

VI. NEUE UNTERSUCHUNGSMETHODEN UND PROJEKTE

6.1 Furan in Lebensmitteln mittels Mikrodestillation

Dass Furan in Lebensmitteln vorkommt, ist bereits seit 1938 bekannt. Aber erst nach umfangreichen toxikologischen Prüfungen zeigte sich 1993, dass Furan im Tierversuch karzinogen ist. Daraufhin stuft die International Agency for Research on Cancer der WHO (IARC) Furan als möglicherweise krebserregend für den Menschen ein. 2004 informierte die US Food and Drug Administration (FDA) die Öffentlichkeit über Furangehalte in Lebensmitteln und publizierte eine Bestimmungsmethode für Furan, die auf einer Dampfraum-GC/MS-Methode basierte.

Die Wahl fiel auf die Dampfraum-GC/MS einerseits aufgrund des geringen Siedepunktes von Furan und andererseits wegen des hohen Verbreitungsgrads solcher Messsysteme. Dabei ist zu beachten, dass die vollständige Methode eine Standardaddition mit insgesamt sieben Ansätzen und einer oder mehreren Orientierungsmessungen beinhaltet. Bei einer Inkubationszeit von 30 min stellt die Methode damit ein sehr zeitaufwändiges Messverfahren dar.

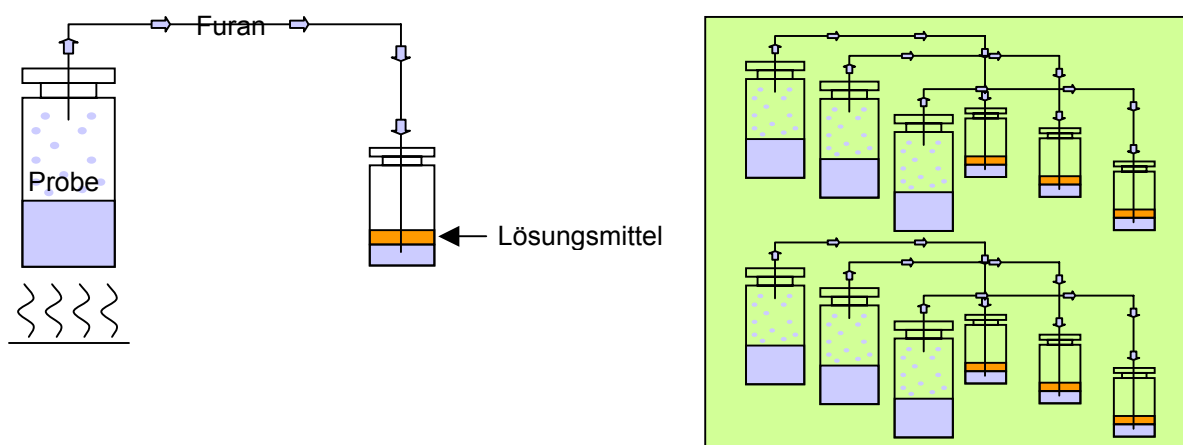


Abbildung: Schematischer Aufbau des MicroDistiller©, Eppendorf, Hamburg

Als Alternativen zu diesem zeitaufwändigen Verfahren bieten sich eine einfache Isotopenverdünnungsanalyse, purge-and-trap-Verfahren und die Mikrodestillation an.

Bei der Mikrodestillation handelt es sich um eine Wasserdampfdestillation im Mikromaßstab (Schema s. Abbildung), bei der Furan aus der Probe heraus in eine Lösungsmittelvorlage destilliert wird. Aus dem Lösungsmittel-extrakt kann dann der Furangehalt bestimmt werden. Mit der automatisierten Methode steht damit ein Verfahren zur Verfügung, mit dem sehr viel schneller und effizienter Furan in Lebensmitteln bestimmt werden kann. Simultan können sechs Proben aufgearbeitet werden. Darüber hinaus kann mit dieser Methode Furan auch in Lebensmitteln bestimmt werden, bei denen die bisher angewandte Dampf-raum-Methode kaum anwendbar war, wie etwa bei Kakao und Kakaoprodukten. Erste Untersuchungen im Rahmen der Methodenentwicklung zeigten in acht untersuchten Kakaopulvern einen Furanmittelwert von $8,6 \mu\text{g}/\text{kg}$ wobei der

Furanbestimmung nun auch in Kakao und -Produkten möglich

Maximalwert bei 22,3 µg/kg, der Minimalwert bei 4,6 µg/kg und der Medianwert bei 6,5 µg/kg lag. Ein kakaohaltiges Getränkpulver mit Zucker lag unterhalb der Nachweisgrenze. Ein Vergleich beider Methoden in anderen Matrices zeigt vergleichbare Ergebnisse (Kuballa T. et. al. Lebensmittelchemie (2006), **60(2)**, 44).

6.2 Nachweis von pathogenen *Yersinia enterocolitica* in Lebensmitteln mittels kulturellen Methoden und der PCR

Durch *Y. enterocolitica* hervorgerufene Erkrankungen beim Menschen stellen nach der Salmonellose und der Campylobacteriose die dritthäufigste bakteriell bedingte Magen-Darm-Infektion in Deutschland dar. Um über einen zuverlässigen und schnellen Nachweis dieses Zoonoseerregers in Lebensmitteln zu verfügen wurde ein kombiniertes Verfahren aus kulturellen Methoden und der PCR entwickelt.

Eine Infektion mit pathogenen *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) ruft beim Menschen eine akute Entzündung des Darmes hervor. Die Inkubationszeit liegt zwischen vier und sieben Tagen. Die Krankheitsdauer variiert zwischen wenigen Tagen und zwei Wochen. Es werden verschiedene Symptome wie Fieber, Übelkeit, blutiger Stuhl, Durchfall, Bauchschmerzen aber auch Entzündungen im Halsbereich beobachtet. Als Spätfolgen können entzündliche Reaktionen der Gelenke, der Haut oder der Augen auftreten.

