leonhard Palm (Biospargel)	Bornheim	14-DE-NWBo-Pal-Ba
Bornheim (NWBo)	Raphael Schmitz	Zülpich	14-DE-NWBo-Smiz-Gr
	Gemüsehof Karl-Heinz Steiger	Bornheim- Waldorf	14-DE-NWBo-Steig-Gi
Nordrhein- Westfalen Walbeck (NWWa)	Franz Allofs	Geldern/Walbeck	14-DE-NWWa-All-Ba/Av
	Spargelhof Kisters	Geldern/Walbeck	14-DE-NWWa-Kis-Ba
	Heinrich und Marco Ketelaars	Goch-Hülm	14-DE-NWWa-Ket-Gi
Nordrhein- Westfalen (NW)	Spargel- u. Beerenanbau Winkelmann	Rahden	14-DE-NW-Win-Ba
	Josef Kemna	Dorsten	14-DE-NW-Kem-Ba
	Willi Kreienbaum	Sassenberg- Füchtorf	14-DE-NW-Krei-Gi
Niedersachsen (NI)	Spargelhof Heuer	Fuhrberg	14-DE-NI-Heu-Ba
	Dietrich Paul	Hoyerhagen	14-DE-NI-Pau-Ba
	Spargelhof Fritz Förthmann	Kirchdorf	14-DE-NI-For-Rps
Beelitz (BB)	Sven Hager, Schlag 18	Beelitz GT Klaistow	14-DE-BB-Hag18-?
	Sven Hager, Schlag 44	Beelitz GT Klaistow	14-DE-BB-Hag44-?
	Sven Hager, Schlag 87	Beelitz GT Klaistow	14-DE-BB-Hag87-?
Hessen (HE)	Meinhardt GmbH & Co. KG	Weiterstadt	14-DE-HE-Mei-Gr
	Georg Peter Merlau	Darmstadt	14-DE-HE-Mer-Hrk
	Andreas Lenhardt	Griesheim	14-DE-HE-Len-Gi
Rheinland-Pfalz (RP)	Gerhard H. Schulze	Weisenheim/ Sand	14-DE-RP-Sul-Ba
	Ralf Christ	Neustadt	14-DE-RP-Chr-Ba
	Michael & Trudel Zapf	Kandel	14-DE-RP-Zap-Gi/Rps
Baden- Württemberg Nord (BWN)	Südwestdt. Saat- zucht GmbH & Co. KG	Rastatt	14-DE-BWN-SWSZ-?
	Otmar Böser	Forst	14-DE-BWN-Bos-?
	Jörg Schreiber	Wiesental	14-DE-BWN-Srei-Gi

	Bruno Bohrer	Hartheim- Feldkirch	14-DE-BWS-Boh-Gi
Baden- Württemberg Süd (BWS)	Lang GBR	Freiburg	14-DE-BWS-Lan-Gi
	Gregor Schmid	Schlatt	14-DE-BWS-Smi-Gi
Schleswig- Holstein (SH)	Uwe Hardt, Flensburger Landspargel	Freienwill	14-DE-SH-Har-Ba
	Andreas Löding	Buchholz am Ratzeburger See	14-DE-SH-Lod-Ba
	Karl Schäfer	Wiemersdorf	14-DE-SH-Saf-Ba
	Karl Schäfer	Wiemersdorf	14-DE-SH-Saf-Gi

Tabelle 39: Probenkodierung Spargel Deutschland 2015

Regionen	Name	Ort	Abkürzungs-Code
Bayern	Andreas Siglechner	Hohenwart	15-DE-BYSr-Sig-Gi
Schrobenhausen (BYSr)	Johann Tyroller	Schrobenhausen	15-DE-BYSr-Tyr-Gr
	Paul Gamperl	Inchenhofen	15-DE-BYSr-Gam-Ba
	Paul Gamperl	Inchenhofen	15-DE-BYSr-Gam-Gi
	Paul Gamperl	Inchenhofen	15-DE-BYSr-Gam-Cu
Bayern Abensberg (BYAb)	Wolfgang Kügel	Sandharlanden	15-DE-BYAb-Kug-Gr
	Josef Gabelsberger	Offenstetten	15-DE-BYAb-Gab-Ba
	Wolfgang Schlaffer	Train/Neukirchen	15-DE-BYAb-Sla-Gi
Bayern Franken (BYFr)	Spargel-Erzeugerverband Franken e.V./Höfler	Nürnberg-Buch	15-DE-BYFr-ErzV-Gi
	Spargel-Erzeugerverband Franken e.V./Höfler	Nürnberg-Buch	15-DE-BYFr-ErzV-Ba
	Siegfried Zenk	Hausen	15-DE-BYFr-Zen-Rmd
	Hans Wolf	Prichsenstadt	15-DE-BYFr-Wol-Ba- Wie
	Hans Wolf	Prichsenstadt	15-DE-BYFr-Wol-Gr
Nordrhein- Westfalen Bornheim (NWBo)	Leonhard Palm (Biospargel)	Bornheim	15-DE-NWBo-Pal-Ba
	Raphael Schmitz	Zülpich	15-DE-NWBo-Smiz-Av
	Raphael Schmitz	Zülpich	15-DE-NWBo-Smiz-Gr
	Gemüsehof Karl-Heinz Steiger	Bornheim-Waldorf	15-DE-NWBo-Stei-Gr

9 Anhang

Nordrhein- Westfalen Walbeck (NWWa)	Franz Allofs	Geldern/Walbeck	15-DE-NWWa-All-Gi
	Spargelhof Kisters	Geldern/Walbeck	15-DE-NWWa-Kis-Gi
	Spargelhof Kisters	Geldern/Walbeck	15-DE-NWWa-Kis-Ba
	Heinrich und Marco Ketelaars	Goch-Hülm	15-DE-NWWa-Ket-Gi
Nordrhein- Westfalen (NW)	Spargel- und Beerenanbau Winkelmann	Rahden	15-DE-NW-Win-Cu
	Spargel- und Beerenanbau Winkelmann	Rahden	15-DE-NW-Win-Gi
	Spargel- und Beerenanbau Winkelmann	Rahden	15-DE-NW-Win-Ba
	Spargel- und Beerenanbau Winkelmann	Rahden	15-DE-NW-Win-Gr
	Josef Kemna	Dorsten	15-DE-NW-Kem-Ba
	Willi Kreienbaum	Sassenberg- Füchtorf	15-DE-NW-Krei-Gi
	Willi Kreienbaum	Sassenberg- Füchtorf	15-DE-NW-Krei-Gi???
	Willi Kreienbaum	Sassenberg- Füchtorf	15-DE-NW-Krei-Cu
Niedersachsen (NI)	Dietrich Paul	Hoyerhagen	15-DE-NI-Pau-Gi
	Beelitz (BB)	Elsholz	15-DE-BB-Els-Gi
Beelitz (BB)	Elsholz	Beelitz, OT Elsholz	15-DE-BB-Els-Ba
	Syring	Beelitz	15-DE-BB-Syr-Gi
	Syring	Beelitz	15-DE-BB-Syr-Gr
	Jakobs	Beelitz	15-DE-BB-Jak-Gi
	Hessen (HE)	Georg Peter Merlau	Darmstadt
Georg Peter Merlau		Darmstadt	15-DE-HE-Mer-Gr
Andreas Lenhardt		Griesheim	15-DE-HE-Len-Ba- Fla
Andreas Lenhardt		Griesheim	15-DE-HE-Len-Ba-Pfe
Andreas Lenhardt		Griesheim	15-DE-HE-Len-Gi

9 Anhang

	Andreas Lenhardt	Griesheim	15-DE-HE-Len-Gr
Rheinland-Pfalz (RP)	Gerhard H. Schulze	Weisenheim/Sand	15-DE-RP-Sul-Gi
	Gerhard H. Schulze	Weisenheim/Sand	15-DE-RP-Sul-Ba
	Gerhard H. Schulze	Weisenheim/Sand	15-DE-RP-Sul-Ba-2
	Ralf Christ	Neustadt	15-DE-RP-Chr-Ba
	Michael & Trudel Zapf	Kandel	15-DE-RP-Zap-Gi
Baden- Württemberg Nord (BWN)	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	15-DE-BWN-SWSZ-Gi
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	15-DE-BWN-SWSZ- Ba
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	15-DE-BWN-SWSZ-Gr
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	15-DE-BWN-SWSZ- Cu
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	15-DE-BWN-SWSZ- Rps
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	15-DE-BWN-SWSZ- Av
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	15-DE-BWN-SWSZ- Rmd
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	15-DE-BWN-SWSZ- Rfl
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	15-DE-BWN-SWSZ- Grv
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	15-DE-BWN-SWSZ- Rmr
	Jörg Schreiber	Wiesental	15-DE-BWN-Srei-Gi
Baden- Württemberg Süd (BWS)	Bruno Bohrer	Hartheim- Feldkirch	15-DE-BWS-Boh-Ba
	Bruno Bohrer	Hartheim- Feldkirch	15-DE-BWS-Boh-Gi
	Bruno Bohrer	Hartheim- Feldkirch	15-DE-BWS-Boh-Cu
	Lang GBR	Freiburg	15-DE-BWS-Lan-Gi
	Gregor Schmid	Schlatt	15-DE-BWS-Smi-Ba
	Gregor Schmid	Schlatt	15-DE-BWS-Smi-Gi

