

Bestimmung von Nitrat in Kartoffeln mit unterschiedlichen Methoden

H. J. REENTS¹⁾ und S. VON TUCHER²⁾

427

Eingegangen am 16.12.1997, angenommen am 4.2.1998

1 Problemstellung

Nitrat in Lebensmitteln wird aufgrund des im Stoffwechsel entstehenden Nitrits und der daraus resultierenden Gefahr der Bildung von Methämoglobin und Nitrosaminen als ungünstig angesehen. Zwar kann die Kartoffel im Vergleich zu anderen Nahrungspflanzen mit etwa 10–450 mg NO₃⁻/kg FS als nur "mäßig nitrathaltig" eingestuft werden (KOLBE, 1987), jedoch ist dabei die vergleichsweise hohe verzehrte Menge zu berücksichtigen.

Der Nitratgehalt der Kartoffel wird ähnlich wie bei anderen Pflanzenarten durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst. Hierzu zählen neben klimatischen Bedingungen im jeweiligen Anbaujahr wie Einstrahlung, Wasserversorgung und Temperaturverlauf die Sorte, Höhe, Form und zeitlicher Verlauf des N-Angebots, (NEUBAUER und PIENZ, 1993, KOLBE, 1987) aber auch Reife und Erntezeitpunkt. Dabei scheinen physiologisch unreife Knollen einen höheren Nitratgehalt aufzuweisen als ausgereifte (KOLBE, 1996, PUTZ und BERGTHALLER, 1989). Innerhalb des Sortenspektrums zeigt sich die Tendenz höherer Nitratgehalte in der frühen und sehr frühen (190–345 mg NO₃⁻/kg FS) im Vergleich zur mittelspäten Reifegruppe (140–220 mg NO₃⁻/kg FS) (GRASSERT et al., 1990); auf Standorten mit später N-Mineralisation kann jedoch auch der umgekehrte Fall eintreten. Es kann in manchen Fällen eine schwache, negative Korrelation zum Trockensubstanzgehalt bestehen (REENTS et al., 1997a). Gemessene Nitratwerte unterliegen selbst in Knollen einer Staude großen Schwankungen (PUTZ und BERGTHALLER, 1989). Diese Tatsache erfordert eine ausreichend große Knollenzahl, um repräsentative und reproduzierbare Nitratgehalte einer Durchschnittsprobe zu erzielen.

Zur Bestimmung des Nitratgehaltes in pflanzlichem Gewebe stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Der Einsatz von Nitratteststäbchen im Kartoffelsaft als Merckoquant (Nitrathek) oder Reflectoquant (RQ-flex) stellt eine kostengünstige, einfach handhabbare, halbquantitative Schnellmethode dar, die einen groben Überblick über den Nitratgehalt des Materials ermöglicht (WEBER und PUTZ, 1995). Auch die Verwendung ionensensitiver Elektroden kann zu den Schnellverfahren gezählt werden. Auf der Ebene der Laboranalytik stehen kolorimetrische, gaschromatographische und HPLC-Methoden (WEBER und PUTZ, 1993; VILSMEIER, 1984) zur Verfügung, die zeitlich und apparativ unterschiedliche Ansprüche stellen. Bei der Nitratbestimmung in Kartoffelextrakten kann es zu Problemen mit der Matrix kommen. Der Stärkegehalt von 11–18 % kann sich stark störend auswirken; eine Probenaufbereitung bei höheren Temperaturen (65 °C) führt zur Verkleisterung, es kommt zu Schwierigkeiten bei der Filtration. Bei elektrochemischen Methoden (Nitrationen-selektive Elektrode) kann es zur Drift von Meßwerten, in Farbreaktionen zu Behinderungen bei der Ausbildung des Komplexes, zu Trübungen und zur Störung durch stark gefärbte Filtrate kommen.

