

## Untersuchungen auf Gehalte an Carotin und Vitamin C bei Gemüsen und Futterstoffen.

Von Dr. G. PFÜTZER und Dr. C. PFAFF.

Mitteilung aus der Landw. Versuchsstation Limburgerhof der I. G. Farbenindustrie Aktiengesellschaft

Vorgetragen in der Fachgruppe für Landwirtschaftschemie auf der 48. Hauptversammlung des V. d. Ch. in Königsberg am 5. Juli 1935.

(Eingeg. 5. August 1935.)

Untersuchungen über den Gehalt der verschiedenen Pflanzen an Vitaminen sind in großer Zahl durchgeführt worden. In Deutschland hat insbesondere *Scheunert* zahlreiche biologische Untersuchungen vorgenommen und eine ausführliche Übersicht der Vitamingehalte, insbesondere der einheimischen Nahrungsmittel gegeben<sup>1)</sup>. Über Untersuchungen über den Einfluß der Düngung ist verhältnismäßig wenig in der Literatur bekannt. Hier liegen Arbeiten vor von *Scheunert*<sup>1)</sup>, *v. Hahn* und *Görbing*<sup>2)</sup>, *Virtanen*<sup>3)</sup>, *Watson u. I. C. I.* (Versuchsstation Jealotts Hill)<sup>4)</sup> u. a.

Von den zahlreichen festgestellten oder vermuteten Vitaminen dürften die mit den Buchstaben A—D bezeichneten für den Menschen die größte allgemeine Bedeutung haben. Sie sind in dieser Zeitschrift ausführlich in dem „Fortschrittsbericht der physiologischen Chemie“ beschrieben<sup>5)</sup>.

Vitamin D scheidet für unsere Untersuchungen aus, da es nach den bisher vorliegenden Analysen nur bei Pilzen vorkommt. Von den noch bleibenden Gruppen A, B und C untersuchten wir A und C, da für diese beiden Faktoren verhältnismäßig leicht und genau auszuführende chemische Bestimmungsmethoden vorliegen. Von eingehenderen Tierversuchen mußten wir zunächst Abstand nehmen und damit auch auf Untersuchungen über die B-Reihe verzichten, deren wichtigste Faktoren nur im Tiertest bestimmbar sind. Ein solcher Tierversuch erfordert mehr Aufwand an Einrichtungen, Raum, Zeit und Kosten als der chemische Test; freilich bietet er dafür auch die größte Sicherheit hinsichtlich des Vorliegens physiologisch wirksamer Stoffe. Man bedient sich der chemischen Untersuchungsverfahren jedenfalls dann mit Vorteil, wenn innerhalb bestimmter Stoffgruppen eine Parallelität mit den Resultaten der Tierversuche einmal festgestellt worden ist.

Vitamin A ist in den Pflanzen nicht als solches vorhanden, wohl aber in seiner Vorstufe, dem Carotin, das im tierischen Organismus (Leber) zum eigentlichen Vitamin A aufgebaut wird. Carotin wird demnach als Provitamin A bezeichnet. Es ist ein stark ungesättigter Kohlenwasserstoff von der Summenformel  $C_{40}H_{56}$ . Die Formel des Vitamins lautet  $C_{20}H_{30}O$ . Man unterscheidet ein  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Carotin, von denen die  $\beta$ -Verbindung die wirksamste darstellt, da aus ihr beim Aufbau des eigentlichen A-Faktors unter Aufnahme von 2 Molekülen Wasser 2 Vitaminmoleküle entstehen. In den Pflanzen überwiegt bei weitem das  $\beta$ -Carotin, der Gehalt an  $\gamma$ -Carotin kommt bei unseren einheimischen Pflanzen praktisch kaum in Betracht.

Das Vitamin C wird als solches in der Pflanze aufgebaut. Nach seiner Konstitutionsermittlung hat man die Substanz als Ascorbinsäure, der die Bruttoformel  $C_6H_8O_6$  zukommt, bezeichnet.