Schleswig-Holstein (SH)	Uwe Hardt, Flensburger Landspargel	Freienwill	15-DE-SH-Har-Gi
	Andreas Löding	Buchholz am Ratzeburger See	15-DE-SH-Lod-Gi
	Karl Schäfer	Wiemersdorf	15-DE-SH-Saf-Gi-I
	Karl Schäfer	Wiemersdorf	15-DE-SH-Saf-Gi-I-2
	Karl Schäfer	Wiemersdorf	15-DE-SH-Saf-Rmr-I
	Karl Schäfer	Wiemersdorf	15-DE-SH-Saf-Gi-II
	Karl Schäfer	Wiemersdorf	15-DE-SH-Saf-Gi-II-2
	Karl Schäfer	Wiemersdorf	15-DE-SH-Saf-Rmr-II
	Karl Schäfer	Wiemersdorf	15-DE-SH-Saf-Ba-II
	Karl Schäfer	Wiemersdorf	15-DE-SH-Saf-Gi-III
	Karl Schäfer	Wiemersdorf	15-DE-SH-Saf-Gi-IV

Tabelle 40: Probenkodierung Spargel Deutschland 2016

Region	Name	Ort	Abkürzungs-Code
Bayern Schrobenhausen (BYSr)	Claudia & Peter Westner	Kühbach	16-DE-BYSr-Wes-Gi
	Claudia & Peter Westner	Kühbach	16-DE-BYSr-Wes-Ba
	Claudia & Peter Westner	Kühbach	16-DE-BYSr-Wes-Cu
	Johann Tyroller	Schrobenhausen	16-DE-BYSr-Tyr-Gi
	Johann Tyroller	Schrobenhausen	16-DE-BYSr-Tyr-Gr
	Johann Tyroller	Schrobenhausen	16-DE-BYSr-Tyr-Ba
	Paul Gamperl	Inchenhofen	16-DE-BYSr-Gam-Gi
	Paul Gamperl	Inchenhofen	16-DE-BYSr-Gam-Ba
	Paul Gamperl	Inchenhofen	16-DE-BYSr-Gam-Cu
Bayern Abensberg (BYAb)	Wolfgang Kügel	Sandharlanden	16-DE-BYAb-Kug-Ba
	Wolfgang Kügel	Sandharlanden	16-DE-BYAb-Kug-Gr
	Josef Gabelsberger	Offenstetten	16-DE-BYAb-Gab-Ba
	Josef Gabelsberger	Offenstetten	16-DE-BYAb-Gab-Gi
	Wolfgang Schlaffer	Train/Neukirchen	16-DE-BYAb-Sla-Gi
	Wolfgang Schlaffer	Train/Neukirchen	16-DE-BYAb-Sla-Av
Bayern Franken (BYFr)	Spargel-Erzeugerverband Franken e.V./Höfler	Nürnberg-Buch	16-DE-BYFr-ErzV-Gi

	Spargel- Erzeugerverband Franken e.V./Höfler	Nürnberg-Buch	16-DE-BYFr-ErzV-Ba
	Siegfried Zenk	Hausen	16-DE-BYFr-Zen-Ba
	Hans Wolf	Prichsenstadt	16-DE-BYFr-Wol-Ba
	Hans Wolf	Prichsenstadt	16-DE-BYFr-Wol-Gi
	Hans Wolf	Prichsenstadt	16-DE-BYFr-Wol-Cu
	Hans Wolf	Prichsenstadt	16-DE-BYFr-Wol-Gr
Nordrhein- Westfalen Bornheim (NWBo)	Leonhard Palm	Bornheim	16-DE-NWBo-Pal-Ba
	Leonhard Palm	Bornheim	16-DE-NWBo-Pal-Gr
	Johannes Saß	Bornheim	16-DE-NWBo-Saß-Ba
	Johannes Saß	Bornheim	16-DE-NWBo-Saß-Gr
	Gemüsehof Karl-Heinz Steiger	Bornheim- Waldorf	16-DE-NWBo-Steig-Gr
Nordrhein- Westfalen Walbeck (NWWa)	Franz Allofs	Geldern/Walbeck	16-DE-NWWa-All-Gi
	Franz Allofs	Geldern/Walbeck	16-DE-NWWa-All-Ba
	Franz Allofs	Geldern/Walbeck	16-DE-NWWa-All-Gr
	Franz Allofs	Geldern/Walbeck	16-DE-NWWa-All-Cu
	Spargelhof Kisters	Geldern/Walbeck	16-DE-NWWa-Kis-Gi
	Spargelhof Kisters	Geldern/Walbeck	16-DE-NWWa-Kis-Cu/Av
	Spargelhof Kisters	Geldern/Walbeck	16-DE-NWWa-Kis-Ba
	Heinrich und Marco Ketelaars	Goch-Hülm	16-DE-NWWa-Ket-Rmr
	Heinrich und Marco Ketelaars	Goch-Hülm	16-DE-NWWa-Ket-He
Nordrhein- Westfalen (NW)	Spargel- und Beerenanbau Winkelmann	Rahden	16-DE-NW-Win-Gi
	Spargel- und Beerenanbau Winkelmann	Rahden	16-DE-NW-Win-Ba
	Spargel- und Beerenanbau Winkelmann	Rahden	16-DE-NW-Win-Gr

	Spargel- und Beerenanbau Winkelmann	Rahden	16-DE-NW-Win-Cu
	Josef Kemna	Dorsten	16-DE-NW-Kem-Ba
	Willi Kreienbaum	Sassenberg- Füchtorf	16-DE-NW-Krei-Ba
	Willi Kreienbaum	Sassenberg- Füchtorf	16-DE-NW-Krei-Gi
	Willi Kreienbaum	Sassenberg- Füchtorf	16-DE-NW-Krei-Cu
	Willi Kreienbaum	Sassenberg- Füchtorf	16-DE-NW-Krei-Gr
Niedersachsen (NI)	Spargelhof Heuer	Fuhrberg	16-DE-NI-Heu-Ba
	Spargelhof Heuer	Fuhrberg	16-DE-NI-Heu-Gi
	Dietrich Paul	Hoyerhagen	16-DE-NI-Pau-Gi
	Dietrich Paul	Hoyerhagen	16-DE-NI-Pau-Ba
	Spargelhof Fritz Förthmann	Kirchdorf	16-DE-NI-For-Gi
	Spargelhof Fritz Förthmann	Kirchdorf	16-DE-NI-For-Ba
	Spargelhof Fritz Förthmann	Kirchdorf	16-DE-NI-For-Cu
	Thiermann Gartenbaubetriebe GmbH & Co.Kg/Pohl	Kirchdorf	16-DE-NI-Thi-Gi
	Thiermann Gartenbaubetriebe GmbH & Co.Kg/Pohl	Kirchdorf	16-DE-NI-Thi-Ba
	Thiermann Gartenbaubetriebe GmbH & Co.Kg/Pohl	Kirchdorf	16-DE-NI-Thi-Gr
Thiermann Gartenbaubetriebe GmbH & Co.Kg/Pohl	Kirchdorf	16-DE-NI-Thi-Cu	
Beelitz (BB)	Elsholz	Beelitz, OT Elsholz	16-DE-BB-Els-Gr

	Elsholz	Beelitz, OT Elsholz	16-DE-BB-Els-Cu
	Elsholz	Beelitz, OT Elsholz	16-DE-BB-Els-?
	Elsholz	Beelitz, OT Elsholz	16-DE-BB-Els-Gi+Av
	Syring	Beelitz	16-DE-BB-Syr-Gr
	Jakobs	Beelitz	16-DE-BB-Jak-1
	Jakobs	Beelitz	16-DE-BB-Jak-2
	Jakobs	Beelitz	16-DE-BB-Jak-3
	Jakobs	Beelitz	16-DE-BB-Jak-4
Hessen (HE)	Meinhardt GmbH & Co. KG	Weiterstadt	16-DE-HE-Mei-Rfl
	Meinhardt GmbH & Co. KG	Weiterstadt	16-DE-He-Mei-Gr
	Meinhardt GmbH & Co. KG	Weiterstadt	16-DE-He-Mei-He
	Meinhardt GmbH & Co. KG	Weiterstadt	16-DE-He-Mei-Ba
	Georg Peter Merlau	Darmstadt	16-DE-HE-Mer-Ba
	Georg Peter Merlau	Darmstadt	16-DE-HE-Mer-He
	Andreas Lenhardt	Griesheim	16-DE-HE-Len-Ba
	Andreas Lenhardt	Griesheim	16-DE-HE-Len-Gr
	Andreas Lenhardt	Griesheim	16-DE-HE-Len-Gi
Rheinland-Pfalz (RP)	Gerhard H. Schulze	Weisenheim/ Sand	16-DE-RP-Sul-Ba/Gi
	Ralf Christ	Neustadt	16-DE-RP-Chr-Ba
	Michael & Trudel Zapf	Kandel	16-DE-RP-Zap-Cu
	Michael & Trudel Zapf	Kandel	16-DE-RP-Zap-Gi
	Michael & Trudel Zapf	Kandel	16-DE-RP-Zap-Ba
	Michael & Trudel Zapf	Kandel	16-DE-RP-Zap-Gr
Baden- Württemberg Nord	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	16-DE-BWN-SWSz-Av

(BWN)	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	16-DE-BWN-SWSz-Rvl
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	16-DE-BWN-SWSz-Rmd
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	16-DE-BWN-SWSz-Rmr
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	16-DE-BWN-SWSz-Rfl
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	16-DE-BWN-SWSz-Rps
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	16-DE-BWN-SWSz-Cu
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	16-DE-BWN-SWSz-Ba
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	16-DE-BWN-SWSz-Gi
	Südwestdeutsche Saatzucht GmbH & Co. KG	Rastatt	16-DE-BWN-SWSz-Gr
	Otmar Böser	Forst	16-DE-BWN-Bos-Ba
	Jörg Schreiber	Wiesental	16-DE-BWN-Srei-Gi
	Jörg Schreiber	Wiesental	16-DE-BWN-Srei-Ba
	Jörg Schreiber	Wiesental	16-DE-BWN-Srei-Gr
Baden- Württemberg Süd (BWS)	Bruno Bohrer	Hartheim- Feldkirch	16-DE-BWS-Boh-Gi
	Bruno Bohrer	Hartheim- Feldkirch	16-DE-BWS-Boh-Ba