Viele dieser Schwierigkeiten können auf einfache Weise durch eine ausreichende Verdünnung der Proben umgangen werden. Dies erfordert dann jedoch Methoden mit niedriger Bestimmungsgrenze.

¹⁾ Dr. H. J. REENTS, Koordinator für ökologischen Land- und Gartenbau, TUM-Weihenstephan, D-85350 Freising

²⁾ Dr. SABINE VON TUCHER, Lehrstuhl für Pflanzenernährung, TUM-Weihenstephan D-85350 Freising

Hierfür bietet sich neben der HPLC der enzymatische Nitrit/Nitrat Farbttest von Boehringer an. Da der Test in dieser Form für Kartoffeln noch nicht beschrieben ist, wurde ein Methodenvergleich zur HPLC (VILSMEIER, 1984) durchgeführt.

Das Probenmaterial dafür stammte aus einem Versuch zur Sorteneignung von Kartoffeln für den ökologischen Landbau auf der Versuchsstation Scheyern (REENTS et al., 1997a).

2 Methoden

2.1 Probenaufbereitung

Von den geernteten, gewaschenen Kartoffelknollen wurden für jede Analyse 30 Knollen entnommen und längs halbiert. Jeweils eine Hälfte wurde in einer Küchenmaschine (Krupps Rotary 500) mit mittelgroßer Reibscheibe zerkleinert.

Von den Reibschnitzeln wurde eine Mischprobe von 100 g in ein Becherglas eingewogen und mit 250 ml aqua dest. in einen Labormixer (Warring Industrial Blender) überführt und eine halbe Minute auf höchster Stufe weiter zerkleinert. Danach wurden weitere 250 ml aqua dest. zugegeben und der Extraktionsvorgang eine halbe Minute fortgesetzt.

Die Teilung der Wassermenge erfolgte, weil die Zugabe der Gesamtmenge zu stärkerer Schaumbildung führte, die das nachfolgende Abgießen erschwerte.

Die Suspension wurde filtriert (S+S, 595 ½), 3 x ein Aliquot von 25 ml in einen Meßkolben pipettiert und auf 50 ml aufgefüllt. Diese Lösung, die nach wie vor Trübungen aufwies, wurde mittels Membranfiltration (Glasfaserfilter und S+S ME 0,45 µm) weiter geklärt. Das Filtrat wurde in Kunststoffflaschen gefüllt und eingefroren. Dies erwies sich für Serienuntersuchung als sinnvoll, da die Probenaufbereitung wesentlich mehr Zeit in Anspruch nimmt als die eigentliche Nitratbestimmung. Außerdem wurde dadurch die Variation innerhalb eines Proben-satzes minimiert.

2.2 Bestimmung des Nitrats

Zur Nitrat-Bestimmung wurden zwei Verfahren miteinander verglichen:

1. Bestimmung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) in Kombination mit UV-Detektor
2. Bestimmung mit dem Farbttest von Boehringer.

2.2.1 Chromatographiebedingungen

- Gerät: Fa. Kontron
- Säule: C18 Säule Spherisorb ODS II, 5µm, 250 x 4,6 m, mit Vorsäule
- mobile Phase: 0,001 m Tetrabutylammoniumhydrogensulfat + 0,025 m Natrium-dihydrogenphosphat, Durchfluß 0,7 ml/min, isokratisch
- UV-Detektor bei 220 nm
- Verdünnung der aufgetauten Proben 1:10

2.2.2 Farbttest

Funktionsprinzip:

Nitrat wird durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADPH) in Gegenwart des Enzyms Nitrat-Reduktase zu Nitrit reduziert. Das Nitrit reagiert mit Sulfanilamid und N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin zu einem rotvioletten Diazo-Farbstoff, der bei 540 nm bestimmt wird.