Lebensmittel als Infektionsquelle von pathogenen *Y. enterocolitica* für den Mensch

Pathogene *Y. enterocolitica* können im Darm und in den Mandeln von Säugtieren – vor allem von Schweinen – vorkommen, ohne bei diesen Tieren Krankheiten hervorzurufen. Kontaminierte Lebensmittel tierischer Herkunft gelten als Infektionsquelle für den Menschen. Insbesondere der Verzehr von rohem oder nicht ausreichend erhitztem Schweinefleisch und -erzeugnissen steht in engem Zusammenhang mit dem Auftreten der Yersiniose beim Menschen.

Yersinien sind gram-negative Stäbchenbakterien, die in der Lage sind sich auch bei Kühlschranktemperaturen zu vermehren. Die Art *Y. enterocolitica*

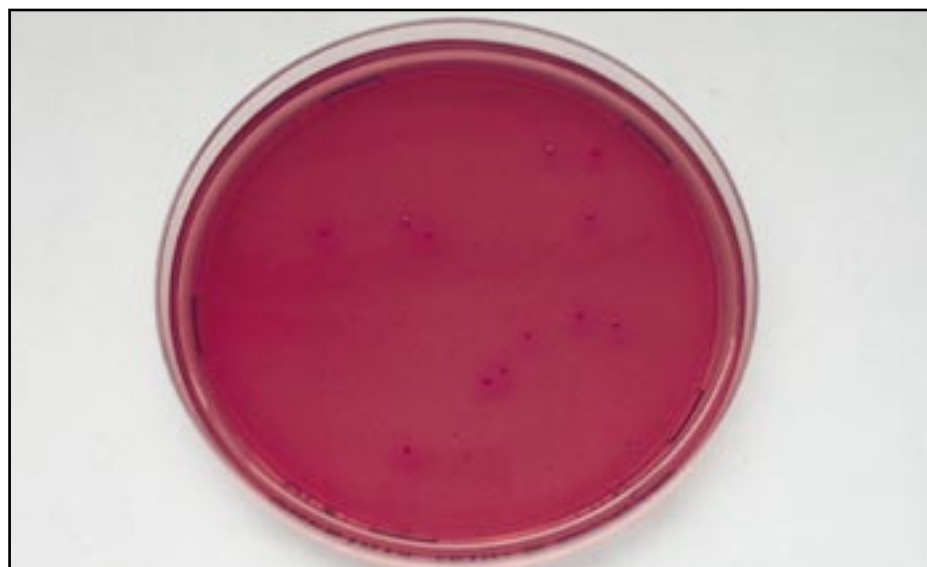


Abbildung: *Yersinia enterocolitica* auf Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin- (CIN-) Agar

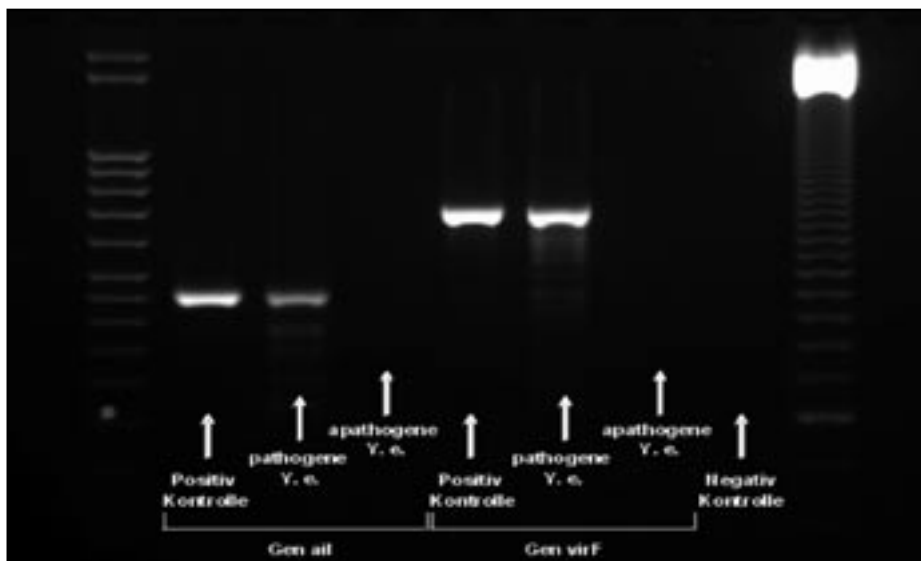


Abbildung: Gelelektrophoretische Auftrennung von pathogenen und apathogenen *Yersinia enterocolitica*, inkl. Kontrollen

umfasst eine Gruppe von Stämmen, die jedoch nicht alle Erkrankungen bei Menschen hervorrufen. Zahlreiche apathogene Umweltstämme werden dem Biovar 1A zugeordnet. Biovar 1B beinhaltet humanpathogene, vor allem in Amerika vorkommende Stämme, und zu den Biovaren 2, 3, 4 und 5 zählen humanpathogene, europäische Stämme.

Als diagnostische Verfahren zum Nachweis pathogener *Y. enterocolitica* stehen zum einen die kulturelle Untersuchung, zum anderen molekularbiologische Verfahren wie die PCR zur Verfügung. Die kulturellen Verfahren umfassen die Anreicherung, Isolierung, biochemische Bestätigung der Erreger sowie deren Untersuchung auf Pathogenität und sind somit mit hohem zeitlichem Aufwand verbunden. Darüber hinaus wird der kulturelle Nachweis in Lebensmitteln durch unterschiedliche Probenmaterialien und die häufig stark vorhandene Begleitflora behindert.

