

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 81 (1990)

Heft: 5

Artikel: Nachweis der Aromatisierung von Lebensmitteln mit γ -Lactonen : wie identisch mit der Natur müssen "naturidentische" Aromen sein? = Determination of γ -lactones added to foods as flavours : how far must "Nature-identical" flavours be identical with the na...

Autor: Artho, Anna / Grob, Konrad

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982626>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 02.02.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Nachweis der Aromatisierung von Lebensmitteln mit γ -Lactonen. Wie identisch mit der Natur müssen «naturidentische» Aromen sein?

Determination of γ -Lactones Added to Foods as Flavours. How far must «Nature-Identical» Flavours be Identical with the Nature?

Anna Artho und *Konrad Grob*
Kantonales Laboratorium, Zürich

Einleitung

Chirale Lactone sind Bestandteil vieler Fruchtaromen, so z.B. von Erdbeeren, Aprikosen, Pfirsichen und Kokosnüssen. Da diese Aromen auch synthetisch hergestellt werden, interessierte uns, ob ein Aroma aus der entsprechenden Frucht stammt oder zugesetzt wurde.

Gemäss eidgenössischer Lebensmittelverordnung werden drei Typen von Aromen unterschieden: natürliche Aromen, synthetisch hergestellte «naturidentische» Aromen sowie künstliche Aromen mit Substanzen, die in natürlichen Aromen nicht vorkommen. Die Verwendung «naturidentischer» Aromen ist gemäss Zusatzstoffverordnung für viele Lebensmittel gestattet, z.B. für Milchprodukte, Bonbons und Liköre. Eine Aromatisierung muss aber deklariert werden (synthetisch-naturidentische Aromen werden als «Aromen» deklariert). Andere Lebensmittel, z.B. Fruchtbranntweine, müssen aus den entsprechenden Früchten hergestellt werden und dürfen keine synthetischen Aromen enthalten. Schliesslich sind definierte künstliche Aromen für gewisse Lebensmittel zugelassen.

Am Beispiel der γ -Lactone zeigte sich, dass in der Praxis natürliche und synthetische Aromen nicht immer genügend klar auseinandergehalten werden. Zudem möchten wir auf die Problematik «naturidentischer» Aromen aufmerksam machen: Viele verwendete «naturidentische» Aromen sind weit davon entfernt, der Konsumentenerwartung einer getreuen Naturimitation zu entsprechen.

γ -Lactone sind chiral, wobei in natürlichen Aromen die R-Enantiomeren vorwiegen, aber S-Enantiomere ebenfalls zu 1–15% der R-Enantiomeren vorkommen. Ein 5%-Anteil S-Enantiomeres ist typisch für das γ -Decalacton (Abb. 1) von Aprikosen (2–9% für 9 Proben von 6 verschiedenen Sorten (1)), 1–2% für Erdbeeren (2), 11% für Pfirsiche (eine Probe) (3) und 13% für Nektarinen (4). Diese Resultate lassen erwarten, dass das R/S-Verhältnis als Kenngrösse für bestimmte

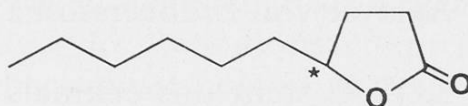


Abb. 1. γ -Decalacton

Früchte herangezogen werden kann. Dazu ist heute allerdings die Datenbasis noch zu schmal.

Synthetisch hergestellte γ -Lactone sind normalerweise racemisch und oft auch in ihrer Zusammensetzung bezüglich Molekulargröße nicht identisch mit den aus Früchten extrahierten Lactonen. Allerdings ist heute auch ein aus Ricinolsäure fermentativ hergestelltes γ -Lacton erhältlich, das aus praktisch reinem R- γ -Decalacton besteht.

In vielen Früchten kommen neben den γ -Lactonen (5-Ring) auch δ -Lactone (6-Ring) vor, werden hier aber nicht analysiert.

