

Facetten der Authentizität

Analytische Nachweismöglichkeiten

Arne Dübecke

Wer sich mit der Authentizität von Lebensmitteln beschäftigt, merkt schnell, dass es nicht „die eine“ Methode gibt, mit der alle Facetten der Authentizität eines Lebensmittels nachgewiesen werden können. Einige dieser Facetten lassen sich auch nicht durch Labormethoden klären, sondern müssen z. B. durch Prüfung der Dokumentation und Audits vor Ort geprüft werden (z. B. Fair-Trade-Auslobungen oder Betrug im Zusammenhang mit Fangquoten).



Arne Dübecke

» Zur Person

Studierte marine Umweltwissenschaften an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg; seit 2008 ist er für die Quality Services International GmbH in Bremen tätig. Dort leitet er das Tentamus Center for Food Fraud (TCF²) sowie den Geschäftsbereich Medizinprodukte. «

Die chemische Analytik kann aber sehr wohl bei Fragestellungen, wie **(1)** der Verdünnung hochwertiger Lebensmittel mit minderwertigen Lebensmitteln, **(2)** dem kompletten oder teilweisen Austausch der wertgebenden Zutat, **(3)** der Verschleierung minderwertiger Qualität, **(4)** der Steigerung der Qualität durch Zugabe nicht zugelassener Stoffe und **(5)** der Herstellungsbedingungen (bio/konventionell), wertvolle Dienste leisten.

Überblick analytischer Lösungen

Zur Lösung dieser Fragestellungen stehen den Lebensmittel Laboren mittlerweile ein umfangreiches Arsenal analytischer Ausstattung zur Verfügung. Vom eher unscheinbaren Infrarot-Spektrometer über standardmäßig verwendete Massenspektrometrie („Triple Quads“) bis hin zu spezialisierten und hochkomplexen Instrumenten, wie der Isotopen-Massenspektrometrie (IRMS), der hochauflösenden Massenspektrometrie (HRMS) oder auch Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie).

Neben verschiedenen Technologien werden zudem noch unterschiedliche Ansätze

zur Erfassung und Auswertung der Daten herangezogen. Den meisten dürfte die zielgerichtete Analytik geläufig sein. Bei diesem Ansatz ist vorher bekannt, welcher Parameter analysiert werden soll. Dafür ist im Labor dann auch zertifiziertes Referenzmaterial vorhanden, das für eine Optimierung der Analyse, deren Validierung und schließlich der Quantifizierung in der Routineanalytik herangezogen wird. Die Auswertung ist vergleichsweise einfach, i. d. R. muss je Substanz ein klar definierter Peak ausgewertet werden. Anders verhält es sich bei der nichtzielgerichteten Analytik. Hier ist nicht bekannt, nach welcher Substanz gesucht wird. Die zur Messung eingesetzte Methode wird derart angelegt, dass möglichst viele relevante Substanzen erfasst werden können und somit einen analytischen Fingerabdruck erzeugen. Hierfür eignen sich insbesondere Methoden, z. B. hochauflösende Massenspektrometrie gekoppelt an Flüssigchromatographie (Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry, LC-HRMS), Kernresonanzspektroskopie (NMR) oder auch Infrarotspektroskopie (IR). Es gibt natürlich noch weitere Techniken, die für diese Art der Analytik zum Einsatz kommen können. Je nach verwendeter Technik können

mehrere hundert Megabyte an Daten je Probe entstehen. Es wird schnell klar, dass eine Auswertung nicht mehr „per Auge“, wie dies bei der Auswertung einzelner Peaks in der zielgerichteten Analyse möglich ist, funktionieren kann, sondern andere Mittel erfordert. Statistische Methoden, zum Beispiel die Hauptkomponentenanalyse oder die lineare Diskriminanzanalyse und ihre verschiedenen Varianten, werden eingesetzt, um eine Einordnung einer unbekannt Probe z. B. in die Kategorien authentisch oder verfälscht herbeizuführen.