Der Nachweis mittels PCR ist im Vergleich zu kulturellen Verfahren mit einem geringeren Zeitaufwand bei gleichzeitig höherer Sensitivität und Spezifität verbunden. Es werden bestimmte Gene nachgewiesen, die verantwortlich für die Fähigkeit der Bakterien sind, Erkrankungen bei Menschen hervorzurufen. Der alleinige Einsatz der PCR erlaubt jedoch keine Beurteilung der Lebensfähigkeit der nachgewiesenen Bakterien. Diese ist durch kulturelle Methoden zu überprüfen.

Vor diesem Hintergrund wurde ein Verfahren entwickelt und anhand verschiedener Lebensmittel validiert, welches die vorteilhaften Elemente beider diagnostischer Methoden kombiniert. Bei diesem Verfahren wird zunächst eine kulturelle Anreicherung in selektiven sowie nicht-selektiven Flüssigmedien durchgeführt. Im Anschluss folgt ein PCR-Screening, mit dessen Hilfe innerhalb eines Tages eine Aussage über die An- oder Abwesenheit der Erreger ermöglicht wird. Im Falle eines positiven PCR-Ergebnisses erfolgt die kulturelle Isolation mit anschließender biochemischer und serologischer Bestätigung der Erreger. Darüber hinaus wird mittels einer PCR auf die Gene *ail* und *virF* eine Überprüfung der Pathogenität der isolierten Stämme durchgeführt.

Positive PCR-Ergebnisse in Schweinehackfleisch

Im Jahr 2006 wurden 86 Lebensmittelproben, überwiegend vom Schwein, auf pathogene *Y. enterocolitica* untersucht. Dabei wurden in mehreren Proben Schweinehackfleisch positive PCR-Ergebnisse hinsichtlich pathogener *Y. enterocolitica* erzielt. In Deutschland wird Schweinehackfleisch vielfach roh verzehrt. Mit pathogenen *Y. enterocolitica* kontaminiertes Schweinehackfleisch kann somit beim Verzehr in rohem oder nicht vollständig durcherhitztem Zustand zu Erkrankungen des Menschen führen. Mit Hilfe dieser neuen Methode sollen auch künftig regelmäßige Untersuchungen von Proben, vor allem von rohem Hackfleisch, durchgeführt werden. Um Infektionen des Verbrauchers zu vermeiden, ist darüber hinaus das Einhalten bestimmter lebensmittelhygienischer Regeln im Privathaushalt von großer Bedeutung. So sollte ein Kontakt des rohen Fleisches zu verzehrfertigen Lebensmitteln vermieden werden, um Kreuzkontaminationen zu verhindern.

6.3 Histologie bei Fleischerzeugnissen – Einblick in die Gewebestrukturen bringt Unerwartetes zu Tage

Unzulässige Praktiken bei der Fleisch- und Wurstwarenherstellung lassen sich mit histologischen Methoden nachweisen. Die Verarbeitung von Bindegewebspulver in Kochschinken oder die Wiederverarbeitung von Wurstplatzern in Brühwürsten der Spitzenqualität kann mit einem Blick durch das Mikroskop entdeckt werden.

Die Histologie beschäftigt sich mit biologischen Geweben. Dünne Schnitte durch das Gewebe werden mit Farbstoffen angefärbt. Die Beurteilung der gefärbten Schnitte erfolgt dann unter dem Mikroskop. Fleisch- und Wurstwaren werden aus tierischen Geweben, wie Muskel-, Fett- und Bindegewebe hergestellt. Histologische Techniken ermöglichen daher einen Blick in das Innere der Wurst. Aktuelle Fragestellungen zur Zusammensetzung von Fleisch- und Wurstwaren werden nun auch mit den Methoden der Histologie bearbeitet.

Maschinell gewonnenes Restfleisch, das sogenannte Separatorenfleisch, kann unter bestimmten Voraussetzungen zu Fleischerzeugnissen verarbeitet werden. Die Verarbeitung muss aber kenntlich gemacht werden. Häufig unterbleibt jedoch eine entsprechende Kennzeichnung. Separatorenfleisch enthält abhängig von der Herstellungstechnologie vom Knochen abgeriebene Teile. Mit bestimmten Färbetechniken lassen sich die bei der Verarbeitung von Separatorenfleisch in die Wurstwaren gelangten Knochenpartikel histologisch nachweisen. Liegt ihr Anteil über 1,5 Partikel pro cm², wird von einer Verarbeitung des Restfleisches ausgegangen.

Wiederverarbeitung von Würsten histologisch nachweisbar

Bruchstücke von Würsten oder sogenannte Wurstplatzler werden bei der Wurstproduktion wiederverarbeitet. Bei Würsten der Spitzenqualität mit hervorhebenden Hinweisen ist dies aber nicht möglich. Derartige Wurstwaren zeichnen sich durch die besondere Auswahl des Ausgangsmaterial aus. Wiederverarbeitete Brühwurst erfüllt diese Anforderungen nicht, sie weist nicht mehr die optimalen Verarbeitungseigenschaften wie ein unter Zusatz von Trinkwasser und Salzen aus rohem zerkleinertem Fleisch hergestelltes Brät auf. In Würsten der Spitzenqualität erwartet der Verbraucher daher keine wiederverarbeitete Wurst. Er sieht sich vielmehr bei deren Verarbeitung getäuscht. Der Nachweis der Wiederverarbeitung gelingt mit der histologischen Untersuchung. Wiederverarbeitete Brühwurstteile haben eine typische Struktur im histologischen Bild.