Chirale Trennung

Die Analytik chiraler Verbindungen wurde durch die Einführung von Cyclodextrinen als stationäre Phasen für die GC um einen grossen Schritt vorangebracht (5). Vor allem wenig polare Verbindungen, welche durch die Dipeptidphasen (z. B. Chirasil-Val) nicht in die Enantiomeren trennbar waren, können seither einfach analysiert werden. Die Selektivität ist stark abhängig von der Derivatisierung des Cyclodextrins, und die Voraussage, welches Derivat welche Verbindungen in Enantiomere trennen würde, gelingt noch selten (ein CHIRAL-Test ist in Bearbeitung, der die Wahl der Phase erleichtern soll) (6). So trennen nur wenige Cyclodextrinderivate die γ -Lactone. Wir verwendeten das 2,6-di-O-pentyl-3-O-acetyl- α -cyclodextrin, das dem Lipodex B von Macherey Nagel entspricht.

Effiziente Vorreinigung

Die Analytik chiraler Verbindungen setzt eine intensive Vorreinigung voraus, damit keine Störpeaks die Interpretation des Enantiomerenverhältnisses verfälschen. Zudem enthalten die Lebensmittelextrakte oft viel Fett und anderes Material, das die GC behindert.

Mosandl et al. (2) sowie Schreier et al. (7) setzten zweidimensionale GC ein: Die γ -Lactonpeaks aus einer achiralen ersten Kapillartrennsäule (d. h. das Gemisch der Enantiomeren) wurden auf eine Cyclodextrinsäule übertragen und dort in die Enantiomeren getrennt. GC-GC resultiert in einer guten Isolierung der Enantiomerenpaare von Störpeaks, setzt aber eine vorgängige Probenaufbereitung voraus. Schmarr et al. (8) beschrieben eine on-line LC-GC-Methode: LC reinigt die Probe (trennt z. B. das Fett ab), erübrigt also die erste Probenaufbereitungsstufe, und isoliert mit grosser Trennleistung die γ -Lactone in einer Fraktion.

Die Methode wurde auf die Analyse von Erdbeeraroma in Milchprodukten (z. B. Quark) angewandt.

Mit on-line gekoppelter LC-GC steht uns erstmals eine Technik zur Verfügung, die eine vollautomatische Analyse eines rohen Extraktes aus Lebensmitteln ermöglicht, also eine «billige» Analyse vieler Proben auf ihre Aromatisierung erlaubt.

Experimentelles

Gerät

LC-GC wurde auf dem Prototypen des Carlo Erba Dualchrom HPLC-HRGC 3000 ausgeführt, ausgerüstet mit Autosampler, Spritzenpumpe, LC-Rückspülventil, einem on-column und einem loop-type Interface sowie einem automatischen Dampfausgang. Als Laufmittel verwendete Lösungsmittel wurden destilliert.

Extraktion

Den Proben wurde 0,1–2 ppm interner Standard zugesetzt: racemisches γ -Octalacton (Roth, Karlsruhe, BRD). Alkoholische Getränke (typisch 10 ml) wurden mit 5 ml n-Hexan/20% Methyl-tert. Butylether (MTBE) extrahiert. 10 g Konfitüre wurde mit 20 ml 20% NaCl-Lösung aufgeschlämmt und mit 5 ml des gleichen Lösungsmittelgemisches extrahiert. 10 ml Fruchtsaft (Nektar) wurde mit 10 ml Wasser verdünnt und mit 5 ml Lösungsmittel ausgeschüttelt. Resultierende Extrakte wurden mittels LC-GC analysiert.

LC-Bedingungen

Als LC-Säulenpackungsmaterial diente Kieselgel (Spherisorb S-5-W). Kieselgel bedingt Vorsicht bezüglich Retentionsstabilität: diese ist anfällig auf Feuchtigkeit und polare Bestandteile in den Proben. Mit Natriumsulfat kann Feuchtigkeit leicht entfernt werden, nicht aber z. B. Ethanol aus alkoholischen Getränken. Derivatisierte Kieselgele, wie sie für reversed-phase LC verwendet werden, sind diesbezüglich stabiler. Doch die Cyano-Phasen, die für diese Anwendung in Frage kämen, haben zu geringe Retentionskraft: Lactone werden selbst mit Pentan an der Lösungsmittelfront eluiert.

