

Neue analytische Wege aus den USA?



H.-J. Hofsommer

• Antikörper • EDV • Fruchtsäfte • Isotopenanalyse • Rübenzucker

Im Herbst dieses Jahres fanden in den USA 2 Veranstaltungen statt, bei denen die Fachleute der Fruchtsaftanalytik über den neuesten Stand verschiedener Methoden diskutierten. H.-J. Hofsommer besuchte das ACS-Symposium **"New Methods to detect adulteration of fruit juice beverage"** am 29. und 30. August in Washington und den **"Fruit Juice Authenticity Workshop"**, ebenfalls in Washington am 11. und 12. Oktober 1990 und berichtet im nachfolgenden über diese Veranstaltungen aus europäischer Sicht.

Möglichkeiten zum Zuckernachweis

Die Bestimmung des Isotopenverhältnisses C:12/C:13 ist heutzutage schon als Standardverfahren zum Nachweis von Rohrzucker in verschiedenen Fruchtsäften anzusehen. Über die natürlichen Einflusfaktoren, die Probleme bei der Bestimmung etc., referierte K. Winters. Als analytisch besonders problematisch sind die Isotopen H:1/H:2 und O:16/O:18 einzustufen. Diese scheinen jedoch geeignet zu sein, Aussagen auch über einen Rübenzuckerzusatz zu treffen. Die Kenntnis der Herkunft der Probe ist jedoch hierzu notwendig, da die Verhältnisse, je nach geographischem Ursprung, sehr unterschiedlich sind. Dennoch ist dieser analytische Weg sehr erfolgversprechend.

Auch D.A. KRÜGER, der sich seit Jahren mit der Isotopenanalyse beschäftigt, hält diesen Weg für den richtigen. Im Gegensatz zu den meisten Publikationen schlägt er eine Analytik der Zucker vor, welche durch Oxidation mit Ammonium-Cerium (IV) Nitrate in 4 n Perchlorsäure Calcium-Formiat bilden. Dieses läßt sich leicht unter Vakuum mit Kupferoxid bei 550 °C verbrennen und das Isotopenverhältnis H:1/H:2 bestimmen. Es wird herausgestellt, daß eine solche Bestimmung wesentlich einfacher und ungefährlicher durchzuführen ist als der Weg über die Nitrifizierung der Zucker. Es bleibt im Moment jedoch noch abzuwarten, ob die Ergebnisse wirklich den Durchbruch zum sicheren Nachweis von Rübenzucker in Fruchtsäften erbringen.

Basierend auf der gleichen Erkenntnis wählt auch G.J. MARTIN das Isotopenverhältnis H:1/H:2 zur Beurteilung eines möglichen Rübenzuckerzusatzes. Im Gegensatz zu allen anderen Referenten, welche die massenspektrometrische Bestimmung der Isotopen verwenden, wird von MARTIN eine NMR-Bestimmung herangezogen. Das Prinzip dieser Methode und der notwendige Aufarbeitungsvorgang (Umwandlung der Zucker in Ethanol), wird ausführlich beschrieben.

Es ist heutzutage zweifelsfrei, daß diese von MARTIN in den achtziger Jahren entwickelte Methode bei der Bestimmung eines Zuckerzusatzes in Wein erfolgreich angewendet wird. Der Zuckerzusatz in Fruchtsäften ist jedoch ungleich schwieriger, da – wie ausgeführt – eine

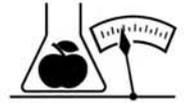
gesicherte Aussage nur in Kenntnis der Herkunft des Saftes getroffen werden kann. Dieser Aspekt wird auch von MARTIN herausgestellt. Bewußt manipulierte Proben wurden andererseits mit einer erstaunlich großen Genauigkeit analysiert, so daß man dieser Technik – deren Grundlage das H:1/H:2 Isotopenverhältnis ist – zukünftig eine Bedeutung beimessen wird. Sie wird jedoch auf einige Speziallabors beschränkt bleiben, denn Investitionen in Millionenhöhe und eine sehr langwierige Analytik sind deutliche Hemmschwellen.