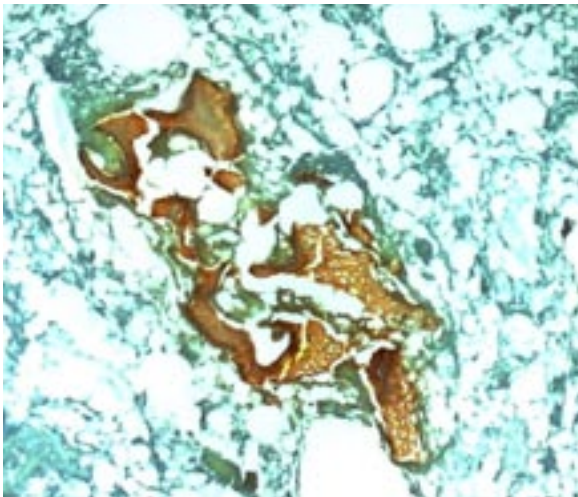


Abbildung: Knochenpartikel in Separatorenfleisch

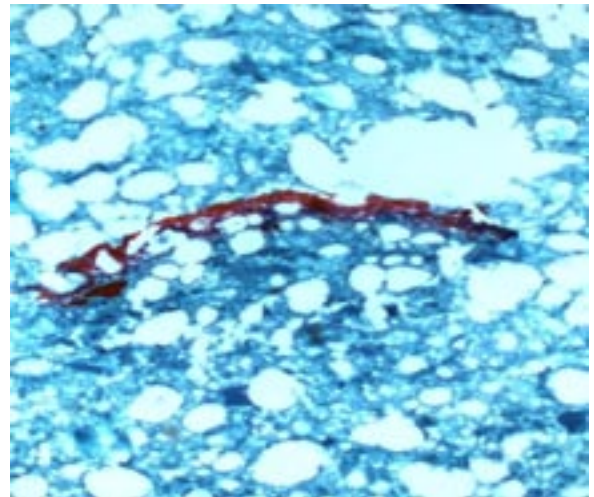


Abbildung: Teil einer wiederverarbeiteten Brühwurst in einer Brühwurst

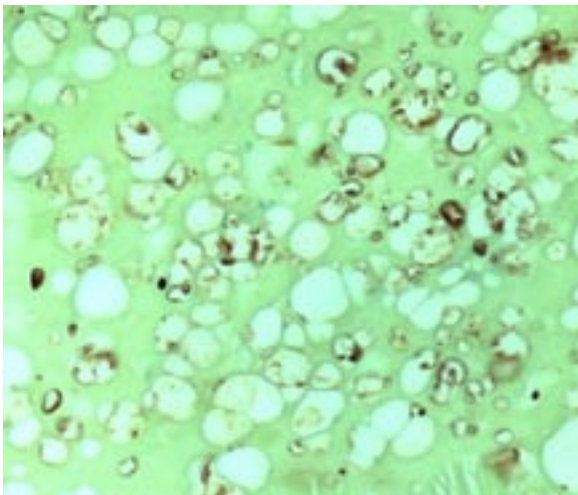


Abbildung: Verarbeitung von Stärke (dunkle Partikel) im Kochschinken-Imitat

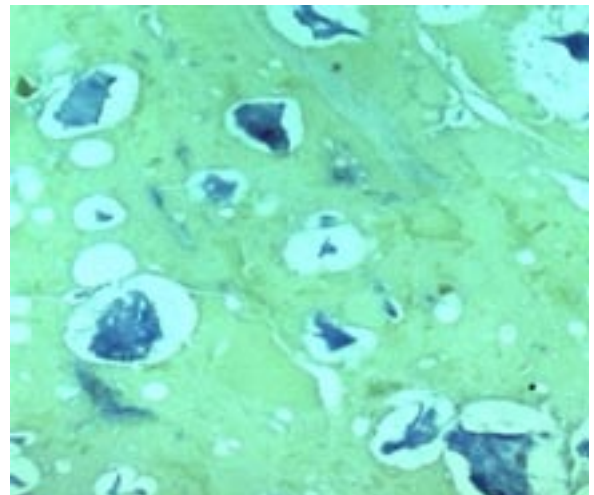


Abbildung: Unzulässige Verarbeitung von Bindegewebspulver (blaue Partikel) in Kochschinken

Mit speziellen Färbungen ist sogar der Nachweis der Räucherung im Randbereich der Würste möglich. Kochschinkenimitate bestehen nicht wie der Kochschinken aus im natürlichem Verbund verbleibender gewachsener Skelettmuskulatur. Sie sind vielmehr mit einer speziellen Herstellungstechnologie aus kleineren Fleischstücken zusammengefügt und weisen einen hohen Anteil an zerkleinertem Muskeleiweiß auf. Oft nehmen sie schon den Produktcharakter einer groben Brühwurst an. Die zerkleinerte Einweißmasse ist zudem häufig mit Stärke angereichert. Die Erzeugnisse weisen ein flaches Aroma und einen faden Geschmack auf und dürfen nicht mehr unter der Bezeichnung „Schinken“ in den Verkehr gebracht werden. Eine nicht zulässige Verarbeitung von Bindegewebspulver kann ebenso mit den Möglichkeiten der histologischen Untersuchung nachgewiesen werden. Anhäufungen von atypisch granulären Bindegewebsteilen in der zerkleinerten Masse sind ein Indiz für die unzulässige Mitverarbeitung von Bindegewebspulver.

Unzulässige Verarbeitung von Bindegewebspulver wird sichtbar

6.4 Effiziente Analyse von Taurin in Getränken mittels FTIR und Aminosäureanalysator zur lebensmittelrechtlichen und toxikologischen Bewertung

Taurinhaltige Getränke werden seit einigen Jahren verstärkt als sogenannte Energydrinks auf dem Markt angeboten, obwohl der wissenschaftliche Nachweis dieser Wirkung bislang nicht geführt werden konnte. Nachdem Taurin zunächst nur in alkoholfreien Getränken enthalten war, werden mittlerweile auch alkoholhaltige Mischgetränke (Alkopops) mit Taurinzusatz angeboten, wobei die Hersteller dieser Erzeugnisse häufig statt Spirituosen auf Wein, Fruchtwein und Bier als Alkoholgrundlage ausweichen, um die Alkopop-Sondersteuer zu umgehen.