Für LC-GC werden enge LC-Säulen bevorzugt, da das Volumen der zu transferierenden Fraktion mit dem Quadrat des Säulendurchmessers abnimmt. Allerdings sinkt die Säulenkapazität ebenso schnell. Die Säulenkapazität kann aus zwei Gründen knapp werden: Wenn Proben mit grossen Mengen von Nebenkomponten (z. B. Fett) eingespritzt werden müssen, besteht die Gefahr von Überladung; Überladung äussert sich vor allem in Peakverbreiterung. Wir benö-

tigten Kapazität weniger wegen der Menge als wegen der Natur der Nebenkomponten und der Stabilität der Retentionszeiten: je grösser die Kapazität der LC-Säule, desto weniger beeinflusst polares Material das Fenster der zu transferierenden Fraktion. 2 mm I.D.-Säulen (10 cm Länge) haben sich als Kompromiss bewährt.

Als mobile Phasen werden flüchtige Lösungsmittel vorgezogen, um die selektive Lösungsmittelabdampfung zu erleichtern. Das anfänglich benützte Gemisch von n-Pentan mit 20% MTBE bewährte sich nicht, da die γ -Lactonfraktion teilweise mit den Triglyceriden co-eluierte und MTBE empfindliche UV-Detektion bei kurzen Wellen (220 nm) behindert. n-Pentan mit 3% Methanol löste diese Probleme, doch konnten so die δ -Lactone nicht mehr von den γ -Lactonen getrennt werden (δ -Lactone werden im GC teilweise mit den γ -Lactonen co-eluiert). Pentan gesättigt mit Acetonitril genügte allen diesen Ansprüchen.

Bestimmung des Transferfensters

Das Fenster der in den GC zu transferierenden LC-Fraktion wurde mittels einer 100-ppm-Lösung von drei Standards bei 220 nm bestimmt: Mit γ -Dodecalacton, dem zuerst eluierten γ -Lacton (Abb. 2), wurde der Beginn der Fraktion festgelegt, mit γ -Octalacton, dem zuletzt eluierten der interessierenden γ -Lactone, deren Ende. δ -Decalacton diente zur Absicherung, dass die übertragene Fraktion kein δ -Lacton enthielt.

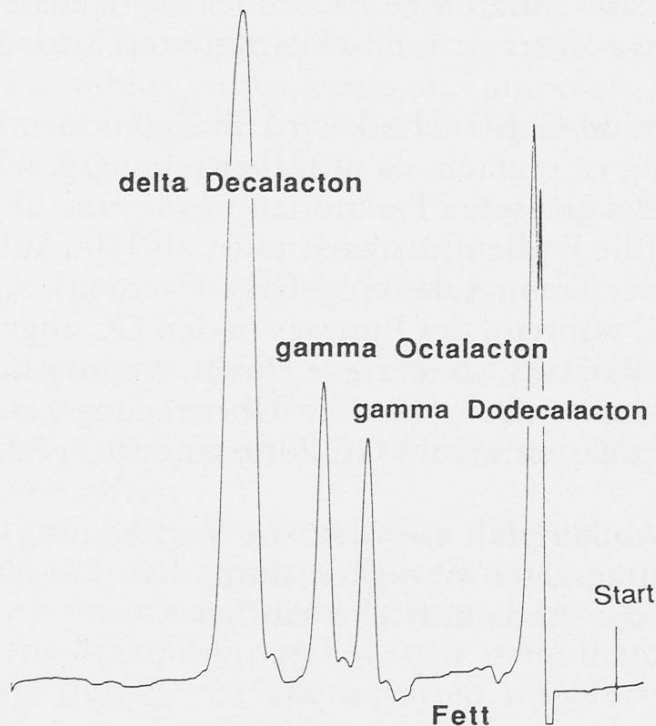


Abb. 2. Flüssigchromatogramm von Standards zur Festlegung des Fensters der γ -Lactone. Triglyceride (Fett) und δ -Lactone müssen von den γ -Lactonen abgetrennt werden, was durch die Verwendung von acetonitrilgesättigtem n-Pentan erreicht wurde

Fraktionen aus Proben wurden nach absoluten LC-Retentionszeiten übertragen, da der UV-Detektor keine Lactone in den Lebensmittelproben zu detektieren vermag (die Empfindlichkeit ist zu gering und andere Substanzen stören das Flüssigchromatogramm). Das Fenster der transferierten LC-Fraktion konnte beidseits um 30 s verbreitert werden, ohne dass damit im GC Störpeaks auftraten. So entstand eine Fraktionsbreite von 3,5 min, entsprechend einem Fraktionsvolumen von 665 μl . Zur Überprüfung eventueller Verschiebungen des LC-Fensters durch polares Material in den Lebensmittelextrakten wurden einigen Proben im UV-Detektor sichtbare Mengen δ -Decalacton zugesetzt. Relevante Verschiebungen wurden keine festgestellt.