	Bruno Bohrer	Hartheim- Feldkirch	16-DE-BWS-Boh-Cu
	Lang GBR	Freiburg	16-DE-BWS-Lan-Ba
	Gregor Schmid	Schlatt	16-DE-BWS-Smi-Ba
Schleswig- Holstein (SH)	Uwe Hardt, Flensburger Landspargel	Freienwill	16-DE-SH-Har-Ba
	Uwe Hardt, Flensburger Landspargel	Freienwill	16-DE-SH-Har-Gi
	Andreas Löding	Buchholz am Ratzeburger See	16-DE-SH-Lod-Ba
	Andreas Löding	Buchholz am Ratzeburger See	16-DE-SH-Lod-Gi
	Andreas Löding	Buchholz am Ratzeburger See	16-DE-SH-Lod-Gr
	Karl Schäfer	Wiemersdorf	16-DE-SH-Saf-Gi
	Karl Schäfer	Wiemersdorf	16-DE-SH-Saf-Ba

Tabelle 41: Probenkodierung Spargel Ausland 2014, 2015, 2016

Herkunftsland	Händler	Einkaufsort	Vertrieb	Abkürzungs-Code
Peru (PE)	Metro	Plöner Straße 8, 22769 Hamburg	Grower, Packer & Marketer, CAMPOSOL S. A., Lima, Peru	14-PE-HH-CAM-Met
	Aldi	Eiffestraße 406- 418, 20537 Hamburg	Grower, Packer and Exporter: AGUALIMA S.A.C.; Av. Del Porque Norte 605, Of. 203, Urban Corpac, San Isidro, Lima, Peru	15-PE-HH-AGU-Ald
	EDEKA Rinder- markthalle	Neuer Kamp 31, 20359 Hamburg	G, P and E: Sociedad Agricola Virú S.A. Trujillo	15-PE-HH-Soc-Ede
	Metro	Plöner Straße 8, 22769 Hamburg	Grower, Packer and Exporter: TAL S.A.; Address: Carr.	15-PE-HH-TAL-Met

			Industrial a Laredo KM 1.5, Trujillo, Perú	
Selgros	Tasköprüstraße 10, 22761 Hamburg	G, P and E: Sociedad Agricola Virú S.A. Trujillo		15-PE-HH-Soc-Sel
EDEKA	Grindelallee 126, 20146 Hamburg	Camposol Fresh B.V., Honderdland 94, 2676 Maasdijk, Holland, L-0707		16-PE-HH-Cam-Ede I
EDEKA	Hamburg-Nord, 32, Wiesendamm, 22305 Hamburg	Camposol Fresh B.V., Honderdland 94, 2676 Maasdijk, Holland, L-0707		16-PE-HH-Cam-Ede II
Fruchthaus	Hellkamp 22, 20255 Hamburg	TAL		16-PE-HH-TAL-Fru
Lale (Großmarkt)	Auf der Brandshofer Schleuse 4, 20097Hamburg	TAL		16-PE-HH-TAL-Lale
EDEKA	Hamburg-Nord, 32, Wiesendamm, 22305 Hamburg	AGUALIMA		16-PE-HH-AGU-Ede I
Kaufland	Stresemannstraße 300, 22761 Hamburg	Camposol Fresh B.V., Honderdland 94, 2676 Maasdijk, Holland, L-0707		16-PE-HH-Cam-Kau
Metro	Plöner Straße 8, 22769 Hamburg	Celestial, Sociedad Agricolo Viru		16-PE-HH-Cel-Met
Lale (Großmarkt)	Auf der Brandshofer Schleuse 4, 20097Hamburg	Celestial, Sociedad Agricolo Viru		16-PE-HH-Cel-Lale
EDEKA	Hamburg-Nord, 32, Wiesendamm, 22305 Hamburg	Celestial, Sociedad Agricolo Viru		16-PE-HH-Cel-Ede
Handelshof	Nartenstraße 31, 21079 Hamburg	Celestial, Sociedad Agricolo Viru		16-PE-HH-Cel-Han

Griechenland (GR)	Metro	Plöner Straße 8, 22769 Hamburg	Gaia, Hellas national trade mark	15-GR-HH-gai-Met
	Penny	Thielbek 8, 20355 Hamburg	Genossenschaft von Spargelproduzenten Nestos, 5km Cchrispoupolis- Keramotis-GR-64200 Chrisooupolis, Tel + 30 259610 62130, nestosp@otenet.gr, www. Asnestos.gr	15-GR-HH-Nes-Pen
	Aldi	Eiffestraße 406- 418, 20537 Hamburg	Genossenschaft von Spargelproduzenten Nea Karia	16-GR-HH-Nea-Ald
	Schlump- Markt	Gustav-Falke- Straße, 20144 Hamburg	k.A.	16-GR-HH-Slum-I
	Schlump- Markt	Gustav-Falke- Straße, 20144 Hamburg	k.A.	16-GR-HH-Slum-II
	EDEKA	Grindelallee 126, 20146 Hamburg	Packer: A:C: Acheloos, Neapoli Agriniou, 30100 Agrinio, Greece	16-GR-HH-bio-Ede
	Isemarkt	Isestraße, 20149 Hamburg	Kavala	16-GR-HH-Ise
	Netto	Grindelallee 154- 156, 20146 Hamburg	Gaia, Hellas national trade mark	16-GR-HH-gai-Net
	Lale (Großmarkt)	Grindelallee 144, 20146 Hamburg	k. A.	16-GR-HH-Lale
	Aldi	Grindelberg 27-31, 20144 Hamburg	Kavala	16-GR-HH-Kav-Ald
Avrasya	Eppendorfer Weg 80, 20259 Hamburg	Kavala	16-GR-HH-Kav-Avr	

	Markt Turmweg	Turmweg, 20148 Hamburg	k. A.	16-GR-HH-Turm
	Metro	Plöner Straße 8, 22769 Hamburg	Delta Spargel	16-GR-HH-Del-Met
	Metro	Plöner Straße 8, 22769 Hamburg	Coop	16-GR-HH-Coop-Met
	Metro	Plöner Straße 8, 22769 Hamburg	Eva Fruit	16-GR-HH-Eva-Met
	EDEKA Rindermarkt -halle	Neuer Kamp 31, 20359 Hamburg		16-GR-HH-Geno- EdeR
	Großmarkt	Auf der Brandshofer Schleuse 4, 20097Hamburg	Kessil's Bro	16-GR-HH-Kes-GroM
	Intermarché	Polen		16-GR-PL-Intm
Spanien (ES)	Selgros	Tasköprüstraße 10, 22761 Hamburg	Noval, 10391 Rosalejo (caceres), Spain	15-ES-HH-Noval-Sel
	Rewe	Altonaer Straße 67, 20357 Hamburg	Univeg Trade Spain, S. A., Unipersonal, Member of the UNIVEG Group, Avda. Cortes, Valencianas, 2-1, E- 46015 Valencia, Spain	15-ES-HH-Univeg- Rew
	Rewe	Ilmebahnstraße 7, 37586 Dassel- Markoldendorf	Univeg Trade Spain, S. A., Unipersonal, Member of the UNIVEG Group, Avda. Cortes, Valencianas, 2-1, E- 46015 Valencia, Spain	15-ES-Das-Univeg- Rew

	Rewe	Ilmebahnstraße 7, 37586 Dassel- Markoldendorf	Noval, 10391 Rosalejo (caceres), Spain	15-ES-Das-Noval-Rew
	Rewe	Ilmebahnstraße 7, 37586 Dassel- Markoldendorf	Univeg Trade Spain, S. A., Unipersonal, Member of the UNIVEG Group, Avda. Cortes, Valencianas, 2-1, E- 46015 Valencia, Spain	16-ES-HH-Uni-Rew
	Markt Turmweg	Turmweg, 20148 Hamburg	k. A.	16-ES-HH-Turm
	Selgros	Tasköprüstraße 10, 22761 Hamburg	GARCIA NARVAEZ	16-ES-HH-Gar-Sel
Polen (PL)	Wochenmar kt Neustadt	Neustadt, 01097 Dresden	k. A.	15-PL-DD-NA-WoM
	Markt Posen 1	k. A.	k. A.	16-PL-Pos-Mar-1
	Markt Posen 2	k. A.	k. A.	16-PL-Pos-Mar-2
	Markt Posen 3	k. A.	k. A.	16-PL-Pos-Mar-3
	Markt Posen 4	k. A.	k. A.	16-PL-Pos-Mar-4
	Zilona Gora, Netto	k. A.	k. A.	16-PL-Zil-nad-Net
	Zilona Gora, Lidl	k. A.	k. A.	16-PL-Zil-Aldi
	Straße zw. Posen u. Zilona Gora	k. A.	k. A.	16-PL-Pos/Zil
	Posen, Lidl	k. A.	k. A.	16-PL-Pos-Lidl
	k. A.	k. A.	k. A.	16-PL-Tom-Noc-Sta
	k. A.	k. A.	k. A.	16-PL-Tom-nad-Net

Niederlande (NL)	De Wit Asperges	Veghel	k. A.	16-NL-Veg-Cu
	Steenbergen Asperges	Berlicum	k. A.	16-NL-Ber-Mix
	Frank en Helma Ter Stege	Sint-Michielsgestel	k. A.	16-NL-StM-Mix
	Piet en Mieke van Iersel	Udenhout	k. A.	16-NL-Ude-Ba
	van Beek	Terheijden	k. A.	16-NL-Ter-Ba?
	Schalk	Prinsenbeek	k. A.	16-NL-Pri-Cu
	Koolen	Ossendrecht	k. A.	16-NL-Oss-He
	Beerten	Budel	k. A.	16-NL-Bud-Gi
	Jan en Mina Swinkels	Asten	k. A.	16-NL-Ast-?
	Verse Aspgerge (Super- markt)	Sevenum	Verse Aspgerge (Supermarkt)	16-NL-Sev-?