FTIR erlaubt eine Screening-Untersuchung auf Taurin in nur 2 min

Neben dem Einsatz der Aminosäureanalytik (ionenchromatographische Trennung mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung) als Referenzmethodik wurde am CVUA Karlsruhe erstmals die FTIR-Spektroskopie als Screeningmethode zur Bestimmung von Taurin in Getränken angewendet. Im Vergleich zur Referenzmethode ist FTIR-Spektroskopie wesentlich einfacher in der Routineanalytik durchzuführen und die Ergebnisse liegen innerhalb weniger Minuten vor.

Die FTIR-Spektren wurden mit einem Gerät gemessen, das speziell für die Analyse von Getränken konstruiert wurde (Foss Winescan FT 120). Das Messsystem umfaßt eine Injektionseinheit für Flüssigproben und thermostatisiert die Getränke automatisch. Nur zwei Minuten werden für eine FTIR-Messung benötigt.

Die Spektraldaten werden mit einer 36- μm -Transmissionszelle im Wellenzahlbereich 930–5000 cm^{-1} gegen Wasser aufgenommen. Es besteht ein definierter Zusammenhang zwischen der Konzentration eines Analyten und der Absorption bzw. Extinktion von ausgewählten Wellenlängenbereichen. Welche Bereiche für einen bestimmten Parameter optimal sind, muss das System anhand von Kalibrierproben lernen. Dabei wird der bestmögliche Zusammenhang zwischen den Absorptionswerten und den Referenzwerten mittels Rechenverfahren (PLS) hergestellt. Aufbauend auf dieser Basiskalibrierung lassen sich nun unbekannte Proben mittels FTIR-Analyse messen. Die Werte lassen sich dabei durch weitere Kalibrierungsmaßnahmen (Slope-Intercept-Korrektur, PLS) noch verbessern und optimal an die Probenmatrix anpassen.

Aminosäureanalysator oder FTIR konnten im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung erfolgreich zur Überprüfung der in der Aromenverordnung (300 mg/l) bzw. für alkoholfreie Getränke aufgrund von Allgemeinverfügungen bzw. Ausnahmegenehmigungen (bis zu 4000 mg/l) erlassenen Taurinhöchstmengen eingesetzt werden.

Dabei wurde festgestellt, daß zunehmend Energydrinks mit überdosierten Taurinzusätzen (bis 10.000 mg/l) in den Verkehr gebracht werden. Missbräuchlich werden diese Erzeugnisse mit Verkehrsbezeichnungen, wie „Energydrink Grundstoff“ samt Verdünnungshinweis gekennzeichnet, obwohl sie auch in unverdünntem Zustand genießbar sind. Auf diese Weise sollen die Höchstmengen-Regelungen umgangen werden. Besonders kritisch sind alkoholhaltige Mischgetränke mit Taurin zu bewerten. Neben der gegenüber der normalen Ernährung erheblich größeren Taurinaufnahme sind hier möglicherweise toxiologisch relevante Wechselwirkungen mit Ethanol zu berücksichtigen.

6.5 Optimierte Extraktion von Cumarin aus Backwaren und anderen Lebensmitteln

Cumarin ist ein Bestandteil natürlicher Gewürze wie etwa von Cassiazimt, der vielfach in allen Arten von Lebensmitteln und insbesondere zur Herstellung von Feinen Backwaren verwendet wird. Die Toxizität von Cumarin hat einige Bedenken hervorgerufen. Die aktuell geltende Aromen-Verordnung nennt einen Höchstwerte von 2 mg/kg für Lebensmittel und Getränke im allgemeinen und von 10 mg/l für alkoholische Getränke. Eine effiziente Methode für die routinemäßige Analytik von Cumarin ist die Flüssigkeitschromatographie mit Diodenarray-Detektion.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass der Cumarin Gehalt einfach durch direkte Extraktion mit 80 %igem Methanol ohne Vorbehandlung (außer Homogenisierung) der Lebensmittel bestimmt werden kann. In einem Vorversuch wurde daher die Extraktion von Cumarin aus Backwaren mit Methanol (80 %), sowie einigen anderen Lösungsmitteln wie Ethanol (80 %), Acetonitril und Chloroform verglichen. Als bestes Lösungsmittel konnte Methanol (80 %) bestätigt werden (siehe Abb. auf der nächsten Seite), welches in den folgenden eingehenderen Optimierungsversuchen zur Extraktionsmethodik verwendet wurde.

80 %iges Methanol als bestes Lösungsmittel für die Extraktion von Cumarin bestätigt

Zunächst wurden statistisch geplante Screeningexperimente durchgeführt, um den Einfluss der Probenaufarbeitung (Ultraschall oder Rühren), der Lösungsmittelkonzentration (Methanol, 60 %, 80 %, 100 %), der Probeneinwaage (5 g, 10 g) und der Extraktionszeit (10 min, 30 min) auszutesten. Die Probenaufarbeitung hatte einen statistisch signifikanten Einfluss: Bei der Verwendung eines Magnetrührers war die Extraktionsrate signifikant höher als bei der Verwendung eines Ultraschallbades. Dieses Ergebnis wurde durch eine Serie von 46 Proben, die mit beiden Arten analysiert wurden, verifiziert. Im Durchschnitt war die Extraktionsausbeute mit Magnetrührer 3 % höher als mit Ultraschall. Deshalb wurde in allen weiteren Experimenten ein Magnetrührer eingesetzt.

Rühren besser als Ultraschall

Die Extraktionszeit hat im einem Zeitabschnitt von 10–30 Minuten keinen signifikanten Einfluss auf die Extraktionsausbeute. Die Methanolkonzentration und die Probeneinwaage zeigten die größten und hoch signifikante Auswirkungen auf die Extraktion von Cumarin. Diese beiden Parameter wurde deshalb in einem zweiten Schritt detaillierter untersucht.