Ganz anders hingegen stellt sich die von N.H. LOW vorgestellte Methodik zum Nachweis von Invertzucker in Fruchtsäften dar. Bereits im Vorjahr wurde über diese Möglichkeit berichtet. Seitdem sind eine Vielzahl von Untersuchungen verschiedener Invertzucker und authentischer Orangensäfte vorgenommen worden. Die Probenaufarbeitung wurde modifiziert und dadurch wesentlich vereinfacht. Das Prinzip dieser Methode basiert auf dem Nachweis einiger Zucker (vermutlich Tri-Saccharide), welche bei der Inversion (sowohl enzymatisch als auch durch Säure) des Rübenzuckers entstehen und welche nach einer HPLC-Trennung mittels eines gepulsten amperometrischen Detektors nachgewiesen werden können. Diese Zucker kommen in Orangensäften nicht vor und somit ist der Nachweis eines Invertzuckerzusatzes relativ leicht möglich. Durch zahlreiche Chromatogramme belegt der Referent die Richtigkeit des Verfahrens. Als Nachweisgrenze kann z.Z. das Erkennen eines 5 %igen Invertzuckerzusatzes angesehen werden. Details der Methode werden in Kürze in "Flüssiges Obst" publiziert.

Als revolutionärer Weg wurde vor ca. 2 Jahren der Nachweis von Rübenzucker in Apfelsäften mittels immunologischer Methoden eingestuft. R.L. POTTER berichtete über diese Möglichkeit und über die Erfahrungen, die man bislang bei der Erstellung eines immunologischen Test-Kits gemacht hat. Wie durch phoretische Methoden gezeigt werden konnte, enthalten kommerzielle Produkte aus Rübenzucker tatsächlich Proteine, welche zum Nachweis herangezogen werden könnten. Somit ist die Entwicklung von Antikörpern generell möglich. Allerdings war dem Referat zu entnehmen, daß bis zur Erstellung eines Test-Kits noch eine Reihe von Problemen gelöst werden müssen, um die Richtigkeit der Ergebnisse sicherzustellen. Es bleibt abzuwarten, inwieweit dieser analytische Weg weiterhin erfolgreich verfolgt wird.

Möglichkeiten zur Beurteilung durch sog. "fingerprint-Technik" und "Chemometrie"

Bereits im Vorjahr wurden Analysetechniken vorgestellt, die nicht auf eine Quantifizierung eines bestimmten Inhaltsstoffes abheben, son-



dem geeignet sind, eine Art produkttypisches Muster zu erstellen. In der Regel wird eine solche Technik mit den verschiedenen Methoden der Chemometrie gekoppelt, um aus der Vielzahl der Informationen sachgerechte Schlüsse ziehen zu können. S.T. KIRKSEY berichtete über die Weiterentwicklung der HPLC-Methodik mittels UV-Detektor. Neben der Charakterisierung sehr verschiedener Fruchtsäfte nahm das Thema des pulp-wash-Zusatzes einen breiten Raum ein. Die Relationen einzelner Peaks sind hierzu hilfreich. Eine exakte Quantifizierung erscheint dennoch nicht möglich. Zur Erkennung von Saftmischungen könnte diese Technik als Methode der Wahl eingesetzt werden. Ebenfalls aus den Forschungslabors des Hauses Procter & Gamble referierte J.A. SMITH und K.Y. LEE über ähnliche Techniken.

Während J.A. SMITH über die Möglichkeiten der FT-IR-Analyse zur Charakterisierung der Authentizität berichtete, also einer sehr aufwendigen Technik, wurde von K.Y. LEE die traditionelle Dünnschichtchromatographie als Screening-Methode vorgestellt. Durch Fluoreszenzmessung der Substanzen auf der HPTLC-Platte lassen sich relativ einfach und schnell wertvolle Anhaltspunkte zur Authentizität gewinnen. Insbesondere im Hinblick auf pulp-wash-Zusätze ergeben sich erstaunliche Resultate, welche durch Quantifizierung der einzelnen durch verschiedene polare Lösungsmittel aufgetrennten Substanzen erhalten werden.

Die Erstellung einer Datensammlung ist auch hier Voraussetzung zur sicheren Beurteilung. Eine Auswertung der FT-IR-Spektren, ohne entsprechenden Rechenaufwand, ist natürlich nicht möglich. Verschiedene mathematische Vorgehensweisen wurden von J.A. SMITH erläutert.

Ein ähnlicher Weg des HPLC-finger-printings, wie der von KIRKSEY, wurde von P.G. KOSKI vorgestellt. Anstelle der UV-Detektion wird hierbei einer Kombination von UV- und EC-(elektrochemische) Detektion der Vorzug gegeben. Durch Einsatz von chemometrischen Methoden lassen sich so relativ einfache Aussagen über die Authentizität verschiedener Citrusfrüchte und Citrus-by-Produkte erstellen. Zu analogen Aussagen gelangt P. GAMACHE, der mittels eines coulometrischen Array-Detektors eine ähnliche Analysetechnik wählt. Mittels "pattern recognition" lassen sich die einzelnen Citrusvarietäten, Herkünfte etc. sehr gut erkennen.