Neben „echten“ nicht-zielgerichteten Methoden gibt es dann noch Methoden, die durch Analyse mehrerer zielgerichteter Parameter ebenfalls den Eindruck einer nicht-zielgerichteten Analyse erwecken können. Beispiele dafür sind Spurenelementprofile, wobei 30, 40 oder mehr Parameter zielgerichtet erfasst werden und einen Elementfingerabdruck ergeben, der aufgrund seiner Komplexität ebenfalls mittels statistischer Methoden ausgewertet wird. Ein weiteres Beispiel ist das Next Generation Sequencing (NGS). Es wird gezielt nach den in der Vergleichsdatenbank enthaltenen Spezies gesucht, jedoch sind dort i. d. R. derart viele Arten hinterlegt, dass diese Methode häufig als nicht-zielgerichtet bezeichnet wird.

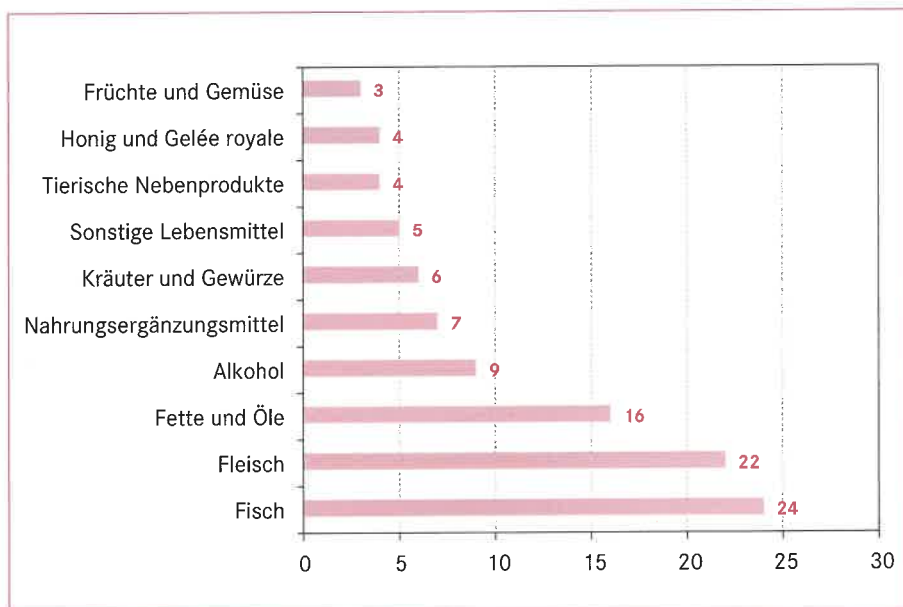
Datenbanken und Vergleichsproben

Die nicht-zielgerichteten Methoden sowie die zielgerichteten Methoden, die eine Vielzahl Einzelparameter umfassen, haben eines gemeinsam: Sie basieren i. d. R. auf einer Datenbank aus Vergleichsproben. Dies ist notwendig, da ein einzelner Fingerabdruck zunächst nicht viel über die Authentizität einer Probe aussagt. Idealerweise besteht die Datenbank aus Datensätzen von

nachweislich authentischen sowie nachweislich verfälschten Proben. Letztere können auch selbst im Labor hergestellt werden, z. B. durch die Zumischung steigender Anteile Lampantöl zu extra nativem Olivenöl oder auch Zuckersirup zu Honig. Es muss dabei allerdings berücksichtigt werden, dass Verfälschungen auf sehr unterschiedliche Weise durchgeführt und nie alle Möglichkeiten durch Laborexperimente abgedeckt werden können. Eine Methode, die die Zumischung von Sonnenblumenöl zu Olivenöl zuverlässig erkennt, muss nicht unbedingt Rapsöl in Olivenöl erkennen können. Bei der Verfälschung von Honig hängt die Möglichkeit der Detektion vom verwendeten Sirup ab. Was für den einen Sirup sehr gut funktioniert, kann für einen anderen Sirup nahezu wirkungslos sein, wie die offizielle AOAC-998.12-Methode, die hervorragend für den Zusatz von Sirup aus C₄-Pflanzen (z. B. Mais, Rohrzucker) funktioniert, die Zugabe von Sirup aus C₃-Pflanzen (z. B. Reis) jedoch nicht erkennen kann.