Tabelle 42: Verteilung der Spargelporben – Deutschland / Ausland 2014, 2015, 2016

Land	Gesamtanzahl Proben	2014	2015	2016
Deutschland	218	41	71	106
Niederlande	10			10
Polen	11		1	10
Spanien	7		4	3
Griechenland	18		2	16
Peru	15	1	4	10

Tabelle 43: Verteilung der Spargelproben – deutsche Probenahmeregionen 2014, 2015, 2016

Bundesland	Gesamtanzahl Proben	2014	2015	2016
Brandenburg	17	3	5	9

Baden-Württemberg	42	6	17	19
Bayern	45	10	13	22
Hessen	18	3	6	9
Niedersachsen	15	3	1	11
Nordrhein-Westfalen	48	9	16	23
Rheinland-Pfalz	13	3	4	6
Schleswig-Holstein	20	4	9	7

Tabelle 44: Verteilung der Spargelproben – deutsche Unterregionen 2014, 2015, 2016

Bundelsland-Unterregion	Gesamtanzahl Proben	2014	2015	2016
BWN	28	3	11	14
BWS	14	3	6	5
BYAb	12	3	3	6
BYFr	16	4	5	7
BYSr	17	3	5	9
NW	20	3	8	9
NWBo	12	3	4	5
NWWa	16	3	4	9

Tabelle 45: Beispielhaftes Metadatenblatt der Proben 16-DE-BYAb-Gab-Ba sowie 16-DE-BYAb-Gab-Gi

1. Allgemeine Angaben zum Erzeugerbetrieb

Name des Betriebes <u>Spargelhof Gabelsberger</u>	Ansprechpartner <u>Josef Gabelsberger</u>	
Straße, Hausnummer <u>Hofmark 32</u>	PLZ <u>93326</u>	Ort <u>Abensberg</u>
Email-Adresse <u>josef.gabelsberger@t-online.de</u>	Telefon-Nummer <u>09443/6447</u>	

Bundesland <u>Bayern</u>	Vorliegen einer geschützten geographischen Angabe <input checked="" type="checkbox"/> Ja und zwar <input type="checkbox"/> Nein <u>Abensberg</u>
Auf welcher Gesamtfläche bauen Sie Spargel an? Ha	
Welchen Betrag an Spargel ernten Sie ca. jährlich auf 1 ha (Bruttoangabe)? 4.5 t	

2. Angaben zur Probe

Um welche Sorte handelt es sich? <input checked="" type="checkbox"/> Gijnlim <input type="checkbox"/> Cumulus <input checked="" type="checkbox"/> Backlim <input type="checkbox"/> sonstige Sorte und zwar _____ <input type="checkbox"/> Grolim	
Welcher Anbauart unterliegt die Probe? <input checked="" type="checkbox"/> konventionell <input type="checkbox"/> biologisch	
Wie wurde der Spargel geerntet? <input checked="" type="checkbox"/> per Hand <input type="checkbox"/> Erntemaschine (Spargelvollernter)	
Wie wurde der Spargel nach der Ernte gekühlt? <input type="checkbox"/> Schockbecken bei °C <input checked="" type="checkbox"/> Schockschrank 1 h bei 3 °C <input type="checkbox"/> Durchlaufkühlung _____ h bei _____ °C <input type="checkbox"/> Wasserzwischenlagerung in Brunnen/Leitungswasser; _____ h bei _____ °C <input type="checkbox"/> andere Methode und zwar _____	
Wurde der Spargel gewaschen und gebürstet? <input checked="" type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein	

3. Angaben zum Standort

Schlagbezeichnung für das Feld der Probenahme <u>Ba: Pfarrpfründe 2, Gi: Feldstadel</u>
Wie groß ist das Feld auf dem der zu beprobende Spargel geerntet wurde? <u>Ba: 1.6 ha, Gi: 1.4 ha</u>
Wann erfolgte die Neuanlage der Kultur? Jahr Ba: <u>2011</u> ; Gi: <u>2009</u>

Wie wurde der Standort vor der Neuanlage der Spargelkultur genutzt (Angabe vorher kultivierter Pflanzen soweit bekannt, wenn möglich unter Angabe der Jahreszahlen)?		
1. Roggen von _____ Jahr bis _____ Jahr	2. _____ von _____ Jahr bis _____ Jahr	3. _____ von _____ Jahr bis _____ Jahr
Wurde auf dem Feld bereits schon einmal Spargel angebaut?		
<input type="checkbox"/> Ja <input checked="" type="checkbox"/> Nein		
Auf welcher Bodenart wird der Spargel angebaut?		
<input checked="" type="checkbox"/> Sand	<input type="checkbox"/> sandiger Lehm	<input type="checkbox"/> lehmiger Sand
<input type="checkbox"/> toniger Sand	<input type="checkbox"/> sandiger Ton	<input type="checkbox"/> sonstige und zwar _____
Welche Pflanzdichte wurde bei der Neuanlage verwendet?		
<u>Ba, Gi</u> : 4, 3 Pflanzen/m oder _____ Pflanzen/ha		
Welcher Reihenabstand wurde bei der Neuanlage verwendet?		
<u>2.00</u> m		
Im welcher Himmels-Ausrichtung sind die Reihen angelegt?		
<input type="checkbox"/> Nord/Süd <input checked="" type="checkbox"/> West/Ost		
Welches Maß beträgt die Dammhöhe und die Dammbreite?		
<u>0.40</u> m Dammhöhe <u>0.45</u> m Dammbreite		

4. Angaben zur Erntesteuerung

Welches Kulturverfahren wurde auf dem Feld der entnommenen Proben angewandt?	
<input checked="" type="checkbox"/> Einfachabdeckung: schwarz-weiße Taschenfolie <input type="checkbox"/> Doppelabdeckung: Thermoextrabreit flach mit schwarz/weißer Taschenfolie <input type="checkbox"/> Doppelabdeckung: Klein-/Minitunnel mit Thermoextrabreit auf schwarz/weißer Taschenfolie	<input type="checkbox"/> Doppelabdeckung: schwarz/weiße Taschenfolie m mit Vlies/ Lochfolie <input type="checkbox"/> Dreifachabdeckung: Klein/Minitunnel mit Thermoextrabreit in Kombination mit schwarz/weißer Taschenfolie und Lochfolie <input type="checkbox"/> sonstiges und zwar _____
Wurde eine Bodenheizung verwendet?	
<input type="checkbox"/> Ja <input checked="" type="checkbox"/> Nein	
Wurde im Vorjahr bewässert?	
<input type="checkbox"/> Ja <input checked="" type="checkbox"/> Nein	

5. Angaben zur Düngung

Bitte geben Sie die verwendete Menge an Düngemittel für das Wirtschaftsjahr (Juli 2104 - Juni 2015) sowie die Art des Düngers bzw. den Handelsnamen für das Feld der Probenahme

an. (<u>Diese Angaben können auch gerne als Kopie der Schlagdokumentation diesem Fragebogen beigefügt werden</u>).			
1. Ba, Gi: Entec 15/5/20	Menge 500 kg/ha	6. _____	Menge _____ kg/ha
2. Ba, Gi: Kali Magnesia	Menge 400 kg/ha	7. _____	Menge _____ kg/ha
3. Ba: Kalk Stickstoff	Menge 250 kg/ha	8. _____	Menge _____ kg/ha
4.	Menge _____ kg/ha	9. _____	Menge _____ kg/ha
5.	Menge _____ kg/ha	10. _____	Menge _____ kg/ha
Wurde nach der letzten Ernteperiode eine Fahrgassenbegrünung ausgesät?			
<input type="checkbox"/> Ja und zwar _____		<input type="checkbox"/> Nein	

6. Angaben zum Pflanzenschutz

Welche Pflanzenschutzmittel (Insektizide, Fungizide, Herbizide,...) wurden im Wirtschaftsjahr (Juli 2014 - Juni 2015) auf dem Feld der Probenahme verwendet? Nennen Sie bitte den Handelsnamen bzw. den Wirkstoff sowie die verwendeten Mengen. (<u>Diese Angaben können auch gerne als Kopie der Schlagdokumentation diesem Fragebogen beigefügt werden</u>).			
1. Ba, Gi: Perfekthion	Menge 0.6 L/ha	6. Ba, Gi: Fusilade	Menge 1.5 kg/ha
2. Ba, Gi: Amistar Opti	Menge 5 L/ha; Gi: 2.5 L/ha	7. Ba, Gi: Switch	Menge 0.8 kg/ha
3. Ba, Gi: Cuprozin	Menge 4 kg/ha Gi: 2kg/ha	8. Ba, Gi: Score	Menge 0.4 kg/ha
4. Ba, Gi: Sencor	Menge 0.4 kg/ha	9. Gi: Delan	Menge 0.8 kg/ha
5. Ba, Gi: Lentagran	Menge 1.5 kg/ha	10. Ba, Gi: Kumar	Menge 3 kg/ha
		11. Gi: Rovral	Menge 0.7 kg/ha

7. Angaben zur Beschaffenheit des Bodens der Probenahme

Wann wurde die letzte Bodenuntersuchung durchgeführt? Monat/Jahr <u>06/2014</u> Bitte legen Sie eine Kopie der Analyseergebnisse diesem Fragebogen bei.