Wahl der Abdampftechnik und des Transfer-Interfaces

Gekoppelte LC-GC wird mit zwei verschiedenen Transfertechniken realisiert (9); die Wahl der Transfertechnik richtet sich in erster Linie nach der GC-Elutionstemperatur. Die γ -Octalactone werden bei ca. 120 °C eluiert. Für den Transfer grösserer Fraktionen mit vollständig simultaner Abdampfung («concurrent eluent evaporation») ist bei diesen Elutionstemperaturen mit breiten Peaks und/oder mit Verlusten durch den frühen Dampfausgang zu rechnen. Bei Retention-Gap-Techniken wird Solvent Trapping (ein Lösungsmittelleffekt) ausnützlich, was flüchtige Komponenten bis zum Ende der Lösungsmittelabdampfung im Säuleneingang zurückhält. Dadurch können schon bei der Säulentemperatur während des Transfers scharfe Peaks eluiert werden, wobei die Transfertemperaturen tief liegen können (sie müssen unter dem druckkorrigierten Siedepunkt des Lösungsmittels bleiben).

Die klassische Retention-Gap-Technik wird für Fraktionen bis etwa 100 μl verwendet. Ihre Anwendung ist einfach, da die Übertragungsgeschwindigkeit in den GC keine Rolle spielt. Bei grösseren Fraktionen würde eine übermässig lange unbelegte Vorsäule nötig (die Probenflüssigkeit muss als Film auf der Wand der unbelegten Vorsäule von der Trennsäule ferngehalten werden). Statt dessen wird ein Teil des Eluates vom LC während des Eintrags in den GC abgedampft (partiell simultanes Abdampfen, «partially concurrent eluent evaporation»). Partiiell simultanes Abdampfen heisst aber auch, dass die Übertragungsgeschwindigkeit (bzw. der LC-Fluss) und die Abdampftrate im GC aufeinander abgestimmt werden müssen.

Partiiell simultanes Abdampfen erfordert die Verwendung des on-column Interfaces, damit die Eintragungsgeschwindigkeit durch den LC-Fluss bestimmt wird und das Trägergas an die Abdampfstelle einfliesst.

GC-Vorsäulensystem

Transfer einer Fraktion von 665 μl Volumen mit Retention-Gap-Technik setzt partiell simultanes Abdampfen voraus, d. h. eine Abdampftrate im GC, die dem

Fluss des LC-Eluenten nahe kommt. Wenn die Lösungsmitteldämpfe bei normalem Trägergaseingangsdruck durch die ganze GC-Trennsäule abfließen, werden Abdampfraten von 5–30 $\mu\text{l}/\text{min}$ erreicht. Diese sind zu tief, um bei LC-Flüssen von ca. 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ (optimal for 2 mm I.D. LC-Säulen) einen namhaften Anteil simultan abdampfen zu lassen. Damit sich die Abdampfraten erhöhen, muss der Abfluss der Dämpfe mit einem frühen Lösungsmittelausgang beschleunigt werden. Dazu wird ein Dampfausgang nach einer weiten (0,53 mm I.D.) unbelegten Vorsäule und einer belegten Vorsäule (retaining pre-column) von ca. 3 m Länge eingefügt. Der Ausgang steht während des Abdampfens offen, wird dann aber für die GC-Analyse bis auf einen kleinen Spülstrom geschlossen. Typische Abdampfzeiten mit einem frühen Dampfausgang liegen bei 120–180 $\mu\text{l}/\text{min}$ und damit im gewünschten Bereich wenig unter dem LC-Fluss.

Entsprechend dem Standardsystem für partiell simultanes Abdampfen wurde eine 10 m x 0,53 mm i.d. unbelegte Vorsäule verwendet: Duran-Glas, persilyliert mit Diphenyltetramethyldisilazan (DPTMDS).