Eine absolute Quantifizierung von Verfälschungen durch Verdünnung bzw. Austausch ist nur sehr schwer möglich und in der Realität häufig bestenfalls eine Schätzung. Dies ist unabhängig davon, ob z. B. Oregano mit Fremdpflanzenmaterial, Honig mit Sirup oder Arabica- mit Robusta-Kaffee verfälscht wurde. Dies liegt sowohl an der natürlichen Varianz der Produkte selbst als auch an der Varianz des zur Verfälschung eingesetzten Materials. Sofern dem Labor nicht genau das Material vorliegt, das zur Verfälschung eingesetzt wurde, ist bestenfalls eine semi-quantitative Abschätzung der Verfälschung möglich, z. B. durch Verdünnungseffekte. Dies gilt auch für die oben angesprochene AOAC 998.12, denn diese kann auch nur dann korrekt quantifizieren, wenn der Sirup, mit dem verfälscht wurde, vergleichbar zu dem Sirup ist, der zur Ent-

» Datenbanken (DBs) sind von immer größer werdender Wichtigkeit. Proprietäre DBs sind nicht allgemein akzeptiert. Die zukünftige Herausforderung wird die Schaffung offener Datenbanken sein. «



Meldungen aus dem AAC-FF-System, bei welchen Lebensmitteln im Jahr 2018 besonders häufig Fälschungen festgestellt wurden (Quelle: SenJustVA)

wicklung der Methode eingesetzt wurde. In den meisten Fällen trifft dies natürlich nicht zu. Ähnlich verhält es sich bei anderen Marker-basierten Quantifizierungen. Es ist möglich, relativ zu einer Referenzprobe zu quantifizieren, jedoch sagt das nichts über den tatsächlichen Umfang der Verfälschung aus.

Beim NGS wird die DNA der verschiedenen in einer Probe enthaltenen Spezies quantifiziert. Aber auch dies lässt keine akkurate Quantifizierung des Ausmaßes der Verfälschung zu, da der DNA-Gehalt sich von Gewebe zu Gewebe unterscheidet. So enthält Blattmaterial mehr DNA als Früchte. Im sauren Milieu, beispielsweise in Säften, kann zudem eine Hydrolyse der DNA das quantitative Ergebnis beeinflussen. Besteht eine Probe jedoch aus vergleichbarem Material, kann eine semi-quantitative Aussage mitunter möglich sein.

Ein weiterer Parameter, der dazu neigt, Missverständnisse zu verursachen, ist die Empfindlichkeit einer Methode. Bei der Analytik der Authentizität ist es nicht unbedingt notwendig, eine extrem hohe Empfindlichkeit bezüglich der absoluten Verfälschung zu erreichen, denn in erster Linie sollen ja ökonomisch motivierte Verfälschungen aufgedeckt werden und nicht geringe Kontami-

nationen, die beispielsweise bei Verwendung gleicher Produktionslinien für verschiedene Produkte auftreten können. Ein Verfälscher wird eher im Bereich 5, 10, 20 % oder mehr verfälschen. Selbst der komplette Ersatz des Produktes ist denkbar, wie bei der als Safran verkauften Färberdistel. Das Risiko, entdeckt zu werden, muss sich schließlich auch auszahlen. Es kann allerdings sein, dass die eingesetzte Analytik sehr empfindlich ist und dies auch sein muss, wenn Marker gemessen werden, die nur in sehr geringen Konzentrationen (< 1 mg/kg) im Produkt oder dem Material, das für die Verfälschung eingesetzt wird, enthalten ist. In so einem Fall muss die Analytik empfindlich sein; die damit erkannten absoluten Zumischungen können sich aber dennoch im hohen einstelligen Prozentbereich bewegen.

Beschaffung authentischer Proben

Tatsächlich liegt die größte Problematik gar nicht in der Entwicklung geeigneter Methoden zur Bestimmung der Authentizität, sei es mittels zielgerichteter oder nicht-zielgerichteter Analytik. Weitaus schwieriger ist meist die Beschaffung authentischer Proben. Häufig stammen die Proben nicht aus regionaler Produktion, es ist also i. d. R. nicht möglich, persönlich bei der Probenahme dabei zu sein. Bei Produkten, wie Obst für die Saftproduktion oder Oliven für die Öl-Produktion, kann zumindest geprüft werden, wie die für die Produktion eingesetzte Rohware beschaffen ist. Im Fall Honig hingegen würde selbst eine persönliche Probenahme direkt aus der Wabe nicht garantieren, authentischen Honig zu bekommen, da während der Honigproduktion Sirup gefüttert worden sein kann, der, wie auch Nektar, in den Waben eingelagert wird. Laborseitig kann und sollte also zusätzlich versucht werden, mittels vorhandener Me-