## Untersuchungsmethodik.

Tastversuche mit verschiedenem Pflanzenmaterial bezüglich reichen oder geringen Vorkommens von Provitamin A hatten bei rein chemisch ermitteltem Blaufärbungsvermögen (mit  $SbCl_3$ ) der Pflanzensubstanz Resultate ergeben, die mit den aus Tierversuchen bekannten Vitamin-A-Gehalten vergleichbar waren. Da häufig auch in der Literatur auf die Brauchbarkeit des chemischen Testes hingewiesen ist und es uns nicht um die Bestimmung von absoluten Werten zu tun war, sondern von Relativwerten bei verschieden behandeltem Pflanzenmaterial, verzichteten wir auf den Tierversuch und benutzten — ebenso wie beim später beschriebenen Vitamin C — den chemischen Weg.

Wir verfahren dabei nach einer Methode, die wir von Untersuchungen mit Lebertran übernahmen, auf folgende Weise: Die mit dem Fleischwolf zerkleinerte Pflanzensubstanz wird mit alkoholischer Kalilauge unter Ausschluß von Luft-sauerstoff verseift. Nach dem Abkühlen wird das gesamte Verseifungsgut mit Petroläther extrahiert. Die vereinigten Petrolätherextrakte werden mit Methanol behandelt. Nach Abdunsten des Petroläthers wird der Rückstand in  $CHCl_3$  gelöst. In dieser Lösung stellten wir die mit  $SbCl_3$  nach der *Carr*- und *Price*-Reaktion<sup>6)</sup> entstehende Blaufärbung mit dem Stufenphotometer von Zeiss fest. Aus den mit Filter S 57 abgelesenen Durchlässigkeitswerten (D %) und aus der Schichtdicke  $s$  wurde der Extinktionskoeffizient errechnet. Der erhaltene Wert bezieht sich auf 10 g Trockensubstanz. Von einer Umrechnung der gefundenen Werte auf Carotin haben wir abgesehen, da nach dieser Methode Nebenbestandteile mitbestimmt werden. In einer Reihe von Fällen isolierten wir das Carotin nach *Kuhn* und *Brockmann*<sup>7)</sup> und bestimmten es colorimetrisch durch Vergleich mit Azobenzol-Lösung. Die dabei erhaltenen absoluten Werte ergaben das gleiche Bild, wie die nach der oben erwähnten Arbeitsweise erhaltenen Relativwerte, die uns für die Zwecke dieser Arbeit zunächst genügten. Wir werden künftig nur noch die *Kuhn*- und *Brockmann*-Methode anwenden.

Sauerstoff (Luft) und starke Lichteinwirkung sind bei der Analyse fernzuhalten. Rasches Trocknen des noch unzerkleinerten Pflanzenmaterials bei 90—100° ist unbedenklich.

Zur Ermittlung des Vitamin-C-Gehaltes wandten wir das Titrationsverfahren von *Tillmans*<sup>8)</sup> an. Nach *Tillmans* und Mitarbeitern ist das im frischen Pflanzenmaterial gefundene Spontanreduktionsvermögen gegenüber 2,6-Dichlor-phenolindophenol auf Vitamin C zurückzuführen<sup>9)</sup>.

Wir kochten die mit Nirostamesser fein zerschnittene Pflanzensubstanz unter Einleiten von Stickstoff mit verdünnter Essigsäure. Vom Filtrat wurde ein aliquoter Teil mit  $n_{1000}^{2,6}$ -Dichlor-phenolindophenol-Lösung<sup>10)</sup> unter Zusatz von Natriumacetat bis zur Blaufärbung titriert ( $p_H$  5,6 bis 6,5). Das Resultat wird von uns in  $cm^3$   $n_{1000}^{2,6}$  Farblösung

<sup>1)</sup> „Der Vitamingehalt der deutschen Nahrungsmittel“ Bd. I u. II. Vgl. ferner das Kapitel „Vitamine“ von *Scheunert* im Handbuch der Lebensmittelchemie, 1933, Bd. I, S. 768 ff.

<sup>2)</sup> Z. Unters. Lebensmittel **65**, 601 [1933].

<sup>3)</sup> Biochem. Z. **267**, 173 [1933].