Die belegte Vorsäule besteht normalerweise aus einem Stück der Trennsäule. Aus drei Gründen wurde in unserem Falle aber ein 3 m x 0,32 mm I.D. Stück einer anderen Säule eingesetzt: Die Trennsäule war zu eng (0,23 mm I.D.) und hätte damit die Abdampfrate massiv erniedrigt. Zweitens zeigte sich, dass die Lactone nicht bei der Transfertemperatur in die Trennsäule gelangen sollten (die Peaks sind verbreitert, möglicherweise weil der Cyclodextrin-Phasenanteil fest ist); von einer mit einer flüssigen Phase belegten Vorsäule wurden die Lactone erst bei höheren Temperaturen in die Cyclodextrinsäule übertragen. Schliesslich war die stationäre Phase der Trennsäule nicht immobilisiert, was im Falle eines Flutens in die belegte Vorsäule zur Zerstörung des Films der stationären Phase geführt hätte. Wegen der guten Immobilisierung wurde eine unpolare Phase benützt (PS-255). Da die Retentionskraft ungefähr jener der Trennsäule entsprechen muss, wurde eine Filmdicke von 0,3 μm gewählt.

GC-Bedingungen

Als Trennsäule diente eine 25 m x 0,23 mm I.D. Glaskapillare, persilyliert (10) und belegt mit einer Mischung von 33% 2,6-di-O-pentyl-3-O-acetyl- α -Cyclodextrin (11) und 67% OV-1701-OH (0,17 μm Filmdicke). Das Trägergas war druckreguliert: 1 bar Wasserstoff.

Für die Retention-Gap-Techniken muss die Ofentemperatur während des Transfers unter dem druckkorrigierten Eluentensiedepunkt gehalten werden (der Eluentendampfdruck muss unter dem Trägergaseingangsdruck bleiben). Temperaturen nahe diesem Maximum sind jedoch vorteilhaft, um die Abdampfrate hoch zu halten. Sie dürfen erst überschritten werden, wenn die Abdampfung beendet ist.

Nach *Clausius Clapeyron* beträgt der druckkorrigierte Siedepunkt von Pentan ca. 60 °C (12). Aus praktischen Gründen muss die Transfertemperatur um eine «Sicherheitsmarge» tiefer bleiben. Für die on-column Einspritzung gilt als Regel,

dass die maximale Säulentemperatur bei der Einspritzung dem Standardsiedepunkt des Lösungsmittels plus 1 Grad pro 0,1 bar Eingangsdruck entsprechen darf (13). Für Pentan mit einem Standardsiedepunkt von 36 °C und 1 bar Eingangsdruck wäre die maximale Transfertemperatur also 46 °C.

Wir wählten eine Abdampftemperatur von 48 °C, nach 4 min gefolgt von einem schnellen Temperaturanstieg (20 °/min) auf 100 °C und einer Analyse mit 1,5 °/min bis 165 °C. Für die gute Auflösung chiraler γ -Lactone ist eine tiefe Elutionstemperatur entscheidend, was unüblich hohe Trägergasflüsse und langsame Temperaturprogramme erfordert (14).

Erforderlicher Anteil simultaner Abdampfung

10 m x 0,53 mm I.D. unbelegte Vorsäulen können maximal ca. 100 μ l Flüssigkeit zurückhalten (vorausgesetzt der LC-Eluent benetzt die Kapillarwand). Da die LC-Fraktion ein Volumen von 665 μ l aufwies, mussten 85 % des Eluenten während des Transfers abgedampft werden. Das setzt eine relativ genaue Abstimmung des LC-Flusses auf die Abdampfrate voraus, was als erste Stufe die Bestimmung der Abdampfrate nötig macht.

Bestimmung der Abdampfrate

Abdampfzeiten wurden via Dauer des Dampfaustritts aus dem Lösungsmittelgang gemessen: Der ausströmende Trägergas-Wasserstoff wurde entzündet. Wasserstoff brennt als praktisch farblose Flamme. Tritt aber Lösungsmitteldampf aus, verfärbt sich die Flamme gelb. Die Dauer der Gelbfärbung entspricht ziemlich genau der Abdampfzeit.

In einem ersten Schritt wurde die ungefähre Abdampfrate mit einem LC-Fluss bestimmt, der sicher über der Abdampfrate lag: 300 μ l/min. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die unbelegte Vorsäule nicht überladen wird. Es wurde davon ausgegangen, dass keine namhafte Menge Lösungsmittel simultan abdampft, womit maximal 100 μ l Eluent übertragen werden konnte: das Transferventil wurde während 20 s auf «transfer» gestellt. Die Flamme färbte sich während 36 s gelb, woraus sich eine Abdampfrate von 165 μ l/min ergibt.