2.2.2.1 Vorbehandlung der Meßlösung:

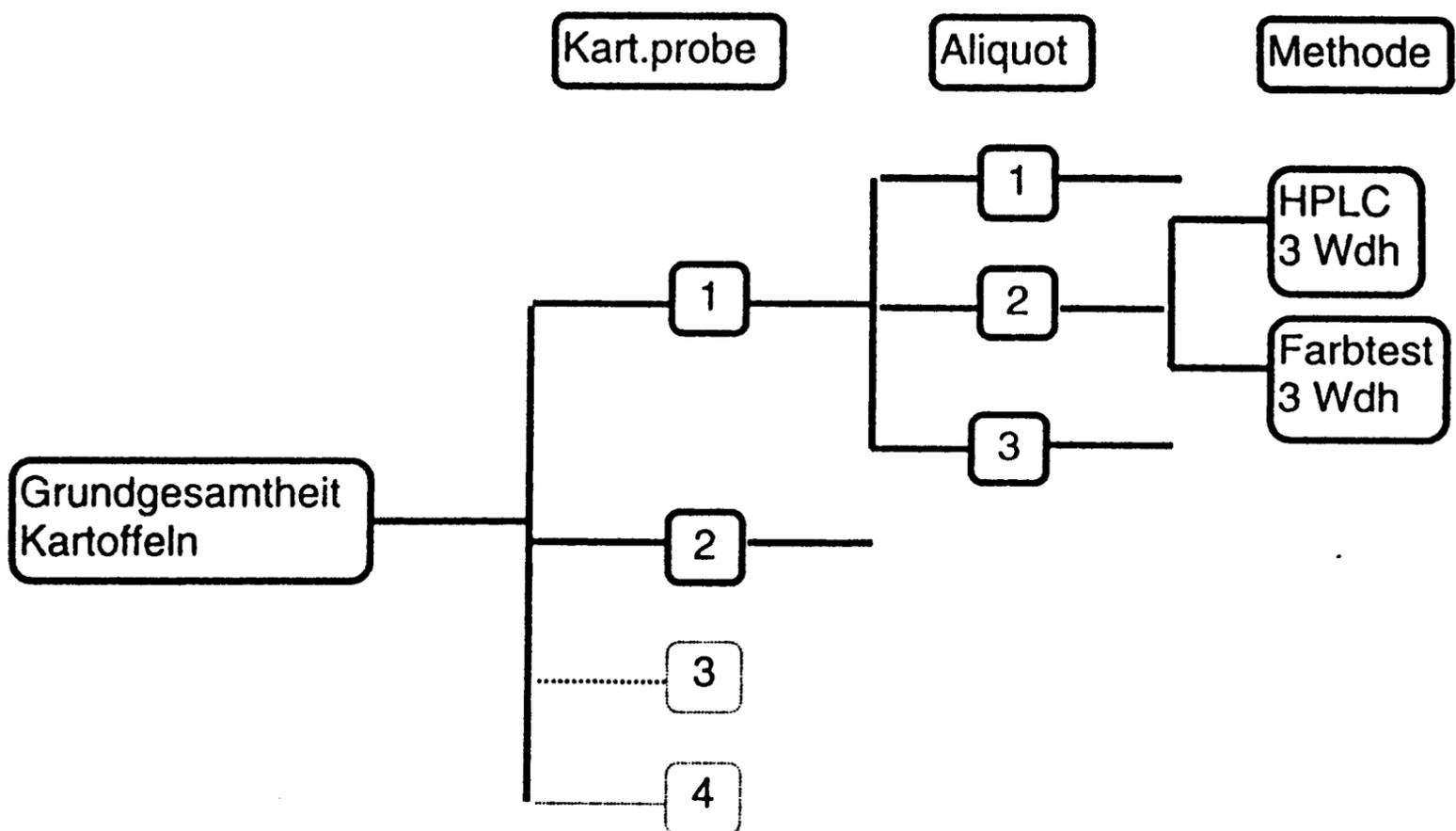
Der weitere Verfahrensgang erfolgte wie in der Testbeschreibung für die Bestimmung von Nitrat in Säften. 20 ml des aufgetauten Filtrats wurden nacheinander mit Carrez I und Carrez II versetzt und mit 1 m NaOH auf pH 8 eingestellt, mit aqua dest. auf 50 ml im Meßkolben aufgefüllt und anschließend filtriert (S+S 595 1/2).