<sup>4)</sup> *Watson* u. a., *Empire J. Exp. Agric.* **1**, 68 [1933].

<sup>5)</sup> Vitamin A, *Brockmann*, diese Ztschr. **47**, 523 [1934]; B-Vitamin, *Wagner-Jauregg*, ebenda S. 547; Vitamin C, *Micheel*, ebenda S. 550; Vitamin D, *Lütringhaus*, ebenda S. 552.

<sup>6)</sup> *Biochemical J.* **20**, 497 [1926].

<sup>7)</sup> *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **206**, 41 [1932].

<sup>8)</sup> *Biochem. Z.* **250**, 312 [1932].

<sup>9)</sup> Dies stimmt mit unseren Erfahrungen insofern überein, als wir bei der chemischen Bestimmung der Vitamin-C-Gehalte gedüngter und ungedüngter Gemüseproben im Mittel zu dem gleichen Ergebnis kamen, wie es Tierversuche zeigten.

<sup>10)</sup> Die Farblösung wurde gegen eine genau  $n_{100}^{2,6}$ -Lösung von *Mohrschem Salz* unter Verwendung von Natriumoxalatpuffer eingestellt.

einheitlich pro 10 g Trockensubstanz angegeben und mit TW (Titrationswert) bezeichnet. Auch eine Umrechnung auf Ascorbinsäure ist zulässig (1 cm<sup>3</sup> Farblösung = 0,088 mg Ascorbinsäure). Die Fernhaltung von Sauerstoff während der Analyse ist bei Vitamin-C-Untersuchungen noch wichtiger als bei Vitamin-A-Bestimmungen. Katalytisch wirkendes Eisen darf mit dem Untersuchungsmaterial nicht in Berührung kommen.

Zur Bearbeitung der Frage nach einem Einfluß der Düngung auf den Vitamingehalt der Pflanzen benutzten wir Material, welches überwiegend aus exakten Feldversuchen (Ertragsversuchen) stammte. Es wurde eine Mittelprobe aus mehreren Parallelparzellen gezogen, wobei nur gleichmäßiges, dem Durchschnitt entsprechendes Material zur Verwendung kam. Soweit Kastenversuche zur Untersuchung gelangten, wurde die gesamte Ernte verarbeitet.

Die Versuche waren durchgeführt auf Limburgerhof-Boden, einem neutralen, humosen Sandboden mit starkem Stickstoff- und geringem Phosphorsäure- und Kalibedürfnis. Das Nährstoffverhältnis (N : P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : K<sub>2</sub>O) bei nicht einseitig überhöhter Düngung war im allgemeinen — dem Nitrophoska II bzw. III entsprechend — 1 : 3/4 : 1 3/4 bzw. 1 : 1 : 1 1/4. Die absolute Höhe der Düngung war dem Nährstoffbedarf angepaßt.

### Einfluß der Düngung auf den Provitamin-A-Gehalt.

Die Zusammenstellung der gefundenen Erträge und Extinktionskoeffizienten in Tabelle 1 gibt ein Bild von dem Einfluß der Volldüngung, insbesondere der N-Düngung, auf den Provitamin-A-Gehalt verschiedener Pflanzen. Dieser wurde durch Düngung in allen Fällen, jedoch in wechselndem Grad gesteigert. Die Erhöhung tritt besonders hervor bei den grünen Blättern, z. B. Grünkohl. Aber auch die Speicherorgane, wie die Möhren (unterirdischer Teil ohne Blätter) nehmen an der Erhöhung deutlich teil. Im Versuch

Tabelle 1.

Frucht	Düngung: kg/ha oder g/m <sup>2</sup> bei Kastenversuchen			Erträge Trocken- substanz kg/ar	Provitamin-A Extinktions- koeffizient bez auf 10 g Trocken- substanz
	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O		
Rotkohl ...	—	200	250	25,5	12
„	200	200	250	34,2	14
Rosenkohl .	—	150	350	1,8	20
„	200	150	350	10,5	29
Zuckerrüben- blätter*) ..	—	—	—	37,1	64
Zuckerrüben- blätter ..	60	30	30	92,9	80
Grünkohl ...	—	150	350	7,1	64
„	200	150	350	17,9	110
„	—	150	350	6,5	68
„	200	150	350	14,8	94
Karotten*) .	—	—	—	26,9	87
„	26	22,5	47,5	146,6	108
Mangold*) ..	—	—	—	10,0	111
„	28	24	51,5	42,9	147
Petersilie*) ..	—	—	—	9,8	113
„	26	22,5	47,5	28,7	161
Speisemöhren	—	80	100	95,3	167
„	80	80	100	139,3	207
Spinat*) ....	—	—	—	5,9	76
„	12	—	—	19,6	189
„	18	—	—	20,9	213