In einer zweiten Stufe wurde die Abdampfrate bei Bedingungen überprüft, die näher bei den gewünschten Übertragungsbedingungen lagen; Überladung der unbelegten Vorsäule wurde über den geschätzten Anteil simultan abdampfenden Lösungsmittels verhindert. Der LC-Fluss betrug 190 μ l/min, war also 25 μ l/min über der vorher gemessenen Abdampfrate. Der Transfer erfolgte während 2 min (380 μ l). Aus einer gemessenen Abdampfzeit von 133 s ergab sich eine Abdampfrate von 172 μ l/min. Da die Abdampfzeit die Transferzeit um 13 s überschritt, befand sich am Ende des Transfers 41 μ l Flüssigkeit in der unbelegten Vorsäule, d. h. deren Kapazität wurde bei weitem nicht ausgeschöpft. Schliesslich wurde so übertragen, wie es für die Methode nötig war: Transfer eines Volumens von

665 μl bei 190 $\mu\text{l}/\text{min}$, d. h. während 3,5 min. Aus der Abdampfzeit von 233 s ergab sich eine Abdampftrate von 171 $\mu\text{l}/\text{min}$. Da die Abdampfzeit die Transferzeit um 23 s überschritt, befand sich am Ende des Transfers 66 μl Eluent in der unbelegten Vorsäule. Mit etwas Erfahrung oder aufgrund publizierter Abdampfraten (8, 15) reduziert sich das obige Prozedere auf eine oder zwei Bestimmungen.

Verschluss des Dampfausgangs

Der Lösungsmitteldampfausgang wurde nach vollständigem Ausspülen des Dampfes geschlossen (die belegte Vorsäule verhinderte ein Entweichen der Lactone mit den Lösungsmitteldämpfen). Der Zeitpunkt für den Verschluss dieses Ausgangs war relativ unkritisch, weil ein flüchtiger Eluent verwendet wurde: Da der Transfer bei 48 °C erfolgte, der erste Peak von Interesse (Octalacton) aber erst bei etwa 120 °C eluiert wurde, hatte die belegte Vorsäule eine hohe Retentionskraft und konnte ein Entweichen von Probenmaterial auch dann verhindern, wenn der Ausgang spät verschlossen wurde. Der Ausgang wurde automatisch 40 s nach Rückstellung des Transferventils verschlossen (bzw. auf eine starke Restriktion, 1 m x 75 μm I.D., umgestellt, die einen kleinen Spülstrom zuließ). Der Ablauf der Analyse, insbesondere der Übertragung, ist in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1. Fahrplan (min, s) der LC-GC-Analyse von γ -Lactonen mit dem Prototypen des Carlo Erba Dualchrom 3000

0,00	GC-Ofentemperatur auf 48 °C eingestellt, die LC-Pumpe auf 190 $\mu\text{l}/\text{min}$ mit einer «run time» von 20 min (automatisches Auffüllen der Spritzenpumpe, falls Inhalt nicht für diese Analysendauer ausreicht)
0,00	Einspritzung von 10 μl Probe
5,00	Transferventil auf Übertragung gestellt, Lösungsmitteldampfausgang geöffnet und GC gestartet (4 min isotherm bei 48 °C)
8,30	Transferventil zurückgestellt
8,40	Rückspülung der LC-Säule mit 1 ml MTBE (Schaltung des Backflush-Ventils)
9,10	Lösungsmitteldampfausgang geschlossen
18,40	Rückstellung des Backflush-Ventils

Resultate

Joghurt

Wir analysierten eine Reihe von Früchtejoghurts aus dem Schweizer Handel, insbesondere auch solche, welche als «extra-fruchtig» beschriftet waren. Das Gaschromatogramm der γ -Lactone entsprach der Erwartung, dass Milchprodukte neben viel synthetischen Aromen kaum Aromen aus Früchten enthalten: Im Gemisch der racemischen γ -Lactone waren keine signifikanten Mengen von Lactonen aus den Früchten feststellbar, insbesondere kein Überschuss an R- γ -Decalacton und R- γ -Dodecalacton (Nachweisgrenze ca. 2% bezüglich der racemischen γ -Lactone). Bezüglich Molekulargröße waren die gefundenen γ -Lacton-Mischungen meistens jener ähnlich, welche *Schmarr* (8) für einen (ebenfalls schweizerischen) Erdbeerquark festgestellt hat: dominantes racemisches γ -Undecalacton mit etwas kleineren Doppelpeaks für γ -Deca- und γ -Dodecalacton.