» Die Entwicklung einer neuen Methode ist sehr anspruchsvoll, stellt aber nicht die größte Hürde dar. Die Beschaffung authentischer Referenzproben ist die größte Schwierigkeit. «

thoden die Authentizität zusätzlich analytisch abzusichern. Eine 100%ige Sicherheit, dass wirklich jede einzelne Probe in einer authentischen Datenbank auch wirklich authentisch ist, ist insbesondere für international gehandelte Rohwaren in der Realität nicht erreichbar. Ferner muss natürlich auch die natürliche Varianz eines Produktes beachtet werden. Ein Apfel, der an der Sonnenseite hing, wird nicht das exakt gleiche chemische Profil aufweisen, wie ein Apfel, der zeitgleich auf der Schattenseite geerntet wurde.

Im Folgenden sind einige Beispiele bereits verfügbarer Analytik zur Ermittlung der Authentizität üblicher Lebensmittel aufgeführt.

Tee, Kräutertee, Küchenkräuter, Gewürze

NGS eignet sich hervorragend zur Detektion fremder Pflanzenbestandteile in einem pflanzlichen Produkt, zum Beispiel Tee (*Camellia sinensis*), Kräutertee, Küchenkräuter und Gewürze. Der Vorteil der Methode liegt darin, dass nicht bekannt sein muss, nach welcher Fremd-pflanze man sucht, denn die verwendeten Datenbanken enthalten mitunter Daten zu vielen tausend Pflanzenarten. Auch wenn NGS sehr leistungsfähig ist, ist es nicht in der Lage, wie auch sonst keine Methode, wirklich alle Substanzen in einer Probe zu erfassen. Wird Pflanzenmaterial mittels Farbstoffen verfälscht, kann dies mittels NGS nicht detektiert werden. Für derartige Verfälschungen würden sich wiederum chromatographische Methoden mit massenspektrometrischer Detektion (LC-MS) anbieten. Mit dem Zusatz nicht zugelassener Farbstoffe kann auch eine Gesundheitsgefährdung einhergehen, sodass zu der Frage der Authentizität noch die Lebensmittelsicherheit hinzukommt. Die LC-MS kann auch hilfreich bei der Unterscheidung der Herkunft von Zimt sein. Diese kann z. B. über den Gehalt an Kumarin eingeschätzt werden, denn der günstigere Cassia-Zimt enthält wesentlich höhere Gehalte



Der hochwertigere Ceylon-Zimt enthält weniger Kumarin als der günstigere Cassia-Zimt.

an Kumarin als der hochwertigere Ceylon-Zimt.

Kaffee, Instant-Kaffee

Auf dem Etikett abgepackten Kaffees ist häufig „100 % Arabica“ zu lesen. Im Gegensatz dazu steht der Robusta-Kaffee, dessen Anbau weniger schwierig und dessen Preis geringer ist als der von Arabica-Kaffee. In einem „100 % Arabica“-Kaffee darf entsprechend kein Robusta-Anteil enthalten sein. Zur Detektion von Robusta in Arabica bieten sich HPLC-UV bzw. HPLC-DAD, HPLC-MS oder auch NMR an. NMR hat den großen Vorteil, dass die Probenvorbereitung weniger komplex ausfällt als für die HPLC-basierten Methoden. Unabhängig von der Technik schauen die Methoden gezielt auf 16-O-Methylcafestol (16-OMC), den Marker für Robusta-Kaffee. Der Nachweis des Markers ist somit auch Nachweis der Anwesenheit von Robusta. Aufgrund der natürlichen Varianz des 16-OMC in Robusta kann der Umfang der Verfälschung anhand des Markers jedoch nur geschätzt werden.