Entsprechend den Anweisungen für den Test wurde die Anfärbung mit den Chemikalien in Halbmikroküvetten durchgeführt. Die photometrische Bestimmung erfolgte in einem Zwei-Strahl-Spektrometer (ZEISS, DM4) bei einer Wellenlänge von 540 nm.

3 Versuchsansatz für den Methodenvergleich

Da mit den Verfahrensschritten der Probenvorbereitung unterschiedliche Varianzen verbunden sind, wurde für den Methodentest ein hierarchischer Ansatz gewählt.

1. Faktor: Probenteilung der Gesamtmenge Kartoffeln (Kartoffelprobe)
2. Faktor: Teilung des Filtrats und Membranfiltration (Aliquot)
3. Faktor: Bestimmungsmethoden (Methode)



Der Methodenvergleich wurde an zwei Proben aus einer Grundgesamtheit von Kartoffeln der Sorte "Nicola" durchgeführt. Die Varianz der Stichproben wurde an zwei zusätzlichen Proben untersucht, deren Nitratgehalt nur mit der HPLC bestimmt wurde.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Methodenvergleich zur Nitratbestimmung in Kartoffeln der Sorte „Nicola“

Die Nitratwerte lagen mit beiden Methoden zwischen 180 und 277 mg/kg Frischsubstanz (FS). Bei der HPLC betrug die Spanne innerhalb aller Bestimmungen 47 mg/kg FS bei einem Variationskoeffizienten (Vk) von 5,4 %, beim Enzym-Farbttest war die Variation mit einer Spanne von 97 mg/kg FS und einem Vk von 9,9 % etwas größer (Tab. 1). Die Werte liegen damit in einem Bereich, der auch in anderen Untersuchungen für mittelfrühe Sorten (160-300 mg Nitrat/kg FS) gefunden wurde (GRASSERT et al., 1990).

Tabelle 1: Mittelwerte und Variationskoeffizient der unterschiedlichen Methoden zur Nitratbestimmung in Kartoffeln (mg Nitrat/kg FS)

Table 1: Means and coefficient of variance from different methods of nitrate analysis in potatoes (mg nitrate/kg FM)

	Nitratgehalt		
	HPLC	Farbtest	Diff. HPLC-Farbtest
Anzahl	18	18	18
MW	214,4	217,9	-3,5
Vk (%)	5,4	9,9	

Aufgrund der Abweichung innerhalb der Meßreihen für den Enzym-Farbtest und der großen Differenz zur HPLC wurden 2 Probenpaare als Ausreißer (außerhalb des Vertrauensbereiches von 95 %) aus der weiteren Auswertung herausgenommen.

Für den Versuch wurden dann eine Varianzanalyse mit hierarchischen Ansatz mit dem Programm SPSS berechnet (Tab.2).

Tabelle 2: Varianztabelle zum Methodentest für die Bestimmung von Nitrat in Kartoffeln

Table 2: Table of variance for test of methods for analysis of nitrate in potatoes

Varianzursache	MQ	FG	F-Wert	Sign.F
Kartoffelprobe	262,9	1	3,542	0,072
Aliquot	427,6	2	5,761	0,009
Methode	288,0	1	3,880	0,060
Wiederholung	89,2	2	1,201	0,318
Restvarianz	264,0	25		

Das Ergebnis der Varianzanalyse zeigt, daß bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % zwischen den Bestimmungsmethoden HPLC und Enzym-Farbtest keine Unterschiede bestehen ($F = 3,880$ bei $p = 0,060 > 0,05$, Tab. 2). Allerdings hat der Farbtest eine etwas größeren Streuung, HPLC: $Vk = 1,85 \%$, Enzym-Farbtest $Vk = 6,56 \%$ (Tab.3).