Konfitüre

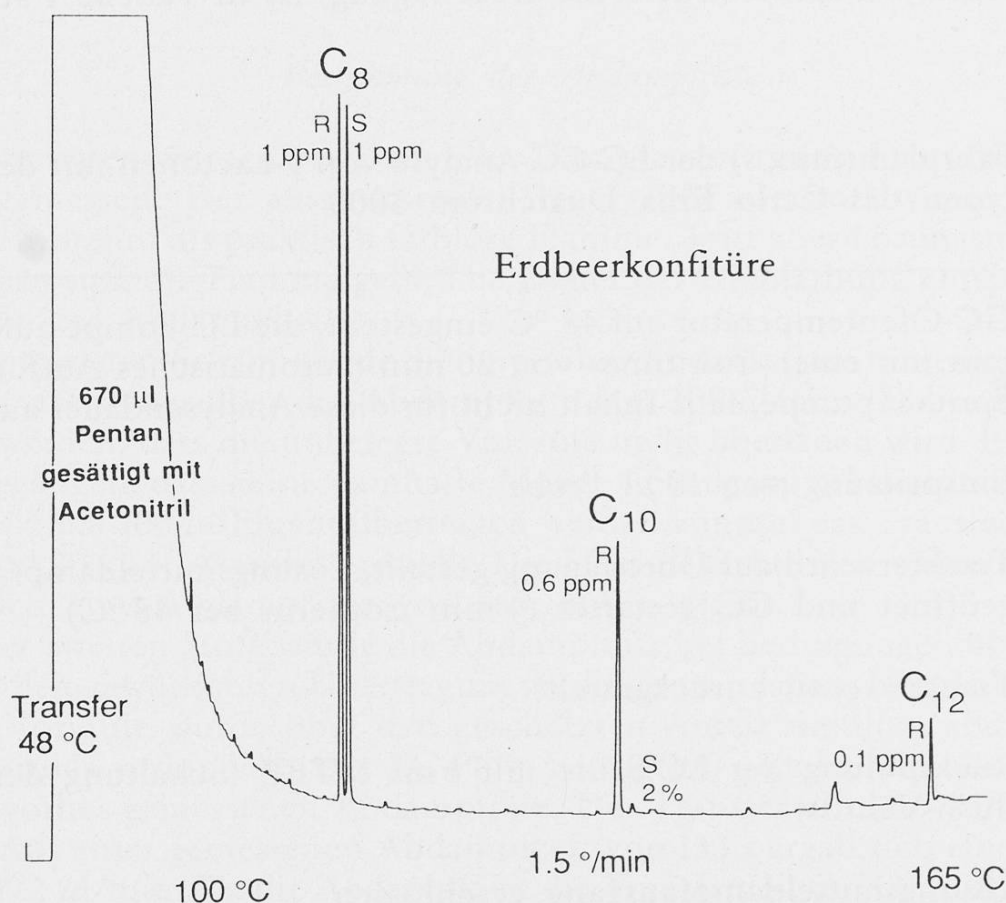


Abb. 3. γ -Lactone einer Erdbeerkonfitüre. Racemisches γ -Octalacton (C₈) diente als interner Standard. Die nahezu enantiomerenreinen γ -Deca- und Dodecalactone entsprechen der natürlichen Verteilung in Erdbeeren

Abbildung 3 zeigt ein LC-GC-FID-Chromatogramm der γ -Lactone aus einer Erdbeerkonfitüre. R- γ -Deca- und Dodecalacton dominieren, die entsprechenden S-Enantiomere sind klein und die γ -Undecalactone fehlen, was zeigt, dass keine synthetischen γ -Lactone zugefügt worden waren. Die Zusammensetzung entspricht jener, die von *Schmarr* et al. (8) für Erdbeeren beschrieben wurde. Die absoluten Gehalte sind aber gering. In vielen anderen Erdbeer- und Aprikosenkonfitüren waren sie noch tiefer oder gar unter der Nachweisgrenze (0,05 ppm). Offenbar gehen die γ -Lactone bei der Herstellung der Konfitüren durch Abdampfung oder Zersetzung verloren. In keiner der ca. 20 Konfitüren wurden Aromenzusätze nachgewiesen.