8. Kommentare, Fragen und Anmerkungen

9 Anhang

Feld für Barcode-Spargelproben		
Name des Betriebes <u>Spargelhof Gabelsberger</u>		
Datum der Abholung 27.05.2016	Uhrzeit 15 Uhr	Probenehmer B. Richter, E. Rottmann, J. Klare
GPS-Daten (Spargelhof) N 48°48'13.3" E 11°54'20.5"		

Datum des Spargelabstichs <u>Ba, Gi: 27.05.2016; Ba: 9 Uhr, Gi: 12 Uhr</u>	
Lagerung bis zur Abholung Zeit <u>Vorwäsche, Schock, Kühlhaus</u> Temperatur, <u>Luftfeuchtigkeit</u> -	
Probenmenge _____ kg	
Gewicht von 20 Stangen mit einer Länge von 15 cm _____ g	

9.3 Entsorgung

Tabelle 46: Entsorgungs- und Sicherheitshinweise der verwendeten Substanzen (Nations, 2019)

Substanz	GHS	H-Sätze	P-Sätze	Entsorgung
Acetonitril	02, 07	225, 319, 302+312+3 32	210, 305+351+338, 403+235	E4
Bromphenolblau	-	-	-	E5
Coomassie-Brillant-Blau G-250	-	-	-	In Wasser Lösen, Ansäuern, E1
Deuteriumoxid	-	-	-	E1
Dikaliumhydrogenphosphat (Trihydrat)	-	-	-	In Wasser Lösen, Ansäuern, E1
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	-	-	-	In Wasser Lösen, Ansäuern, E1
Essigsäure (Eisessig)	02, 05	226, 314	210, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338	Mit Wasser Verdünnen, E1
Ethanol	02, 07	225, 319	210, 240, 305+351+338, 403+233	E4
Ethylendiamintetraessigsäure	07	319	305+351+338	In Wasser Lösen, E1
Formaldehyd	06, 05, 08	301+311+3 31, 314, 317, 335, 341, 350, 370	201, 260, 280, 301+310, 330, 303+361+353, 304+340, 310, 305+351+338, 308+310, 403+233	E4
Glutardialdehyd	05, 06, 08, 09	301, 330, 314, 317, 334, 335, 400, 411	260, 280, 304+340, 310, 305+351+338, 403+233	E4

9 Anhang

Substanz	GHS	H-Sätze	P-Sätze	Entsorgung
Glycerin	-	-	-	In Wasser Lösen, Ansäuern, E1
<i>n</i> -Hexan	02, 07, 08, 09	225, 304, 361f, 373, 315, 336, 411	210, 240, 273, 301, 310, 331, 302+352, 403+235	E4
Kaliumchlorid	-	-	-	In Wasser Lösen, Verdünnen, E1
Kaliumdihydrogenphosphat	-	-	-	In Wasser Lösen, Ansäuern, E1
2-Mercaptoethanol	06, 05, 08, 09	301+331, 310, 315, 317, 318, 361f, 373, 410	273, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+310	E3 / E4
Methanol	02, 06, 08	225, 301, 311, 331, 370	210, 233, 260, 280, 301+310, 302+352, 304+340, 307+311, 308+310, 403+235	E5
Methanol- <i>d</i> ₄	02, 06, 08	225, 301, 311, 331, 370	210, 233, 260, 280, 301+310, 302+352, 304+340, 307+311, 308+310, 403+235	E5
Natriumacetat	07, 08	302, 315, 319, 332, 371	-	In Wasser Lösen, E1

9 Anhang

Substanz	GHS	H-Sätze	P-Sätze	Entsorgung
Natriumazid	06, 08, 09	300+310+3 30, 373, 410	262, 273, 280, 301+310+330, 302+352+310, 340+310	In Wasser Lösen, E1
Natriumcarbonat	07	319	260, 305+351+338	In Wasser Lösen, Ansäuern, E1
Natriumchlorid	-	-	-	In Wasser Lösen, Ansäuern, E1
Natriumdeuteriooxid	05	290, 314	280, 301+30+331, 305+351+338, 308+310	In Wasser Lösen, Neutralisieren , E3
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	-	-	-	In Wasser Lösen, Ansäuern, E1
Natriumdodecylsulfat	02, 05, 07	228, 302+332, 315, 318, 335, 412	210, 261, 280, 301+312+330, 305+351+338+310 , 370+378	E4
Natriumhydrogencarbonat	-	-	-	In Wasser Lösen, Ansäuern, E1
Natriumthiosulfat	-	-	-	In Wasser Lösen, Ansäuern, E1
Natriumtrimethylsilylpropionat , deuteriert	07	315, 319, 335	261, 305+351+338	Ansäuern, E1
Phosphorsäure	05	314, 290	280, 301+330+331, 305+351+338, 309+310	Verdünnen, Neutralisieren , E1
Pyronin Y	-	-	-	E5
Rinderserumalbumin (BSA)	-	-	-	Ansäuern, E1

Substanz	GHS	H-Sätze	P-Sätze	Entsorgung
Saccharose	-	-	-	In Wasser Lösen, E1
Salzsäure-d ₁	05, 07	290, 314, 335	260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338	Verdünnen, Neutralisieren, E1
Silbernitrat	03, 05, 09	272, 290, 314, 410	210, 220, 260, 280, 305+351+338, 370,+378, 308+310	E2
Stickstoff, flüssig	04	280	403	Ausgasen
Tetramethylsilan	02	224	210	Ansäuern, E1
Trockeneis (CO ₂)	04	280	403	Ausgasen

Entsorgungsschlüssel:

E1 = Behälter für andere Säuren

E2 = Behälter für andere Säuren (nitrathaltig)




E3 = Behälter für andere Basen







E4 = Behälter für halogenfreie organische Lösungsmittel

E5 = Behälter für halogenhaltige organische Lösungsmittel

E6 = Behälter für kontaminierte Betriebsmittel

Tabelle 47: Kodierung und Bedeutung der GHS-Symbole (Nations, 2019)

Kodierung	Piktogramm	Gefahrenklasse
GHS01		<p>Explosive Stoffe/Gemische und Erzeugnisse mit Explosivstoff:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Instabil, explosiv • Unterklassen 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 <p>Selbstzersetzliche Stoffe und Gemische, Typ A</p> <p>Selbstzersetzliche Stoffe und Gemische, Typ B (+ Piktogramm GHS02)</p> <p>Organische Peroxide, Typ A</p> <p>Organische Peroxide, Typ B (+ Piktogramm GHS02)</p>
GHS02		<p>Entzündbare Gase, Gefahrenkategorie 1</p> <p>Aerosole, Gefahrenkategorien 1, 2</p> <p>Entzündbare Flüssigkeiten, Gefahrenkategorien 1, 2, 3</p> <p>Entzündbare Feststoffe, Gefahrenkategorien 1, 2</p> <p>Selbstzersetzliche Stoffe und Gemische, Typen B (+ Piktogramm GHS01), C, D, E, F</p> <p>Pyrophore Flüssigkeiten, Gefahrenkategorie 1</p> <p>Pyrophore Feststoffe, Gefahrenkategorie 1</p> <p>Selbsterhitzungsfähige Stoffe und Gemische, Gefahrenkategorien 1, 2</p> <p>Stoffe und Gemische, die in Berührung mit Wasser entzündbare Gase entwickeln, Kategorien 1, 2, 3</p> <p>Organische Peroxide, Typen B (+ Piktogramm GHS01), C, D, E, F</p> <p>Stoffe und Gemische, die in Berührung mit Wasser entzündbare Gase abgeben, Gefahrenkategorien 1, 2, 3</p>
GHS03		<p>Oxidierende Gase, Kategorie 1</p> <p>Oxidierende Flüssigkeiten, Kategorien 1, 2, 3</p> <p>Oxidierende Feststoffe, Kategorien 1, 2, 3</p>

GHS04		<p>Gase unter Druck:</p> <ul style="list-style-type: none"> • verdichtete Gase • verflüssigte Gase • tiefgekühlt verflüssigte Gase • gelöste Gase
GHS05		<p>Korrosiv gegenüber Metallen, Kategorie 1</p> <p>Ätz-/Reizwirkung auf die Haut Kategorien, 1A, 1B, 1C</p> <p>Schwere Augenschädigung/Augenreizung, Kategorie 1</p>
GHS06		<p>Akute Toxizität (oral, dermal, inhalativ), Kategorien 1, 2, 3</p>
GHS07		<p>Akute Toxizität (oral, dermal, inhalativ), Kategorie 4</p> <p>Reizwirkung auf die Haut, Kategorie 2</p> <p>Schwere Augenreizung, Kategorie 2</p> <p>Sensibilisierung der Haut, Kategorien 1, 1A und 1B</p> <p>Spezifische Zielorgan-Toxizität (einmalige Exposition), Kategorie 3</p> <p>Atemwegsreizung, Kategorie 3</p> <p>Narkotisierende Wirkung</p> <p>Die Ozonschicht schädigend, Kategorie 1</p>
GHS08		<p>Sensibilisierung der Atemwege, Kategorien 1, 1A und 1B</p> <p>Keimzellmutagenität, Kategorien 1A, 1B, 2</p> <p>Karzinogenität, Kategorien 1A, 1B, 2</p> <p>Reproduktionstoxizität, Kategorien 1A, 1B, 2</p> <p>Spezifische Zielorgan-Toxizität (einmalige Exposition), Kategorien 1, 2</p> <p>Spezifische Zielorgan-Toxizität (wiederholte Exposition), Kategorien 1, 2</p> <p>Aspirationsgefahr, Kategorie 1</p>
GHS09		<p>Gewässergefährdend</p> <ul style="list-style-type: none"> • akut gewässergefährdend: Kategorie 1 • Langfristig gewässergefährdend (chronisch): Kategorien 1, 2