\*) Kastenversuche

zu Spinat findet man auch bei einseitig erhöhter N-Gabe noch eine deutliche Steigerung des Carotingehaltes. Carotin und Vitamin C verhalten sich, wie wir später sehen werden, in dieser Beziehung verschieden.

Die hier aufgezeigten, lediglich durch verschiedene Ernährung bedingten Unterschiede im Carotingehalt unter

sonst gleichen Bedingungen gezogener Pflanzen können allein schon die beträchtlichen Schwankungen erklärlich machen, die sich bei der Angabe der Vitamin-A-Wirksamkeit ein und der gleichen Pflanzenart durch verschiedene Versuchsansteller bisweilen ergeben haben.

Auf den teilweise sehr N-bedürftigen Böden führte die Düngung zu bedeutender Ertragssteigerung (Tab. 1, Spalte 3) und damit zu einer starken Erhöhung des Carotin-ertrages je Flächeneinheit.

Was die Unterschiede zwischen den einzelnen Pflanzen betrifft, so weisen Rotkohl und Rosenkohl die niedrigsten Koeffizienten auf, während Spinat, Möhren und Karotten als bekanntlich provitamin-A-reiche Pflanzen durch entsprechend hohe Koeffizienten auffallen. Auch Petersilie und Mangold zeichnen sich durch hohen Gehalt aus.

Wie von Dr. Volz durchgeführte colorimetrische Chlorophyllbestimmungen (Acetonextrakt) bei Spinat zeigten, wurden Chlorophyllgehalt und K-Werte durch Düngung in ähnlicher Weise erhöht. Die Chlorophyllarmut der Blätter auf den Mangelparzellen war schon rein äußerlich an der gelblichen Farbe sichtbar. Ein gewisser Zusammenhang des Chlorophyllgehaltes und der Carotinmenge, der wiederholt in der Literatur erwähnt ist, tritt also auch bei unseren Versuchen in Erscheinung, wozu bemerkt sei, daß die Carotinoidbildung auch unter Ausschluß von Licht erfolgen kann.

### Einfluß der Düngung auf den Vitamin-C-Gehalt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2.

Frucht	Düngung: kg/ha oder g/m <sup>2</sup> bei Kastenversuchen			Erträge Trocken- substanz kg/ar	TW bezogen auf 10 g Trocken- substanz
	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O		
Karotten ....	—	80	100	65,7	36
„	80	80	100	83,7	41
Speisemöhren .	—	80	100	95,3	40
„	80	80	100	139,3	51
Kartoffeln ...	—	50	105	69,7	58
„	60	50	105	88,1	59
Endiviensalat .	—	100	125	34,3	63
„	100	100	125	43,6	65
Rotkohl .....	—	200	250	25,5	375
„	200	200	250	34,2	373
Weißkohl ....	—	—	—	35,5	611
„	—	60	200	33,9	627
„	150	60	200	48,5	625
Rosenkohl ...	—	150	350	1,8	789
„	200	150	350	10,5	761
Kohlrabi- Knollen ....	—	200	250	38,0	789
Kohlrabi- Knollen ....	200	200	250	59,7	773
Blumenkohl ..	—	200	250	9,8	979
„	200	200	250	28,5	988
Petersilie*) ....	—	—	—	9,8	1043
„	26	22,5	47,5	28,7	1007
Spinat*) .....	—	—	—	5,9	731
„	12	—	—	19,6	771
„	18	—	—	20,9	711