Apparativ aufwendiger ist der Einsatz der Pyrolyse-Massenspektrometrie, wie sie von D.A. HAMMOND als europäischer Beitrag dem Auditorium vorgestellt wurde. Es ist erstaunlich, wie mittels der "Principal Components Analysis" die Vielzahl von Einzelergebnissen dieser einfach zu handhabenden Meßtechnik transparent nach den verschiedenen Ursprüngen des Probematerials dargestellt werden können.

Ebenfalls aus Großbritannien wurde von J.C. FREY eine "pattern recognition-Methode" vorgestellt, welche aus den Daten einer einfachen UV-Vis-spektroskopischen Messung ähnliche Rückschlüsse auf die Herkunft, Varietät etc. erlaubt. Zweifelsfrei ist eine solche Messung in jedem Labor einfach durchzuführen und kann beispielsweise als Eingangskontrolle wertvolle Hilfe leisten. Inwieweit eine solche Technik tatsächlich in der Lage ist, abgesicherte Erkenntnisse zur Beurteilung von Säften zu erstellen, mag nach dem jetzigen Kenntnisstand bezweifelt werden.

Eine Möglichkeit zur Herkunftsbestimmung mittels der ICP-Technik wurde von S. NIKDEL zusammengefaßt. Diese durch die Literatur bekannte Methode der simultanen Bestimmung von 15 Elementen ist in der Lage, bei geeigneter Datensammlung von authentischem Material sehr exakte Rückschlüsse auf die Herkunft zu geben. In Kombination mit "pattern recognition"-Techniken lassen sich sogar Abschätzungen zur Mischung von Säften (Brasilien/Florida) vornehmen. Als präzisere Meßtechnik kann die Koppelung der ICP mit einem Massenspektrometer eingestuft werden.

Über diese Technik berichtete R.M. BARNES. Neben der simultanen Bestimmung von Elementen wurde die Möglichkeit von Isotopenmessungen, beispielsweise Sr:87/Sr:86 herausgestellt. Auch seltene

Elemente wie Rubidium können zur Betrachtung der Authentizität herangezogen werden. Inwieweit eine solche Technik u.U. beim Nachweis eines Zuckerzusatzes dienlich sein könnte, läßt sich z.Z. nicht abschätzen.

Wie aus den o.g. Referaten zu erkennen ist, nimmt die Chemometrie in der Beurteilung von Fruchtsäften eine steigende Bedeutung ein. Eine abschließende Bewertung der Nützlichkeit dieser Methoden fällt dem Autor dieser Zusammenfassung schwer. Es ist jedoch für denjenigen, der sich als Analytiker einstuft, faszinierend, welche Möglichkeiten solche Methoden eröffnen können. Von seiten der FDA referierte F.S. FREY über die Nützlichkeit der "pattern recognition". Mittlerweile liegen Ergebnisse verschiedenster Analysetechniken einschließlich HPLC und ICP von ca. 230 Proben vor.

Es ist erstaunlich, was sich anhand dieser Ergebnisse graphisch darstellen läßt. Es bleibt jedoch die Frage nach der wissenschaftlichen Nutzbarkeit dieser Daten außerhalb des FDA-Imperiums.

Von europäischer Seite widmete sich L. IZQUIERDO (Spanien) den verschiedenen statistischen Methoden und deren Möglichkeiten zur Erkennung einer Verdünnung von Orangensäften. Als Referenzmaterial wurde authentisches Material auf 28 verschiedene Parameter untersucht. Ebenfalls aus europäischer Sicht referierte J.P. RICHARD über die prinzipiellen Möglichkeiten der Chemometrie. Dem europäischen Leser ist dieser Gedankensatz nicht fremd, so daß an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden muß.

Spezielle Inhaltsstoffe und Charakterisierung von Säften

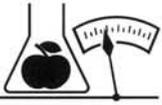
Das Wissen um das Inhaltsstoffgefüge von Cranberrysäften wurde von E.D. COPPOLA durch Untersuchungen aus dem Jahre 1989 erweitert. Neben dem Zucker und Säuren wurde das Augenmerk auf die Anthocyanzusammensetzung gelenkt. Man kann resümieren, daß, abgesehen von dem Aminosäurespektrum, durch die Arbeiten von E.D. COPPOLA ein ausreichender Kenntnisstand zur Beschaffenheit von Cranberry vorliegt. In einem als Übersichtsreferat zu bezeichnenden Vortrag von A.R. BRAUSE zur generellen Beurteilungsmöglichkeit von Fruchtsäften, wurde auch der Kenntnisstand zur Zusammensetzung von Zitronen- und Ananassäften dargelegt.