Tabelle 3: Probenzahl (n), Mittelwert (x in NO_3^- /kg FS) und Variationkoeffizient (Vk in %) im Vergleich der Proben (1,2), des Aliquots (1,2,3), der Methoden (1 = HPLC, 2 = Farbtest) und der Wiederholungen (1,2,3)

Table 3: Number of samples (n), mean (x in NO_3^- /kg FM) and coefficient of variance (Vk in %) for comparison of samples (1,2), of aliquots (1,2,3), of methods (1 = HPLC, 2 = colour-test) and of replicates (1,2,3)

	1			2			3		
	n	x	Vk	n	x	Vk	n	x	VK
Kartoffelprobe	18	213	6,22	14	218	1,78			
Aliquot	10	222	2,42	12	213	4,34	10	210	5,95
Methode	16	218	1,85	16	212	6,56			
Wiederholung	10	216	4,49	12	216	3,87	10	212	6,52

Die Probenahme der Kartoffeln aus der Grundgesamtheit hat in diesem Versuch nicht zu signifikanten Unterschieden geführt, so daß in diesem Fall 30 Knollen eine ausreichend große Stichprobe waren ($F = 3,542$, $p = 0,072 > 0,05$, Tab. 2).

Dies steht zunächst in Einklang mit Untersuchungen von PUTZ und BERGTHALLER (1989), wonach Proben mit Knollenzahlen von 25, 50, 75 und 100 nicht zu signifikanten Differenzen im Nitratgehalt führten. Die Streuung liegt in der gleichen Größenordnung wie bei den Methoden (Tab. 3).

Die Probenteilung nach der ersten Aufbereitungsstufe der Kartoffeln zusammen mit der Membranfiltration und der Zugabe des Carrez-Reagenz führte in dieser Untersuchung zu signifikanten Unterschieden der Meßwerte ($F = 5,761$, $p = 0,009 < 0,05$, Tab. 2). Neben einem zufälligen Fehler bei der Probenteilung könnten eine nicht ausreichende Homogenität des Filtrats, Veränderungen in der Membranfiltration oder die Zugabe der Carrez-Lösung Ursachen für die Differenzen sein.

Zusätzlich wurden noch zwei weitere Teilproben mit der HPLC-Methode untersucht, um eine bessere Aussage über die Variation der Grundgesamtheit treffen zu können. Die Varianztabelle (Tab. 4) zeigt, daß bei nunmehr 4 Proben signifikante Unterschiede bei den Teilproben auftreten, wobei die Proben 1 und 2 des ersten Vergleichs aber weiterhin als gleich angesehen werden können (Tab. 5).

Tabelle 4: Varianztabelle zur Probenteilung und Untersuchung mit der HPLC-Methode
Table 4: Table of variance relating to sample sharing and test with HPLC-method

Varianzursache	MQ	FG	F-Wert	Sign.F
Kartoffelprobe	4010,0	3	47,372	0,000
Aliquot	22,6	2	0,267	0,768
Wiederholung	82,3	2	0,973	0,390
Restvarianz	84,6	28		

D. h. der Vergleich einer größeren Stichprobenzahl läßt demnach den Schluß zu, daß der Stichprobenumfang von 30 Knollen nicht immer für die genaue Bestimmung des Mittelwerts der Grundgesamtheit ausreicht, obwohl auch andere Autoren davon ausgehen, daß damit akzeptable Vertrauensgrenzen erreicht werden können (WEBER und PUTZ, 1993).