Instant-Kaffee wird u. U. mit gerösteten Fremd-pflanzenanteilen verfälscht, wie Getreide oder Zichorie. Auch hierfür können u. a. chromatographische Methoden mit

» Bei Tee und Kräutern kann das Next Generation Sequencing (NGS) sein Potenzial voll entfalten und z. B. Olivenblätter oder anderes Pflanzenmaterial in Oregano zuverlässig erkennen. «

Food Fraud-Network

Im Jahr 2013 hat die Europäische Kommission ein Netzwerk zur Bekämpfung von Lebensmittelkriminalität, das „Food Fraud Network (FFN)“, initiiert. Es umfasst die Kontaktstellen der derzeitigen Mitglieds- sowie der EFTA-Staaten und dient der Zusammenarbeit bei grenzübergreifenden „Food Fraud“-Fällen.

Für Deutschland nimmt das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) als nationale Kontaktstelle an dem Netzwerk teil. Die Kommunikation zwischen den Mitgliedsstaaten und der Europäischen Kommission erfolgt über das webbasierte Administrative Assistance and Cooperation System Food Fraud (AAC-FF). Alle Bundesländer sind Bestandteil dieses Netzwerks und haben Länder-Kontaktstellen eingerichtet.

Quelle: BLAG (Bund-Länder-Arbeitsgruppe Lebensmittelkriminalität/Food Fraud

massenspektrometrischer Detektion eingesetzt werden oder auch wieder NMR.

Olivenöl, andere Speiseöle, ätherische Öle

Hierfür sind auch wieder mehrere Methoden verfügbar, abhängig von der Fragestellung. Fingerabdruckmethoden bieten sich an, um möglichst viele Aspekte abdecken zu können. Profiling mittels NMR ermöglicht z. B. die Unterscheidung der geographischen Herkunft von Olivenöl. Ferner wird auch die Zumischung von Fremdülen, z. B. Sonnenblumenöl, im NMR-Spektrum sichtbar. Aussagen über die Qualität können ebenfalls getroffen werden und so Beimischungen von Lampantöl in qualitativ hochwertigerem Olivenöl nachgewiesen werden. Die gleiche Fingerabdruckmethodik lässt sich auch auf ätherische Öle anwenden, jedoch muss hierfür natürlich eine geeignete Datenbank verfügbar sein.

Aromen

Die Authentizität von Aromastoffen kann u. a. mittels Isotopen-Massenspektrometrie gekoppelt an Flüssigchromatographie ermit-

telt werden. Dies funktioniert beispielsweise für Vanillin sehr gut. Anhand des Verhältnisses der Isotopen von $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ lassen sich Aussagen darüber treffen, ob das Vanillin aus Schoten extrahiert, biotechnologisch hergestellt oder gar aus petrochemischen Ausgangsmaterialien synthetisiert wurde. Eine weitere erfolgreich eingesetzte Methode ist die Gaschromatographie gekoppelt an Massenspektrometrie (GC-MS), mit der u. a. Enantiomeren-Verteilungen ermittelt werden können, die Rückschlüsse auf die Authentizität einer Probe zulassen.

Honig

Das Thema Authentizität spielt im Bereich Honig bereits seit Jahrzehnten eine große Rolle. Infolgedessen gibt es zu dieser Fragestellung bereits eine Vielzahl an analytischen Methoden. Wie zuvor angesprochen, beschreibt die AOAC-Methode 998.12 den Einsatz der IRMS zur Detektion von Maissirup in Honig. Eine Weiterentwicklung stellt die Kopplung an eine HPLC-Anlage dar, die die Auftrennung der einzelnen Zucker in die Fraktionen Fructose, Glucose, Di-, Tri- sowie Oligosaccharide ermöglicht und somit die Bestimmung der Isotopenverhältnisse in den verschiedenen Fraktionen ermöglicht. Die Entscheidungsgrenzen basieren wiederum auf Datenbanken authentischer Honigproben verschiedener botanischer und geographischer Herkünfte. Neben den Isotopen-Methoden spielt insbesondere in den letzten Jahren das NMR-Profiling eine wichtige Rolle, da hiermit ein sehr umfangreicher Fingerabdruck einer Honigprobe erstellt werden kann. In der aktuellen zweiten Datenbankversion des Honey-Profiling™ von Bruker, Rheinstetten, sind bereits über 18 000 Vergleichsproben aus aller Welt enthalten. Neben der Detektion einer Verfälschung mit Sirup sind mittels NMR-Profiling auch Rückschlüsse auf die geographische Herkunft möglich. Noch neuer ist die Analyse mittels LC-HRMS, also der hochauflösenden Massenspektrometrie. Hierbei werden mittels nicht-zielgerichteter Analytik