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Europäisches Gütezeichen für eine geschützte Ursprungsbezeichnung (g. U.) (European Commission, 2020a).....	8
Abbildung 2: Europäisches Gütezeichen für eine geschützte geografische Angabe (g. g. A.) (European Commission, 2020a).....	8
Abbildung 3: Europäisches Gütezeichen für eine garantiert traditionelle Spezialität (g. t. S.) (European Commission, 2020a).....	9
Abbildung 4: Die Inhaltsstoffe des Spargels (Souci <i>et al.</i> , 2008).....	14
Abbildung 5: Rhizom, Blätter, Blüten und Früchte des weißen Spargels (Masclef, 1987).....	16
Abbildung 6: Eine durchgewachsene Spargelpflanze (Quartier Christ, 2011).....	16
Abbildung 7: Die <i>Omics</i> -Kaskade und die Beeinflussbarkeit der einzelnen <i>Omics</i> -Disziplinen (Protein: Dambrot, 2014; Strukturen: ChemSketch, 2020; Elemente: CHEMISTRY GLOSSARY, 2020).....	18
Abbildung 8: Anzahl der jährlichen Publikationen bei der Stichwortsuche im PubMed „NMR and <i>metabolomics</i> “ (blau), „MS and <i>metabolomics</i> “ (grün) und „NMR and MS and <i>metabolomics</i> “ (rot) (Marshall, Powers, 2017).....	28
Abbildung 9: Pulssequenz des 1D- ¹ H-NOESY-Experiments.....	33
Abbildung 10: Zeile 1: Berechnung der Datenmatrix bestehend aus der Anzahl der Proben sowie deren Bestimmungen und den gemessenen Datenpunkten pro Probe; Zeile 2: Berechnung der Datenmatrix bestehend aus der Anzahl der Proben sowie deren Bestimmungen und der Anzahl der <i>buckets</i>	38
Abbildung 11: <i>Scores plot</i> einer Hauptkomponentenanalyse.....	40
Abbildung 12: <i>Explained variance</i> einer Hauptkomponentenanalyse.....	40
Abbildung 13: <i>Influence plot</i> einer Hauptkomponentenanalyse.....	41
Abbildung 14: <i>Loadings Plot</i> einer Hauptkomponentenanalyse.....	42
Abbildung 15: <i>Confusion matrix</i> einer Lungenkrebsstudie (rot = Falschzuordnungen; grün = Korrektzuordnungen) (Adetiba, Olugbara, 2015).....	46
Abbildung 16: <i>importance plot</i> deutscher Spargelproben (orange = importance; violett, grün, rot, blau = Spektren aus unterschiedlichen Bundesländern).....	47
Abbildung 17: <i>boruta plot</i> eines Testdatensatzes mit 20 Variablen (Engelhardt, 2020).....	48
Abbildung 18: <i>box plot</i> eines Testdatensatzes mit vier unterschiedlichen Gruppen (Seaborn, 2020).....	48
Abbildung 19: 1D- ¹ H-NOESY-Spektrum einer deutschen Spargelprobe (15-DE-RP-Sul-Gi-3); Anwendung der Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7, Tabelle 31).....	52
Abbildung 20: Strukturformel von Natriumtrimethylsilylpropionat (TMSP) (ChemSketch, 2020).....	52

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 21: Zweidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2: deutsche Spargelproben aller drei Jahrgänge 2014 (schwarz), 2015 (hellblau) und 2016 (dunkelblau)	60
Abbildung 22: Zweidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2: Bestimmung der optimalen Gefriertrocknungsdauer des Spargels („24 R 24 A“ = schwarz; „48 R 24 A“= blau; „48 R 48 A“ = grün; „96 A“ = rot). Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung angefertigt	63
Abbildung 23: 1D- ¹ H-NOESY-Spektren der Spargelextrakte (aus einer Mischprobe) aus 100 % Acetonitril bei unterschiedlichen Trocknungsmethoden; von oben nach unten: Metallblockthermostat, Gefriertrocknungsanlage mit Tellereinsatz, Gefriertrocknungsanlage mit Trockenrechen.....	66
Abbildung 24: 1D- ¹ H-NOESY-Spektren der Spargelextrakte (aus einer Mischprobe) aus 66 % Acetonitril und 33 % Methanol bei unterschiedlichen Trocknungsmethoden; von oben nach unten: Metallblockthermostat, Gefriertrocknungsanlage mit Tellereinsatz, Gefriertrocknungsanlage mit Trockenrechen	66
Abbildung 25: 1D- ¹ H-NOESY-Spektren der Spargelextrakte (aus einer Mischprobe) aus 50 % Acetonitril und 50 % Methanol bei unterschiedlichen Trocknungsmethoden; von oben nach unten: Gefriertrocknungsanlage mit Tellereinsatz, Gefriertrocknungsanlage mit Trockenrechen	67
Abbildung 26: 1D- ¹ H-NOESY-Spektren der Spargelextrakte (aus einer Mischprobe) aus 33 % Acetonitril und 66 % Methanol bei unterschiedlichen Trocknungsmethoden; von oben nach unten: Gefriertrocknungsanlage mit Tellereinsatz, Gefriertrocknungsanlage mit Trockenrechen	67
Abbildung 27: 1D- ¹ H-NOESY-Spektren der Spargelextrakte (aus einer Mischprobe) aus 100 % Methanol nach der Trocknung mittels Gefriertrocknungsanlage mit Trockenrechen ..	68
Abbildung 28: 1D- ¹ H-NOESY-Spektren der Spargelextrakte (aus einer Mischprobe) aus verschiedenen Lösungsmittelkombinationen bei der Trocknung mittels Gefriertrocknungsanlage und Trockenrechen (Anteil Acetonitril von oben nach unten sinkend / Methanol steigend).....	69
Abbildung 29: 1D- ¹ H-NOESY-Spektren der Extrakte einer Mischprobe mit sechs verschiedenen Puffersystemen; 1-4 Natriumhydrogenphosphat, 5-8 Kalium-Natriumhydrogenphosphat, 9-12 Kaliumhydrogenphosphat, 1/2 + 5/6 + 9/10 ohne EDTA, 3/4 + 7/8 + 11/12 mit EDTA	75
Abbildung 30: 1D- ¹ H-NOESY-Spektren der Spargelextrakte aus zwei verschiedenen Puffersystemen; 1-6 Natriumhydrogenphosphat, 7-12 Kaliumhydrogenphosphat, 1/7: 14-DE-BWS-Smi-Gi, 2/8: 14-DE-SH-Saf-Gi, 3/9: 14-DE-BYSr-Gam-Gi, 4/10: 14-DE-BWS-Lan-Gi, 5/11: 14-DE-BYAb-Kug-Gr, 6/12: 14-DE-SH-Har-Ba	76

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 31: 1D- ¹ H-NOESY-Spektren der Spargelextrakte aus zwei verschiedenen hochkonzentrierten Kaliumhydrogenphosphatpuffersystemen; 1-12 200 mM Puffer, 13-24 1,000 mM Puffer, 1/2 + 13/14: 14-DE-BWS-Smi-Gi, 3/4 + 15/16: 14-DE-SH-Saf-Gi, 5/6 + 17/18: 14-DE-BYSr-Gam-Gi, 7/8 + 19/20: 14-DE-BWS-Lan-Gi, 9/10 + 21/22: 14-DE-BYAb-Kug-Gr, 11/12 + 23/24: 14-DE-SH-Har-Ba	78
Abbildung 32: 1D- ¹ H-NOESY-Spektren der Spargelextrakte aus zwei unterschiedlich hochkonzentrierten Kaliumhydrogenphosphatpuffersystemen; 1-12 100 mM Puffer result., 13-24 50 mM Puffer result., 1/2 + 13/14: 14-DE-BWS-Smi-Gi, 3/4 + 15/16: 14-DE-SH-Saf-Gi, 5/6 + 17/18: 14-DE-BYSr-Gam-Gi, 7/8 + 19/20: 14-DE-BWS-Lan-Gi, 9/10 + 21/22: 14-DE-BYAb-Kug-Gr, 11/12 + 23/24: 14-DE-SH-Har-Ba	80
Abbildung 33: 1D- ¹ H-NOESY-Spektren eines Spargelprobenextraktes (aus einer Mischprobe) nach Aufarbeitungsmethode 1, gemessen in definierten zeitlichen Abständen; Proben von oben nach unten: Tag 0, Tag 1, Tag 2, Tag 6, Tag 8 (Messreihe 1)	83
Abbildung 34: 1D- ¹ H-NOESY-Spektren eines Spargelprobenextraktes (aus einer Mischprobe) nach Aufarbeitungsmethode 2, gemessen in definierten zeitlichen Abständen; Proben von oben nach unten: Tag 0, 10 Stunden, Tag 1, Tag 2, Tag 3, Tag 4, Tag 5, Tag 6, Tag 7 (Messreihe 2)	84
Abbildung 35: Graphische Darstellung der Messwerte aus Tabelle 9	86
Abbildung 36: Zweidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2: Spargelproben aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot), alle Jahrgänge, alle Sorten	89
Abbildung 37: PLS-DA von Spargelproben aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot), alle Jahrgänge, alle Sorten.....	91
Abbildung 38: Zweidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2: Spargelproben der Sorte <i>Gijnlim</i> aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot), alle Jahrgänge	92
Abbildung 39: PLS-DA von Spargelproben der Sorte <i>Gijnlim</i> aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot), alle Jahrgänge	93
Abbildung 40: Zweidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2: Spargelproben der Sorte <i>Gijnlim</i> des Erntejahres 2015 aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot)...	95
Abbildung 41: Zweidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2: Spargelproben der Sorte <i>Gijnlim</i> des Erntejahres 2016 aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot)...	96