Tabelle 5: Vergleich der Mittelwert der verschiedenen Teilproben (mg Nitrat/kg FS)
Table 5: Comparison of means of different partial samples (mg nitrate/FM)

Probennummer	Nitrat ^{*)}
1	219,6a
2	216,6a
3	255,9c
4	241,9b

*) unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede auf dem Signifikanzniveau von $p = 0,05$ (Tukey-Test)

Die Probenteilung nach dem ersten Aufbereitungsschritt führte in dieser erweiterten Untersuchung nicht mehr zu Unterschieden (Tab. 4, Aliquot: $F = 0,267$, $p = 0,768 > 0,05$).

4.2 Vergleich von Nitratbestimmungsmethoden bei verschiedenen Kartoffelsorten

Nachdem die beiden Bestimmungsmethoden im Vergleich bei einer Sorte keinen signifikanten Unterschied gezeigt haben, sollte geprüft werden, ob Sortenunterschiede eine weitere Variation bringen würden. In einem ergänzenden Versuch wurden deshalb 9 Kartoffelsorten mit beiden Methoden mit einem Stichprobenumfang von 30 Knollen untersucht.

In dieser Untersuchung lag der Wert des Farbtests im Durchschnitt der Proben um 6,9 % niedriger als der HPLC-Wert bei Einzelabweichungen von bis zu 16 % (Tab. 6).

Damit lag die durchschnittliche Abweichung deutlich über der Differenz im Methodenvergleich (Diff = 1,17 % von HPLC-Wert, ohne Probennr. 10 und 18). Nach dem paarweisen Mittelwertvergleich muß nach dem t-Test davon ausgegangen werden, daß bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 1,7$ % die Mittelwerte verschieden sind. Bei dem Vergleich der Sorten lieferte damit der Farbtest im Mittel 7 % niedrigere Werte als die HPLC.

Die Unterschiede zwischen den Sorten müssen weitgehend als sortentypisch interpretiert werden, da die anderen genannten Einflußfaktoren durch den Anbau an einem Standort weitgehend gleich gehalten wurden. Die hier gefundenen relativ hohen Werte der Sorten Linda und Nicola sowie der niedrigen Werte von Agria werden in anderen Untersuchungen (REENTS et al., 1997 a, b, BÖHM und DEWES, 1995) in ähnlicher Relation gemessen. Allerdings zeigten die Sorten Ilona und Rita starke Abhängigkeit vom Anbaujahr.

Tabelle 6: Nitratbestimmung in Kartoffeln bei verschiedenen Sorten mit den Methoden HPLC und Enzym-Farbtest (mg Nitrat/kg FS)

Table 6: Analysis of nitrate in potatoes for different varieties with two methods HPLC and Enzyme-Colour-Test (mg nitrate/kg FM)

Sorte	HPLC	Farbtest	Diff: HPLC-Farbtest
Rita	107	90	17
Ilona	156	132	24
Bettina	116	107	9
Agria	56	52	4
Satina	216	208	8
Pamir	254	231	23
Linda	230	203	27
Nicola	228	226	2
Aula	169	177	-8
Mittelwert	170,2	158,4	11,8

5 Bewertung

Im Vergleich der Methoden zur Bestimmung von Nitrat in Kartoffeln haben die Methoden HPLC und Enzym-Farbtest von Boehringer zwar keinen signifikanten Unterschied ergeben, der Farbtest hatte aber eine größere Streuung. In der Untersuchung über verschiedene Sorten führte der Farbtest zu niedrigeren Werten.

Trotzdem bietet sich der Farbtest bei gleicher Empfindlichkeit als Alternative zur Nitratbestimmung in Kartoffeln für Labors an, die nicht über eine HPLC verfügen. Allerdings ist die Vorbereitung der Meßlösung etwas aufwendiger und bietet zusätzliche Fehlerquellen, die Ursache für die größere Streuung sein können.

6 Zusammenfassung

Zur Bestimmung von Nitrat in Kartoffeln wurden die Methoden HPLC und der Enzym-Farbtest von Boehringer geprüft. Der direkte Vergleich beider Methoden bei der Sorte Nicola ergab bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % keinen Unterschied. Der Farbtest hatte allerdings eine größere Varianz. In der Untersuchung über mehrere Sorten lieferte der Farbtest geringfügig niedrigere Werte als die HPLC.