» Die Authentizitätsanalyse von Honig erfordert eine kontinuierliche Anpassung der Labore. Dies geschieht durch Aufbau von Datenbanken und den Einsatz immer leistungsfähigerer Methoden. «

Datensätze authentischer Honige mit Datensätzen verschiedener Sirupe mit statistischen Methoden verglichen. Daraus resultiert eine Vielzahl an Markern, die dann wiederum für die Hochdurchsatz-Analytik auf Triple-Quadrupol-Massenspektrometer portiert werden können, wie sie in der täglichen Routine beispielsweise zur Rückstandsanalytik eingesetzt werden. Neben diesen Methoden gibt es weitere, die z. B. Enzyme oder auch Zucker nachweisen, die natürlicherweise nicht in Honig vorkommen.

Fleisch

Bei diesem Erzeugnis ist häufig eine Unterscheidbarkeit der Produktion gemäß Bedingungen der Bio-Verordnung von der Produktion unter konventionellen Bedingungen gefragt. Zu diesem Zweck kann die Analyse der Verhältnisse verschiedener Isotopen eingesetzt werden. Die Kombination von ^{13}C - und ^{15}N -Isotopen hat sich dabei als sehr nützlich herausgestellt. Über die Kohlenstoffisotope lassen sich Rückschlüsse auf die Nahrung der Tiere ziehen. Häufig wird Kraftfutter auf Maisbasis zur Fütterung verwendet. Wie wir weiter oben bereits beim Thema Honig erfahren haben, ist Mais eine C_4 -Pflanze und unterscheidet sich hinsichtlich seines Kohlenstoffisotopenverhältnisses von Gräsern, wie die Tiere sie auf der Weide fressen. Einen weiteren Hinweis liefern die Stickstoffisotope, da diese durch Düngung der Futterpflanzen mit synthetischen Düngern in der konventionellen Landwirtschaft meist ein anderes Verhältnis aufweisen als bei der Bio-Landwirtschaft. Das Isotopenverhältnis in Futterpflanzen wiederum beeinflusst die Isotopenzusammensetzung des tierischen Gewebes und lässt somit eine Unterscheidung der beiden Produktionsmodi zu.

Bei der Vielzahl an Produkten, Fragestellungen und Methoden stellt dies natürlich nur einen kleinen Ausschnitt dessen dar, was möglich ist. Die unermüdliche Kreativität derer aufseiten der unlauteren Profitmaximierung sorgt wiederum fortlaufend für

die Entwicklung neuer Analysemethoden durch universitäre und private Lebensmittellaboratorien.

Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es keine perfekte All-in-one-Methode zur Bestimmung der Authentizität gibt und in absehbarer Zeit auch nicht geben wird. Zunächst muss man sich klar darüber sein, welcher Aspekt der Authentizität geprüft werden soll. Ist dieser festgelegt, kann eine passende Methode dafür oder zumindest für einen Teilaspekt gefunden werden. Die Herausforderung liegt insbesondere in der Beschaffung authentischen Vergleichsmaterials. Hierbei ist die Zusammenarbeit der verschiedenen Akteure entlang der Lieferkette mit den Lebensmittel Laboren von großer Wichtigkeit.

Referenzen

- AOAC: AOAC Official Method 998.12, „C-4 Plant Sugars in Honey“, Internal Standard Stable Carbon Isotope Ratio Method, First Action 1998, Revised First Action 2013. URL: <http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=13408>.
- Bruker: Honey-Profilin™ 2.0, a powerful solution to tackle honey fraud. URL: <https://www.bruker.com/products/mr/nmr-food-screening/honey-profilin-module-of-the-nmr-foodscreener.html>, Zugriff 15.12.2020. ■

» Bio-Lebensmittel erfreuen sich steigender Beliebtheit. Mittels Analyse der Isotopenverhältnisse kann zwischen konventionell erzeugtem Fleisch und Bio-Ware unterschieden werden. «

Kontakt

Arne Dübecke

Leiter Tentamus Center for Food Fraud (TCF²)

Medizinprodukte

Quality Services International GmbH

Flughafendamm 9a

28199 Bremen

arne.duebecke@tentamus.com

www.tentamus.com