Diese zweite Versuchsserie bestätigte, dass sowohl die Methanolkonzentration als auch die Probeneinwaage einen signifikanten Einfluss auf die Extraktion haben. Außerdem gibt es eine signifikante Wechselwirkung zwischen beiden Parametern und einen quadratischen Einfluss der Lösungsmittelkonzentration. Eine Extraktion mit einer Extraktionsausbeute von mehr als 90 % wird bei Methanolkonzentrationen von 80 % und darüber sowie einer Probeneinwaage von mehr als 10 g erreicht.

Für unsere Lebensmitteluntersuchungen wurden die folgenden optimierten Einstellungen für die Extraktion von Cumarin verwendet: Methanol 80 %, 15 g Probeneinwaage, Magnetrührer, 10 Minuten Extraktionszeit. Die optimierte Extraktionsmethode liefert einen Extrakt mit geringen Matrixstörungen und bildet keine Emulsionen, auch nicht bei fett- bzw. eiweißhaltigen Lebensmitteln (z. B. Milchprodukten). Die spätere Messung mit HPLC erfordert keine weitere Probenaufarbeitung. Die Methode ist sehr robust und die durchgeführten

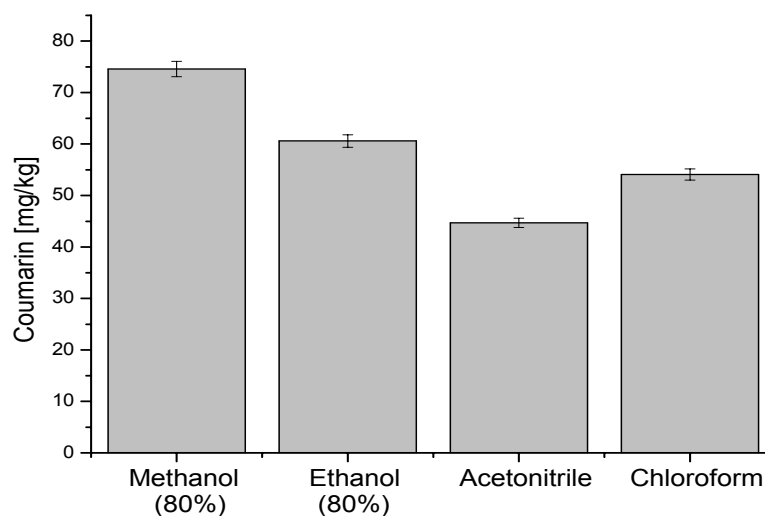


Abbildung: Vergleich verschiedener Lösungsmittel für die Extraktion von Cumarin aus Lebensmitteln

Experimente beweisen, dass geringe Abweichungen (z. B. bei der Extraktionszeit) keinen Einfluss auf die Richtigkeit der Ergebnisse nehmen. Die Validierungsergebnisse zeigen, dass unabhängig von den untersuchten Lebensmittelgruppen zufriedenstellende Präzisionen im Bereich von 0,60 und 3,25% und eine Richtigkeit zwischen 0,02 und 10,01% erreicht wurden. Die Validierungsdaten beweisen außerdem, dass die Bedingungen, die für Backwaren optimiert wurden, auch auf andere Matrices wie Milchprodukte übertragen werden können. Cumarin zeigt eine hervorragende Linearität im Bereich zwischen 0,1 und 40 mg/l mit einem Regressionskoeffizienten größer als 0,9999. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze liegen bei 0,1 mg/l bzw. 0,3 mg/l für Getränke und bei 0,5 bzw. 1,5 mg/kg für andere Lebensmittel.

In den untersuchten Lebensmitteln wurden nennenswerte Mengen an Cumarin in Backwaren und Frühstückscerealien (im Durchschnitt 9 mg/kg) gefunden mit Höchstkonzentrationen von bis zu 88 mg/kg in Zimtsternen. Andere Lebensmittel wie Liköre, Wodkas, Glühwein und Milchprodukte besaßen keine Cumarinkonzentrationen über dem Höchstwert der AromenV von 2 mg/kg. Weitere Informationen über Cumarin sind in Kapitel 2.4.4 zu finden.

6.6 Bestimmung von Begleitstoffen alkoholischer Getränke mittels Headspace-Trap Technik

Die Anwendung der neuen Headspace-Trap-Technik in Verbindung mit der Gaschromatographie (GC) wurde hinsichtlich ihrer Eignung zur Bestimmung von Begleitstoffen alkoholischer Getränke (z.B. höhere Alkohole und andere Stoffwechselprodukte der alkoholischen Gärung) in Zusammenarbeit mit der TU Dresden bewertet. Die Headspace-Trap ist eine Art „Falle“, mit der Substanzen aus dem Dampfraum über einer Probe adsorbiert werden können.

Die Headspace-Trap-Technik umfasst ein erweitertes Headspace-GC-System, welches die Anreicherung und Fokussierung der Analyten an der Trap vor der gaschromatographischen Trennung ermöglicht. Im Gegensatz zu früheren Techniken wie SPME oder SPDE, bei denen Sorptionsvolumina von 0,94 oder

5,99 mm³ auf kleinen Fasern oder beschichtete Kapillaren vorliegen, sind die von uns verwendeten Headspace-Traps eine Art Röhre, die mit einem festen Sorptionsmittel gepackt ist und dadurch ein signifikant größeres Volumen von 160 mm³ besitzt.