\*) Kastenversuche

Im allgemeinen bleibt der Titrationswert bzw. der Vitamin-C-Gehalt, soweit er auf Trockensubstanz bezogen wird, bei Volldüngung konstant oder wird günstig beeinflusst. In einigen wenigen Fällen zeigt er eine geringe Tendenz zur Abnahme. Bei einseitiger Ernährung (Spinatversuch, hohe N-Gabe ohne PK) ist eine Abnahme des Gehaltes

deutlich. Wenn wir die bei Vitamin C erhaltenen Ergebnisse vergleichen mit dem bei der Carotinbestimmung Gesagten, zeigt sich ein gewisser Unterschied hinsichtlich der Düngewirkung. Während hier im allgemeinen Konstanz besteht, sind die Ausschlüsse nach der positiven Seite bei Carotin bedeutend größer und bestehen auch bei einseitig erhöhter Stickstoffdüngung.

### Einfluß zusätzlichen Neonlichtes auf den Provitamin-A- und Vitamin-C-Gehalt grüner Pflanzen.

Im Gewächshaus wurden in Kästen Petersilie, Schnittlauch, Gras (verschiedene Rasengräser) und Spinat bis zu einem gewissen Stadium vorgezogen. Ein Teil der Kästen blieb bis zum Versuchsende ohne Zusatzlicht, der andere Teil der Kästen wurde ununterbrochen mit Rotlicht einer Neonröhren-Anlage, also dem besonders für die Assimilationstätigkeit der Pflanze wirksamen Teil des Spektrums, bestrahlt. Ventilatoren sorgten bei allen Kästen gleichmäßig für Luftzirkulation und Übereinstimmung der Temperatur. Die Versuche fanden in den Monaten Januar—April statt.

Tabelle 3.

Pflanze	Neonlicht	Versuchsdauer in Tagen	Erträge Trockensubstanz g/m <sup>2</sup>	Provitamin A Extinktionskoeffizient k auf 10 g Trockensubstanz	Vitamin C TW bezogen auf 10 g Trockensubstanz
Petersilie ...	ohne	18	346	136	272
"	mit	18	475	185	520
Schnittlauch	ohne	14	153	75	261
"	mit	14	196	118	284
Gras (jung)	ohne	30	21	112	154
"	mit	30	52	196	141
Spinat .....	ohne	17	156	55	164
"	mit	17	164	67	179

Das Zusatzlicht förderte bei allen Pflanzen den Ertrag, am deutlichsten bei dem Petersilienversuch, der in dem relativ lichtschwachen Monat Januar durchgeführt wurde. Hier erhöhte Neonlicht auch den Vitamin-C-Gehalt am stärksten. Bei den übrigen Pflanzen war die Ascorbinsäuresteigerung gering. Im Gras stellte sich sogar eine schwache Senkung ein. Dazu ist freilich zu bemerken, daß der Versuch mit Gras nicht einwandfrei gelang, da der Bestand lückig wurde und in der belichteten und unbelichteten Reihe die verschiedenen Gräser zu ungleicher Entwicklung kamen.

Der Carotingehalt wurde in allen Fällen durch Zusatzlicht gesteigert.

Die Blattfarbe war bei den mit Zusatzlicht behandelten Pflanzen deutlich dunkler grün als bei den Kontrollpflanzen.

### Einfluß der Konservierung auf den Vitamin-Gehalt.

Bei einigen wenigen Untersuchungen an Heu und Silofutter konnten wir mitunter ein bemerkenswertes Gleichbleiben von K (Blaufärbung) im Vergleich zum frischen Ausgangsfutter feststellen. Teilweise fanden wir nach unserer Arbeitsweise sogar stärkere Blaufärbung in der Silage als im frischen Futter<sup>11)</sup>. Wir führen dies auf Zersetzungsprodukte<sup>12)</sup> zurück, die sich unter dem Einfluß der Säuren aus den Xanthophyllen gebildet haben und nur chromatographisch abzutrennen sein dürften.

Andererseits zeigte sich auch bisweilen ein beträchtliches Sinken im Blaufärbungsvermögen des konservierten Futters. Hier müssen noch weitere Untersuchungen die Ursache der nicht einheitlichen Ergebnisse klären.