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 42: PLS-DA von Spargelproben der Sorte <i>Gijnlim</i> des Erntejahres 2015 aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot).....	97
Abbildung 43: PLS-DA von Spargelproben der Sorte <i>Gijnlim</i> des Erntejahres 2016 aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot).....	98
Abbildung 44: Zweidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2: Spargelproben der Sorte <i>Gijnlim</i> des Erntejahres 2015 aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot), inkl. Ernteperiode-abdeckende Proben.....	100
Abbildung 45: PLS-DA von Spargelproben der Sorte <i>Gijnlim</i> des Erntejahres 2015 aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein, Niedersachsen = blau) und Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen = rot); inkl. Ernteperiode-abdeckende Proben	101
Abbildung 46: Dreidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2/PC3: Spargelproben aus Deutschland (schwarz), Niederlande (grün), Polen (hellgrün), Spanien (ocker), Griechenland (orange), Peru (rot), aus den Jahren 2014, 2015 und 2016, alle Sorten	103
Abbildung 47: Dreidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2/PC3: deutsche (schwarz), niederländische (grün), polnische (hellgrün), spanische (ocker), griechische (orange) und peruanische (rot) Spargelproben der Jahrgänge 2015 und 2016, alle Sorten	104
Abbildung 48: <i>confusion matrix</i> der <i>random forest</i> -Klassifikation aller Spargelproben aus Deutschland (DE), Polen (PL), den Niederlanden (NL), Spanien (ES), Griechenland (GR) und Peru (PE) aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten; rechts: richtig positive (obenstehend) sowie falsch negative (untenstehend) <i>accuracy rates</i>	106
Abbildung 49: <i>confusion matrix</i> der <i>random forest</i> -Klassifikation aller Spargelproben aus Deutschland (DE), Polen (PL), den Niederlanden (NL), Spanien (ES), Griechenland (GR) und Peru (PE) aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten; rechts: richtig positive (obenstehend) sowie falsch negative (untenstehend) <i>accuracy rates</i> (<i>Nested-Cross-Validation</i> ; 10-fache interne Validierung; <i>SMOTE-Oversampling</i> ; <i>boruta</i>).....	108
Abbildung 50: Zweidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2: Spargelproben aus Deutschland (schwarz), Niederlande (grün), Polen (hellgrün) aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten	109
Abbildung 51: <i>Confusion matrix</i> der <i>random forest</i> -Klassifikation von deutschen (DE), benachbarten (NB = <i>Neighbours</i>), mediterranen (MT = <i>Mediterranean</i>) und peruanischen (OS = <i>Oversea</i>) Spargelproben aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten; rechts: richtig positive (obenstehend) sowie falsch negative (untenstehend) <i>accuracy rates</i>	112

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 52: Dreidimensionale PCA der Komponenten PC1/PC2/PC3: Spargelproben aus Deutschland (schwarz), Ausland (rot) aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten	113
Abbildung 53: <i>Confusion matrix</i> der <i>random forest</i> -Klassifikation von deutschen (DE) und ausländischen (FC = foreign country) Spargelproben aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten; rechts: richtig positive (obenstehend) sowie falsch negative (untenstehend) <i>accuracy rates</i>	114
Abbildung 54: <i>Importance plot</i> der 1D- ¹ H-NOESY-Spektren deutscher und peruanischer Spargelproben, aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten	117
Abbildung 55: <i>Boruta plot</i> zur Darstellung der <i>importances</i> der relevanten <i>buckets</i> einer deutsch-peruanischen <i>random forest</i> -Klassifikation, aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten; rot markiertes Feld = Ausschnitt siehe Abbildung 56	118
Abbildung 56: Ausschnitt aus dem <i>boruta plot</i> aus Abbildung 55, rot markiertes Feld = korrelierende <i>buckets</i>	118
Abbildung 57: <i>Confusion matrix</i> der <i>random forest</i> -Klassifikation von deutschen (DE) und peruanischen (PE) Spargelproben anhand der <i>buckets</i> 6.84 ppm und 7.17 ppm, aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten; rechts: richtig positive (obenstehend) sowie falsch negative (untenstehend) <i>accuracy rates</i>	119
Abbildung 58: <i>Box plot</i> des <i>buckets</i> bei 6.84 ppm für die Unterscheidung von peruanischen und deutschen Spargelproben, aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten; Intensitäten logarithmiert	120
Abbildung 59: <i>Box plot</i> des <i>buckets</i> bei 7.17 ppm für die Unterscheidung von peruanischen und deutschen Spargelproben, aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten; Intensitäten logarithmiert	121
Abbildung 60: 1D- ¹ H-NOESY-Spektrum einer deutschen Spargelprobe (15-DE-RP-Sul-Ba-2)	122
Abbildung 61: Ausschnitt eines JRES-Spektrums einer peruanischen Spargelprobe (16-PE-HH-TAL-Fru)	123
Abbildung 62: Ausschnitt eines TOCSY-Spektrums einer peruanischen Spargelprobe (16-PE-HH-TAL-Fru).....	124
Abbildung 63: Strukturformel von L-Tyrosin (ChemSketch, 2020).....	125
Abbildung 64: ¹ H-NMR-Spektrum einer 0.5 mM L-Tyrosin-Probe (in 50 mM Natriumphosphatpuffer, 100 % D ₂ O, 0.1 % DSS, 500 μM Natriumazid, pH=7.7, 298 K) (HMDB L-Tyrosin, 2020).....	125
Abbildung 65: 1D- ¹ H-NOESY-Spektren des Dotierungsexperiments einer peruanischen Spargelprobe (15-PE-HH-TAL-Fru): A Probe ohne Dotierung; B Probe dotiert mit L-Tyrosin (0.03 mM L-Tyrosin / 50 % Methanol- <i>d</i> ₄ + 50 % deut. Kaliumhydrogenphosphatpuffer;	

IV Abbildungsverzeichnis

Extraktion nach Tabelle 31); C Standardprobe L-Tyrosin (50 % Methanol- d_4 + 50 % deut. Kaliumhydrogenphosphatpuffer).....	127
Abbildung 66: Aufbau einer Soxhlet-Apparatur (Freie Universität Berlin, 2006)	186
Abbildung 67: Schema zur Probenkodierung deutscher und ausländischer Spargelproben.....	187
Abbildung 68: <i>Importance plot</i> der 1D- ^1H -NOESY-Spektren deutscher und polnischer Spargelproben.....	188
Abbildung 69: <i>Importance plot</i> der 1D- ^1H -NOESY-Spektren deutscher und niederländischer Spargelproben.....	188
Abbildung 70: <i>Importance plot</i> der 1D- ^1H -NOESY-Spektren deutscher und spanischer Spargelproben.....	189
Abbildung 71: <i>Importance plot</i> der 1D- ^1H -NOESY-Spektren deutscher und griechischer Spargelproben.....	189
Abbildung 72: <i>Box plot</i> des <i>buckets</i> bei 1.80 ppm für die Separierung von niederländischen Spargelproben; Intensitäten logarithmiert	190
Abbildung 73: <i>Box plot</i> des <i>buckets</i> bei 8.26 ppm für die Separierung von niederländischen und polnischen (NB) sowie spanischen und griechischen (MT) Spargelproben; Intensitäten logarithmiert	190
Abbildung 74: <i>Box plot</i> des <i>buckets</i> bei 2.19 ppm für die Separierung von spanischen Spargelproben; Intensitäten logarithmiert	191
Abbildung 75: <i>Box plot</i> des <i>buckets</i> bei 5.31 ppm für die Separierung von griechischen Spargelproben; Intensitäten logarithmiert	191
Abbildung 76: <i>Box plot</i> des <i>buckets</i> bei 3.51 ppm für die Separierung von spanischen und peruanischen Spargelproben; Intensitäten logarithmiert.....	192

V Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Klassifizierungsergebnisse von weißen Spargelproben unterschiedlicher Sorten, aus verschiedenen Anbauregionen und Erntejahren	5
Tabelle 2: Sorten für den Anbau von Weißspargel (Strobl, 2015)	17
Tabelle 3: Integrale der Saccharose- und TMSP-Signale eines 1D- ¹ H-NOESY-Spektrums einer deutschen Spargelprobe (15-DE-RP-Sul-Gi-3)	53
Tabelle 4: Erläuterung der Größen aus Formel 1	53
Tabelle 5: Erläuterung der Größen aus Formel 2	54
Tabelle 6: Integral des C1-Signals der Saccharose und Integralsignal des TMSP eines 1D- ¹ H-NOESY-Spektrums einer Spargelmischprobe für die verschiedenen Lösungsmittelgemische	70
Tabelle 7: Saccharose-Konzentration im Extrakt, prozentualer Saccharose-Gehalt im Spargellyophilisat und im unbehandelten Spargel, errechnet aus den Integralen 1 (α -anomeres C1 der Saccharose) und 6 (TMSP-Referenzsignal), mit einer TMSP-Konzentration von 0.5 mM, basierend auf der Extraktion mit unterschiedlichen Lösungsmitteln und Gemischen daraus	70
Tabelle 8: Erläuterung der Größen aus Tabelle 7	70
Tabelle 9: Kalibrierreihe für die BSA-Proteingehaltsbestimmung mittels BRADFORD:	86
Tabelle 10: Erläuterung der Größen aus Formel 3	87
Tabelle 11: Ergebnisse der Proteingehaltsbestimmung nach BRADFORD im Spargellyophilisat	87
Tabelle 12: Gegenüberstellung der Klassifizierungsergebnisse nord- und süddeutscher Spargelproben aus den Jahren 2014, 2015 und 2016 mit allen Sorten	91
Tabelle 13: Gegenüberstellung der Klassifizierungsergebnisse nord- und süddeutscher Spargelproben aus den Jahren 2014, 2015 und 2016 der Sorte <i>Gijnlim</i>	93
Tabelle 14: Gegenüberstellung der Klassifizierungsergebnisse nord- und süddeutscher Spargelproben aus den Jahren 2015 bzw. 2016 der Sorte <i>Gijnlim</i>	98
Tabelle 15: Gegenüberstellung der Klassifizierungsergebnisse nord- und süddeutscher Spargelproben aus dem Jahr 2015 der Sorte <i>Gijnlim</i> inkl. Ernteperiode-abdeckende Proben	101
Tabelle 16: Gegenüberstellung der Klassifizierungsergebnisse deutscher, polnischer, niederländischer, spanischer, griechischer und peruanischer Spargelproben aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten	105
Tabelle 17: Gegenüberstellung der Klassifizierungsergebnisse deutscher (DE), benachbarter (NB = <i>Neighbours</i>) mediterraner (MT = <i>Mediterranean</i>) und peruanischer (OS = <i>Oversea</i>) Spargelproben aus den Jahren 2015 und 2016, alle Sorten	111