Im ersten Schritt werden die Analyten durch Überdruck aus den Probegefäßchen in die gekühlten Adsorptionstraps überführt. Dann findet eine Trocknung des Traps durch vorbeiströmendes Trägergas statt, so wird Feuchtigkeit aus der Probe entfernt. Zuletzt werden die Analyten thermisch desorbiert und vom Trägergas in die GC-Säule zur Trennung transportiert. Die Analyse wurde mit dem PerkinElmer TurboMatrix HS-110 Trap mit automatischem Headspace-Probengeber mit Trap-Anreicherung und Flammenionisations Detektor (Perkin Elmer, Shelton, USA) durchgeführt. Es wurde eine Kapillarsäule Rtx 1701 (60 m × 0,530 mm I.D.; 1,5 µm Schichtdicke) mit Phenylcarbonylphase von Restek für die Trennung eingesetzt. Das sog. AirToxic® Phasenmaterial, welches auch das vom Hersteller vorgeschlagene Standardmaterial ist, war am geeignetsten für die zu untersuchenden Analyten.

Im Vergleich zur statischen Headspace-Probenahme wurden 35–55fach größere Peakflächen erreicht. Für die Analyse alkoholhaltiger Getränke ist mit einem Trap-Anreicherungszyklus eine ausreichende Empfindlichkeit gegeben. Ist eine höhere Empfindlichkeit erforderlich, z. B. bei der Bestimmung von Begleitstoffen aus Blutproben, können bis zu vier Durchgänge (die sogenannte gepulste Headspace-Trap-Adsorption) zur Anreicherung nötig sein, um niedrigere Nachweisgrenzen zu erreichen. Eine hervorragende Übereinstimmung der Analyseergebnisse mit dem Europäischen Referenzverfahren für die Analyse von Begleitstoffen in Spirituosen wurde festgestellt ($R > 0,98$, $p = 0,0001$). Das vollautomatische Headspace-Trap-Verfahren benötigt minimale Probenaufarbeitung und ist leicht anzuwenden. (Literatur: Schulz K, Dressler J, Sohnius EM, Lachenmeier DW. Determination of volatile constituents in spirits using headspace trap technology. J Chromatogr A. 2007; **1145(1–2)**: 204–209)

Headspace-Trap-Technik kann eine bis zu 50fach höhere Nachweisempfindlichkeit erreichen

6.7 Untersuchung von Weinen auf Spuren-Aromastoffe mit hoher Aromawirksamkeit am Beispiel von 2-Methoxy-3-alkylpyrazin mittels HS-SPME bzw. HS-SPDE/GC/MS/MS

Methoxyalkylpyrazine sind aromawirksame Substanzen mit sehr niedrigen Geruchsschwellenwerten und daher von sehr hohem Aromapotential. Erst mit hochsensiblen Techniken lassen sich diese Substanzen im Nanogramm pro Liter-Bereich detektieren. Bei Sauvignon Blanc und Cabernet Sauvignon Weinen korrelieren die gefundenen Gehalte mit der Aromaprofilanalyse.

Methoxyalkylpyrazine sind aromawirksame Substanzen mit sehr niedrigen Geruchsschwellenwerten. Die vier wichtigsten Pyrazine in Trauben und Wein sind 2-Methoxy-3-isobutyl-, 2-Methoxy-3-isopropyl-, 2-Methoxy-3-sec-butyl- und 2-Methoxy-3-ethylpyrazin (Hartmann et al., 2002). Diese Verbindungen stellen aufgrund ihres sehr hohen Aromapotenzials einen Anreiz zur Manipulation von Weinen dar. So wurden im Jahr 2004 Verfälschungen von südafrikanischen Sauvignon Blanc Weinen aufgedeckt, wobei nachgewiesen werden konnte, dass diesen Weinen Pyrazine zugesetzt worden sind.

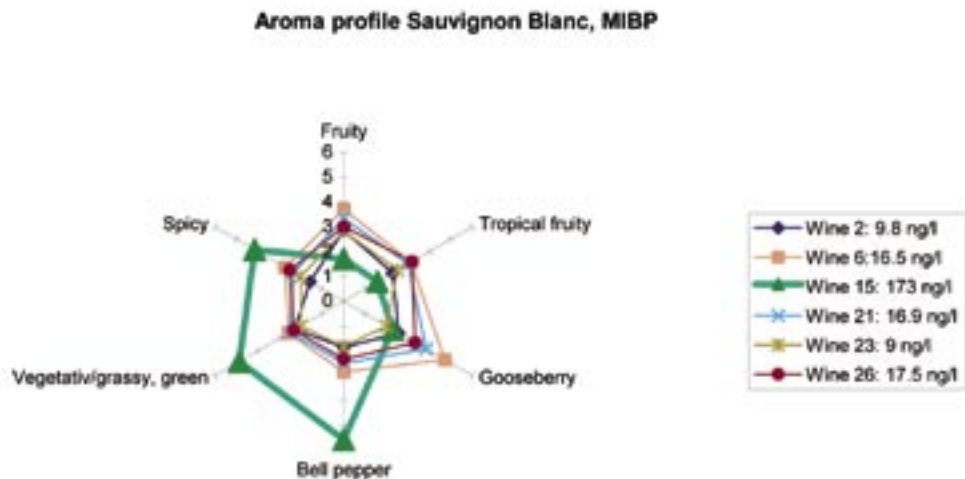


Abbildung: Aromaprofil Sauvignon Blanc

Daher wurde eine schnelle und arbeitszeitsparende Methode zur Bestimmung der genannten Pyrazine entwickelt. Hierfür wurden Methoxyalkylpyrazine in Wein mittels Headspace Solid-Phase Microextraction (SPME) bzw. Headspace Solid-Phase Dynamic Extraction (SPDE) und anschließender Gaschromatographie-Tandemmassen-spektrometrie (GC/MS/MS) bestimmt. Mehrere Parameter wie z. B. Temperatur, Zeit, Salzzusatz und Faserart beeinflussen die Extraktionsausbeuten bei der SPME und wurden optimiert.