Im Einklang mit unseren sonstigen Beobachtungen über die Empfindlichkeit des Vitamins C zeigten die

Titrationsergebnisse durchweg eine Tendenz zur Abnahme im Heu wie im Silofutter.

Tabelle 4.

	Vitamin C TW für 10 g Trockensubstanz
Junges Gras in frischem Zustand .....	198
" " als Heu .....	118
Rübenblätter vor der Silage .....	166
" nach der Silage unbehandelt ....	80
" nach der Silage mit Säurezusatz (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25%) .....	137
Silofutter (Gras) unbehandelt .....	138
" " mit Säurezusatz (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,3%) .....	144
" " mit Zuckersatz (1%) .....	136
Gras in frischem Zustand .....	310
" 1 Tag alt (Selbsterwärmung) .....	284
" als Heu .....	137

Im Silofutter war die Abnahme besonders groß, wenn die Konservierung nicht gut gelungen war. Säurezusatz ergab bei eiweißreichem Pflanzenmaterial besseres Futter und verringerte den Verlust an Vitamin C.

Die teilweise Zerstörung der Ascorbinsäure kann schon bei der Selbsterwärmung des frisch geschnittenen Futters vor der Silierung einsetzen. Es ist deshalb bei der Untersuchung von Pflanzen, wenn sie nicht sofort nach der Probeentnahme geschieht, mit Verlusten an Vitamin C zu rechnen.

Man darf erwarten, daß die Frage: hält die Qualität der Ernteprodukte Schritt mit der Erhöhung der Erntemenge bei zweckmäßiger Düngung, auch bezüglich des Vitaminproblems mit „Ja“ beantwortet werden kann, wenigstens bieten die vorliegenden Untersuchungen eine Stütze hierfür. Man kann sogar, ähnlich wie bei anderen Qualitätsfaktoren, Verbesserungen erzielen, d. h. mit einer Steigerung der prozentischen Gehalte des Vitamins rechnen. Wir hoffen, bei der Fortsetzung unserer Arbeiten nicht nur weiteres Material für diese Annahme bei den bis jetzt untersuchten beiden Vitaminen zu erhalten, sondern auch bei den noch nicht untersuchten Vitaminen neue Belege hierfür liefern zu können. Insbesondere hoffen wir, daß die B-Reihe, die im Gegensatz zu den anderen Vitaminen von bekannter Zusammensetzung auch Stickstoff und Schwefel enthält, interessante Resultate bringen wird.

### Zusammenfassung.

An Gemüsen und Futterstoffen wurden Untersuchungen angestellt über den Einfluß der Düngung auf den Gehalt an Carotin und Vitamin C.

Vollendung bewirkte bei den untersuchten Pflanzen eine Erhöhung des Gehaltes an Carotin bei gleichzeitiger Förderung des Pflanzenertrages. Daher ist die Steigerung des Provitamin-A-Ertrages, bezogen auf die Flächeneinheit, außerordentlich groß.

Der Vitamin-C-Gehalt blieb im allgemeinen konstant. Es zeigten sich jedoch auch deutliche Erhöhungen des Gehaltes neben geringfügigen Senkungen. In jedem Falle ergab sich infolge starker Pflanzenertragssteigerung auch hier eine bedeutende Erhöhung der geernteten Vitaminmenge pro Flächeneinheit.

Zusätzliche Neonbeleuchtung im Gewächshaus steigerte bei Petersilie, Schnittlauch und Spinat den Carotin- und Vitamin-C-Gehalt sowie den Ertrag.

Soweit einige eben erst begonnene Arbeiten Schlüsse zulassen, können bei mangelhafter Silierung von Grünfutter beträchtliche Vitamin-A- und besonders Vitamin-C-Verluste eintreten, besonders auch schon bei verzögerter Einbringung der Ernte.

[A. 90.]

<sup>11)</sup> Vgl. auch Virtanen, Biochem. Z. 258, 251 [1933], der im Silofutter gelegentlich mehr Carotin fand als im frischen Futter.

<sup>12)</sup> Kuhn u. Brockmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 206, 53 [1932].