V Tabellenverzeichnis

Tabelle 18: Gegenüberstellung der Klassifizierungsergebnisse deutscher und ausländischer Spargelproben aus den Jahren 2015 und 2016; alle Sorten	114
Tabelle 19: Peak-Listung der L-Tyrosin Probe aus Abbildung 63 (HMDB L-Tyrosin, 2020) .	126
Tabelle 20: Verwendete Materialien	130
Tabelle 21: Verwendete Chemikalien	131
Tabelle 22: Verwendete Computer-gestützte Auswertungsprogramme	132
Tabelle 23: Verwendete Geräte.....	133
Tabelle 24: Protokoll zur Probenakquise von weißem Spargel	135
Tabelle 25: Protokoll zur Probenvorbereitung von weißem Spargel.....	138
Tabelle 26: Untersuchte Gefriertrocknungsmethoden.....	140
Tabelle 27: verwendete Puffersysteme.....	141
Tabelle 28: Einwaagen der sechs Spargelproben zur Extraktion mit zwei unterschiedlich hoch konzentrierten Kaliumhydrogenphosphatpufferlösungen.....	143
Tabelle 29: Protokoll zur Soxhlet-Extraktion von Stahlkugeln zur Entfettung	146
Tabelle 30: Protokoll zur polaren Extraktion von weißem Spargel nach Aufarbeitungsmethode 1 (intSOP #004-Version 3).....	147
Tabelle 31: Protokoll zur polaren Extraktion von weißem Spargel nach Aufarbeitungsmethode 2 (intSOP #004-Version 7) für die 1D- ¹ H-NOESY-, JRES- und TOCSY-Experimente.....	150
Tabelle 32: Protokoll zur NMR-spektroskopischen Vermessung von extrahierten Spargelproben mittels 1D- ¹ H-NOESY.....	155
Tabelle 33: Protokoll zur NMR-spektroskopischen Vermessung von extrahierten Spargelproben mittels TOCSY	156
Tabelle 34: Protokoll zur NMR-spektroskopischen Vermessung von extrahierten Spargelproben mittels JRES-Experiments.....	158
Tabelle 35: Einwaagen und Konzentrationen des L-Tyrosin-Standards und der peruanischen Spargelprobe 16-PE-HH-Fru-Tal.....	159
Tabelle 36: Erläuterung der Größen aus Tabelle 35.....	159
Tabelle 37: Messreihen 1 und 2 zur Bestimmung der Metabolomstabilität der jeweiligen Extrakte von weißem Spargel nach verschiedenen Aufarbeitungsmethoden (1 und 2).....	161
Tabelle 38: Probenkodierung Spargel Deutschland 2014	192
Tabelle 39: Probenkodierung Spargel Deutschland 2015	194
Tabelle 40: Probenkodierung Spargel Deutschland 2016.....	197
Tabelle 41: Probenkodierung Spargel Ausland 2014, 2015, 2016	202
Tabelle 42: Verteilung der Spargelproben – Deutschland / Ausland 2014, 2015, 2016.....	207
Tabelle 43: Verteilung der Spargelproben – deutsche Probenahmeregionen 2014, 2015, 2016.....	207

V Tabellenverzeichnis

Tabelle 44: Verteilung der Spargelproben – deutsche Unterregionen 2014, 2015, 2016	208
Tabelle 45: Beispielhaftes Metadatenblatt der Proben 16-DE-BYAb-Gab-Ba sowie 16-DE-BYAb-Gab-Gi	208
Tabelle 46: Entsorgungs- und Sicherheitshinweise der verwendeten Substanzen (Nations, 2019).....	213
Tabelle 47: Kodierung und Bedeutung der GHS-Symbole (Nations, 2019).....	217

VI Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Analytkonzentration anhand des TMSP-Referenzsignals im Extrakt.....	53
Formel 2: Berechnung des Saccharose-Gehalts im Spargellyophilisat	54
Formel 3: Berechnung des Proteingehalts im Spargellyophilisat	87

VII Danksagung

Was lange währt, wird endlich gut. Heute liegt sie endlich vor Ihnen, liebe*r Leser*in, nach einigen Jahren herausfordernder Arbeit, einer ganzen Menge zermürbter Gehirnzellen und etlichen Stunden im Labor, am Spektrometer oder vor dem Rechner: Meine Doktorarbeit.

Doch was hat es dazu gebraucht? Ca. 10,000 km Fahrtstrecke durch Deutschland, die Niederlande und Polen, 837 kg Spargel, 502 kg Trockeneis, 5,000 L Flüssigstickstoff, 4.4 L deuterierte Lösungsmittel, 2,901 NMR-Röhrchen und mindestens ebensoviele Spektren, was wiederum 653 Stunden Messzeit entspricht. Hinzu kommen ca. 3,960 Stunden Laborarbeit, fast genauso viele tolle gemeinsame Stunden mit wundervollen Kollegen beim Aufarbeiten der Spargelproben mit herausragender musikalischer Untermalung und gelegentlichen Messermühlen-bedingten Hörschäden.

Um es kurz zu machen: Es war mir eine Ehre, eine Freude, Fluch und Segen zugleich, die Zeit, die schönen und schweren Stunden, den Frust und den Spaß, die Aha-Momente und die haarsträubendsten Situationen mit jedem einzelnen von euch / Ihnen zu durchleben. Höchste Zeit also, mich an dieser Stelle noch einmal bei all denjenigen im Einzelnen zu bedanken, die mir geholfen haben, meine und unsere Ziele zu erreichen.

Herrn Prof. Dr. Markus Fischer, Betreuer dieser Arbeit, bin ich zu großem Dank verpflichtet: Für die Bereitstellung und Betreuung der interessanten Stelle, deren Inhalt wir mitgestalten durften, nämlich die Versuchsmatrix Spargel und die analytischen Möglichkeiten; für seine Ideen und Durchsetzungskraft bei der Bewilligung des Projektes; als auch für seine Anregungen bei der Korrekturlesung, die die Qualität meiner Arbeit sehr verbessert hat.

Meinem Co-Betreuer und Erstgutachter der Arbeit, Herrn Dr. Thomas Hackl, möchte ich an dieser Stelle einen ganz besonderen Dank aussprechen! Er hatte stets ein offenes Ohr für mich, hat bedingungslos an mich geglaubt und mich mit guten Ratschlägen, bereichernden Ideen und konstruktiven Gesprächen in dieser herausfordernden Phase meiner akademischen Laufbahn unterstützt. Nicht nur für die fachliche Begleitung, Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit, sondern ganz besonders auch für unser sehr gutes zwischenmenschliches und freundschaftliches Verhältnis möchte ich Danke sagen. Ich hätte mir keinen besseren Betreuer wünschen können!

Herrn Prof. Dr. Bernward Bisping möchte ich für das nette Angebot, als Zweitgutachter zu fungieren, danken. Im wissenschaftlichen Austausch mit ihm konnten viele Fragen mit Bezug auf die Doktorarbeit, als auch auf die Disputation geklärt und erörtert werden.

VII Danksagung

Herrn Prof. Dr. Oliver Kohlbacher, als auch Herrn Marc Rurik vom Institut für Bioinformatik der Universität Tübingen möchte ich für die gute und langjährige Zusammenarbeit danken.

Ebenso möchte ich Herrn Eric Rottmann und Herrn Torben Grube danken, die im Rahmen der Anfertigung ihrer Diplomarbeiten einen wertvollen wissenschaftlichen Beitrag für die vorliegende Arbeit geleistet haben.

Weiterhin möchte ich meinen Kolleg*innen des BfR, insbesondere meiner Kollegin und Teamleiterin, Frau Dr. Renate Krätke, für ihr Verständnis, ihre Unterstützung und ihre Motivation, die doppelte Belastung durch Beruf und Abschluss der Promotion zu bewerkstelligen, danken.

Ebenso richtet sich mein Dank an meine Kommiliton*innen, mit denen ich stets sehr fruchtbare, fachliche Diskussion führen durfte und die mich über die vergangenen Jahre auch freundschaftlich begleitet haben. Ich hoffe, unser Kontakt bleibt uns noch viele weitere Jahre erhalten.

Einen weiteren großen Stellenwert nimmt meine Familie, insbesondere meine Eltern, ein, die hinsichtlich der emotionalen Unterstützung immer an meiner Seite standen. Ihre Wissbegier an meiner Arbeit hat mich sehr motiviert, da es mir vor Augen führte, welch großes, allgemeines Interesse sich hinter der Thematik verbirgt.

Nicht nur während der Zeit der Promotion, sondern bereits mein ganzes Leben lang, hat mir eine Person aus meiner Familie einen ganz besonderen Halt gegeben: meine Großmutter. Danke, dass Du immer für mich da warst und bist! Ich hoffe, dass wir noch viel Zeit gemeinsam erleben werden. *Diese Arbeit, liebe Oma Lisa, widme ich dir!*

Ohne all diese Menschen hätte die Arbeit niemals zu dem werden können, was sie jetzt ist. Einem Menschen, der mir insbesondere in den letzten Jahren während der Fertigstellung der Arbeit immer aufopferungsvoll zur Seite stand, mir jeden denkbaren, emotionalen Halt gegeben hat, den man sich vorstellen kann und der nie den Glauben an mich verloren hat, selbst wenn ich ihn einmal verloren hatte, gebührt mein größter Dank, von tiefstem Herzen: Ohne Dich, lieber Andi, wäre diese Zeit so viel unmotivierter verlaufen. Danke!

VIII Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.



Juliane Klare

Magdeburg, den 15.07.2021