Aufgrund ihrer zahlreichen Vorteile kann die HS-SPME/GC/MS/MS-Methode die klassischen Methoden wie die Flüssig-Flüssig-Extraktion zum Nachweis von Verfälschungen mit 2-Methoxy-3-alkylpyrazinen ersetzen. Mit den Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32645 von 10 ng/L bzw. 30 ng/L können verfälschte von unverfälschten Weinen eindeutig differenziert werden. Mit der Methode wurden insgesamt 65 Weine, bei denen natürlicherweise 2-Methoxy-3-alkylpyrazine vorkommen untersucht (Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon). Dabei korrelieren die Ergebnisse der Aromaprofilanalyse bei Sauvignon Blanc Weinen eindeutig mit den festgestellten Gehalten an 2-Methoxy-3-isobutylpyrazin (siehe Abbildung).

6.8 Bestimmung des Kirschwasseranteils in Schwarzwälder Kirschtorte

Eine Schwarzwälder Kirschtorte sollte einen deutlichen Kirschwassergeschmack aufweisen. Zur analytischen Absicherung eines Kirschwasseranteils in der Torte wurde ein neues Verfahren aus Wasserdampfdestillation in Verbindung mit densimetrischer, enzymatischer oder gaschromatographischer Alkoholbestimmung entwickelt.

In den Leitsätzen für Feine Backwaren ist die sog. Allgemeine Verkehrsauffassung (hier der redliche Handelsbrauch und die Verbrauchererwartung) für Backwaren wie Schwarzwälder Kirschtorte festgelegt. Die wesentlichen Komponenten der Schwarzwälder Kirschtorte sind danach Wiener- oder Biskuitboden, Sahne oder Butterkrem, Kirschen und Kirschwasser sowie Schokoladenspäne als Verzierung. Kirschwasser wird vielfach der Sahne zugesetzt, kann aber auch in der Füllmasse enthalten sein; manchmal wird mit der Spirituose auch der

fertige Boden getränkt. Die Torte sollte so viel Kirschwasser enthalten, dass sie deutlich danach schmeckt. Üblicherweise sind nach eigenen Untersuchungen zur Erzielung eines deutlichen Kirschwassergeschmacks in einer derartigen Sahnetorte mehr als 50 ml Kirschwasser pro 2-kg-Torte erforderlich.

Bislang wurde zur routinemäßigen Bestimmung des Kirschwasseranteils in Schwarzwälder Kirschtorte am CVUA Karlsruhe eine Methode nach Preuß & Zipfel eingesetzt (Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. **39**: 97–99, 1985). Dabei ist eine konventionelle Destillation erforderlich, da aufgrund unterschiedlicher Fettgehalte der Torten keine direkte Headspace-Gaschromatographie (HS-GC) möglich ist. Die Methode ist sehr zeitaufwändig und relativ störanfällig, so dass stets eine Doppelbestimmung erforderlich ist.

Deshalb wird am CVUA Karlsruhe erstmals die vollständig automatisierte Wasserdampfdestillation als effiziente und kostengünstige Möglichkeit zur Kontrolle des Alkoholgehaltes in Schwarzwälder Kirschtorte eingesetzt. Das Verfahren ist wesentlich schneller (nur ca. 5 min pro Probe) und einfacher zu handhaben als die bisherige Methode. Die Methode ist außerordentlich robust und auch für andere alkoholhaltige Backwaren und Pralinen geeignet. Nach der Wasserdampfdestillation kann die Bestimmung des Ethanolgehaltes des Destillats mittels Biegeschwinger, Enzymatik oder HS-GC erfolgen. Bei der HS-GC wird das Destillat nach Sättigen mit Natriumchlorid direkt zur dampfraum-gaschromatographischen Analyse der Alkohole eingesetzt.

Vollautomatische Wasserdampfdestillation kann die herkömmliche Destillation ersetzen

Wasserdampfdestillation trennt neben Ethanol auch die weiteren flüchtigen Begleitstoffe alkoholischer Getränke von der Probenmatrix. Begleitstoffe der alkoholischen Gärung können damit zur Absicherung der Kirschwasseridentität und -qualität aus der Torte bestimmt werden. Sensorische Untersuchungen bestätigen die Forderung nach einem Mindestgehalt von 50 ml Kirschwasser / 2 kg Torte (siehe Abbildung).

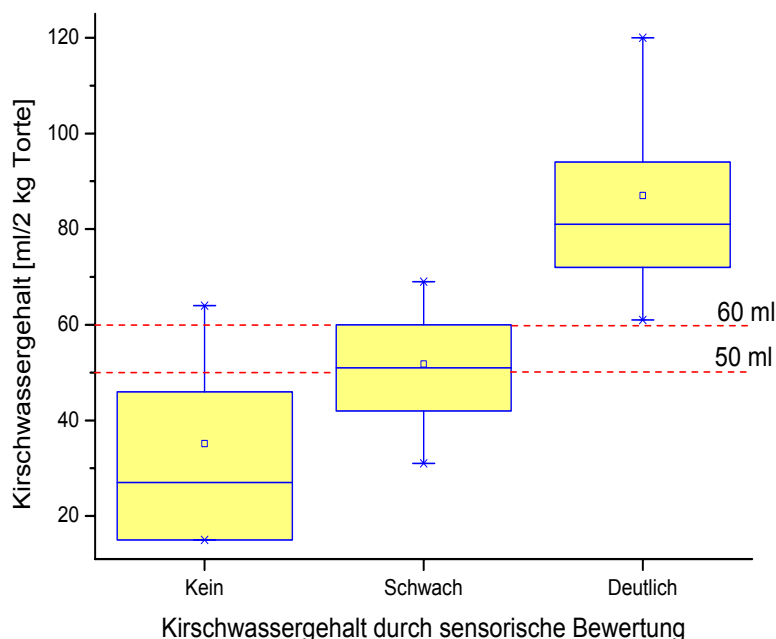


Abbildung: Kirschwassergehalte von sensorisch klassifizierten Schwarzwälder Kirschtorten