7 Summary

H. J. REENTS und S. VON TUCHER: *Analysis of nitrate in potatoes with different methods (Bestimmung von Nitrat in Kartoffeln mit unterschiedlichen Methoden)*

Agribiol. Res. 50, 4, 1997

The two methods HPLC and the Enzyme-Colour-Test from Boehringer were tested for the analysis of nitrate in potatoes. For the variety Nicola there was no difference on the significance level of 95 % between the two methods used. But the results of the Enzyme-Colour-Test varied in a wider range. In a test with several varieties the results of the Enzyme-Colour-Test were slightly lower than that of HPLC.

Danksagung

Frau Jutta Fischer, Boehringer, Mannheim, sei herzlich gedankt für Hinweise zur Analyse und für die Bereitstellung der Farbtest-Kits.

8 Literatur

BÖHM, H. und DEWES, T., 1995: Qualitäts- und Lagereigenschaften ausgewählter Kartoffelsorten aus ökologischem Anbau. - In: Beitr. z. 3. Wissenschaftstagung z. Ökol. Landbau vom 21.-23. 2. 1995 an der CAU zu Kiel, hrsg. T. Dewes und L. Schmitt, 45-48

Boehringer (o. J.): Arbeitsanleitung zum Nitrit/Nitrat Farbtest Nr. 1746081

GRASSERT, V., VOGEL, J., NEUBAUER, W. UND BARTEL, W., 1990: Aspekte des Nitratgehalts von Speisekartoffeln unter Berücksichtigung mehrjähriger Ergebnisse. Kartoffelbau 41, 398-400

KOLBE, H., 1987: Untersuchungen zur Bedeutung des Nitratgehaltes in Kartoffelknollen. Kartoffelbau 38, 105-109

KOLBE, H., 1996: Einflußfaktoren auf die Inhaltsstoffe der Kartoffel, Teil IV: Nitrat. Kartoffelbau 47, 259-264

NEUBAUER, W. und PIENZ, G., 1993: Der Nitratgehalt der Kartoffel im Ergebnis von Feldexperimenten zu umweltschonender Anbautechnik. Agribiol. Res. 46, 120-125

PUTZ, B. und BERGTHALLER, W., 1989: Nitrat in Kartoffeln. Kartoffelbau 40, 287-293

REENTS, H. J., MÖLLER, K., TUCHER, S. VON und KAINZ, M., 1997a: Aspekte der Sortenwahl bei Kartoffeln für den ökologischen Landbau. - Beitr. z. 4. Wissenschaftstagung z. Ökol. Landbau 3.-4. 3.1997 an der Rhein. F.-W.-Univ. Bonn, hrsg. U. Köpke und J.-A. Eisele, 354-360

REENTS, H. J., MÖLLER, K., TUCHER, S. VON, KAINZ, M., GERSTNER, G. und ENGEL, K.-H., 1997b: Qualitätseigenschaften von ökologisch angebauten Kartoffeln in Abhängigkeit von Sorte und Vorkeimen. - DGQ Deut. Ges. f. Qualitätsforsch., XXXII. Vortragstagung, 337-340

VILSMEIER, K., 1984: Bestimmung von Dicyandiamid, Nitrit und Nitrat in Bodenextrakten mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Z. Pflanzenern. Bodenkde. 147, 264-268

WEBER, L. und PUTZ, B., 1993: Untersuchungen zur Analytik des Nitrats in Kartoffeln. Bericht über die 15. Kartoffel-Tagung 1993, Granum-Verlag Detmold, 33-44

WEBER, L. und PUTZ, B., 1995: Nitrat in Kartoffeln – ein Methodenvergleich. Bericht über 17. Kartoffel-Tagung 1995, Granum-Verlag Detmold, 56-64