Aus europäischer Sicht konnten die dargelegten Schwankungsbreiten nicht ohne Widerspruch akzeptiert werden. Vermutlich sind für die verschiedenen Ergebnisse unterschiedliche Analysemethoden verantwortlich. Darauf wurde von H.-J. Hofsommer hingewiesen, der die neu erstellten RSK-Werte für Zitronensaft erläuterte und die generelle Beurteilungspraxis in Europa vorstellte. Ein weiterer europäischer Beitrag wurde von W.C.G. OOGHE vorgetragen, der sich mit Möglichkeiten der Fruchtsaftgehaltsabschätzung auseinandersetzte. Neben den mathematischen Möglichkeiten hierzu wurde die Bedeutung der Aminosäureanalyse hervorgehoben.

Möglichkeiten zum Verfälschungsnachweis von Buntsäften wurden von R.F. WROLSTAD mittels der Analyse der Anthocyane vorgestellt. Aber auch technologische Vorbehandlungen lassen sich anhand des Anthocyanmusters ableiten, was für die Qualitätsbeurteilung von Interesse ist. Auch in diesem Beitrag wurde die Notwendigkeit einer entsprechenden Datensammlung herausgestellt.

Die Bestimmung von D- und L-Äpfelsäure mittels der HPLC auf einer chiralen Phase wurde von J.R. HENSER erläutert. Hierbei handelt es sich bereits um eine Routinemethode, für die zufriedenstellende Ergebnisse eines Ringversuchs vorgestellt wurden.

Über die Aktivitäten kanadischer staatlicher Stellen, die Überwachung des Fruchtsaftmarktes zu forcieren, berichtete C.P. BARRY. Durch geeignete Monitoring-Programme soll mit dem Schwerpunkt Apfel- und Orangensaft eine Datensammlung erstellt werden, die erlaubt, "schwarze Schafe" schneller zu erkennen. Die Aktivitäten der FDA und die Entwicklung der gesetzlichen Regelungen in den USA wurden von M. STUTSMAN übersichtlich zusammengefaßt.

**Zusammenfassung**

Es ist immer wieder erstaunlich festzustellen, mit welchen EDV-Mitteln die analytische Chemie der Fruchtsaftforschung in den USA unterstützt wird. "Pattern recognition" als fester Bestandteil der Datenauswertung gehört für US-Wissenschaftler - wenn auch mit unterschiedlichen Programmen - zum Standardrepertoire. Die daraus resultierenden, meist graphisch dargestellten Ergebnisse, sind verblüffend. Oftmals sind die Resultate jedoch für denjenigen, der in der Fruchtsaftbeurteilung involviert ist, schlichtweg als trivial zu bezeichnen. Das bedeutet, daß durch die Computerisierung auch ein Irrweg leicht begangen werden kann. Nur die kritische Würdigung über Sinn und Zweck solcher mathematischer Methoden dürfte der Sache dienlich sein.

Es ist erfreulich festzustellen, daß auch in Europa (belegt durch mehrere Referate) dieses analytische Hilfsmittel mittlerweile entdeckt wurde. Eine Weiterverbreitung dieser chemometrischen Techniken ist unaufhaltbar. Es bleibt nur die Frage offen, ob diese Anwendungen Mittel zum Zweck sind oder ob sie ein Eigenleben entwickeln.

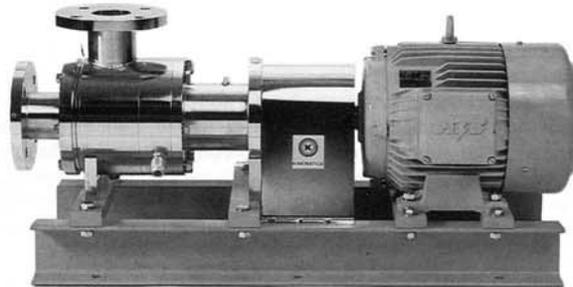
Als hochinteressant und sehr erfolgsversprechend müssen die Bestrebungen zum Rübenzuckernachweis angesehen werden. Es erscheint heutzutage als sicher, daß die Isotopenanalyse hierzu dienlich sein kann. Welcher analytische Weg für diese Bestimmung der praktikabelste ist, läßt sich z.Z. nicht sicher angeben. Ebenso unklar erscheinen die Nachweismethoden für diese Methodik und die Problematik bei unbekannter Herkunft und/oder Mischungen.

Sehr realistisch scheinen hingegen die Ergebnisse von LOW zu sein. Natürlich bedürfen auch sie einer Überprüfung, aber die Methodik ist wissenschaftlich plausibel. Inwieweit eine solche Bestimmung auch für andere Fruchtsäfte außer Orangensaft praktikabel ist, ist noch völlig offen. Persönliche Gespräche bezüglich Apfelsaft ließen keinen Optimismus erkennen. Auch die anfangs hochgelobte immunologische Möglichkeit scheint etwas von der sofortigen Anwendung abgerückt zu sein.

Insgesamt betrachtet muß man dem ACS-Symposium ein erstklassiges wissenschaftliches Niveau bescheinigen und den Veranstaltern für die glänzende Organisation danken. Es ist wünschenswert, daß die "Alte-" und die "Neue Welt" zukünftig noch enger zusammenarbeiten.

Vollständige Liste der gehaltenen Referate:

- "New Methods to detect adulteration of fruit juice beverage"
- Use of anthocyanin pigment analyses for detecting fruit juice adulteration, Ronald E. Wrolstadt
- Recent developments in assessing cranberry adulteration, Elia D. Coppola
- HPLC analysis of polyphenolic compounds for juice authenticity, S.T. Kirksey
- The characterization of orange juice using combined LC/EC/UV and chemometrics, Paul G. Koski
- Coulometric array detection for HPLC in the analysis of juice products, P. Gamache
- Application of high performance thin layer chromatography (HPTLC) to the detection of orange juice adulteration, K.Y. Lee
- NMR and MS stable isotope studies of fruit juice adulteration, G.J. Martin
- The authentication of juices by a traditional multicomponent approach and a novel fingerprinting technique pyrolysis-mass-spectrometry, David Hammond
- Detection of beet sugar in orange and grapefruit juices by deuterium/hydrogen isotope ratios, Dana A. Krüger
- Detection of orange juice adulteration by means of inductively coupled plasma mass spectrometry, Ramon M. Barnes
- Characterization of blended orange juices from Florida and Brazil by ICP and chemometrics, Seifollah Nikdel
- Multivariate analysis of juice concentrate infrared spectra, James A. Smith

Hochfrequenz-Dispergiertechnik**MEGATRON® MT 120****Einkammer Inline-Homogenisiermaschinen**

- Homogenisieren
- Dispergieren
- Emulgieren
- Begasen

20 Standard-Ausführungen für Sätze von ca. 2 - 180 t/h

**KINEMATICA AG**

Dispergier- und Mischtechnik
Luzernerstrasse 147a, CH-6014 Littau/Luzern
Telefon 041 57 12 57, Fax 041 57 14 60

7 D

- Improving orange juice authentication with pattern recognition analysis, John C. Fry
- The application of chemometrics methods to the detection of fruit juice adulteration in Europe, J.P. Richard
- Use of pattern recognition techniques for the detection of adulteration of orange juices, Frederick S. Fry
- Comparison of statistical methods for detecting orange juice dilution, L. Izquierdo
- Detection of adulteration of vanilla extracts, C.H. Manley
- Authenticating flavorings used in carbonated beverages, Colin J. Ringleib
- Lemon and pineapple juice authenticity by matrix methods, A.R. Brause
- Contribution of the determination of the fruit juice content of fruit juice beverages and syrups, W.C.G. Ooghe
- Characteristics of lemon juice, Hans-Jürgen Hofsommer
- Adulteration and the immunoassay: using antibodies to detect commercial beet sugar, R.L. Potter
- Detection of added malic acid in fruit juices, J.R. Heuser
- Canadian perspective on the detection of juice adulteration, Carla P. Barry
- Fruit juice authenticity Workshop"
- Stable isotope analysis to detect adulteration, Richard Anderson
- A new method for detecting undeclared beet sugar, follow up, Nicholas Low
- Analytical methodologies of detection as practiced in Europe, H.-J. Hofsommer
- Polyphenols follow up, Robert Wade
- Matrix method for detecting juice adulteration: lemon and pineapple, Allan R. Brause
- NMR methods, Gilles Martin
- Overview of compliance & regulatory issues, Martin Stutsman
- HPLC Demonstration, Kert Ivie

Verfasser: Dr. H.-J. Hofsommer, GfL Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung mbH, W-1000 Berlin 30