Kokosaroma

Abbildung 4 zeigt das Resultat einer Analyse von «natürlichem Kokosaroma», erhoben in einer Confiserie. Da γ -Lactone in Kokosnüssen nicht racemisch sind, kann das Aroma nicht natürlich (d. h. aus Kokosnuss gewonnen) sein, sondern

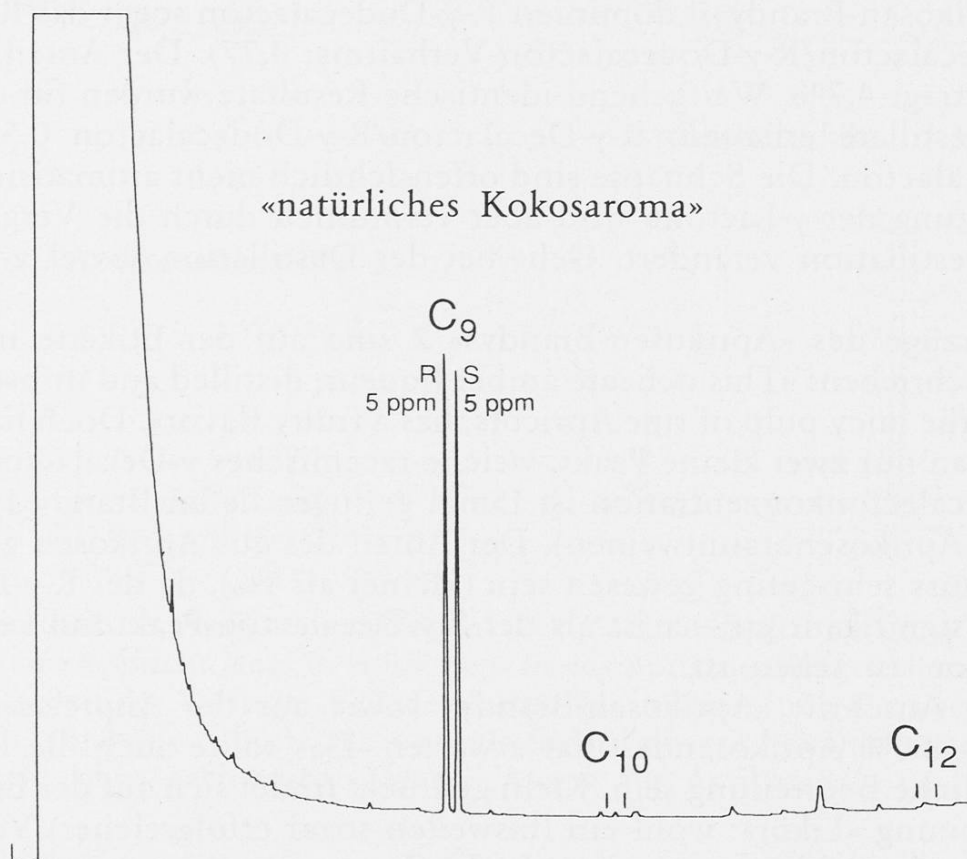


Abb. 4. γ -Lactone in einem Kokosaroma. Der Unterschied zwischen natürlichen und synthetischen («naturidentischen») Aromen ist vielerorts unklar – auch weil der Begriff «naturidentisch» irreführend ist. Die Analyse dieses Kokosaromas zeigt klar, dass das Aroma synthetisch hergestellt ist; in der Zusammensetzung ist es nicht wirklich identisch mit dem natürlichen Aroma

entspricht dem, was man als «naturidentisch» bezeichnet (allerdings mit den natürlichen γ -Lactonen nicht identisch ist!). Die Probe soll als Beispiel für manche andere zeigen, dass in der Praxis der Unterschied zwischen natürlichen und synthetischen Aromen nicht genügend beachtet wird (das Aroma wurde im Glauben verwendet, es stamme aus Kokosnüssen).

Aprikosenschnäpse

Abbildung 5 zeigt die γ -Lactone aus einem Aprikosennektar sowie aus drei alkoholischen Getränken auf Basis von Aprikosen oder Aprikosenaromen. Das Chromatogramm des Aprikosennektars zeigt einen grossen Peak für R- γ -Decalacton, einen etwas kleineren für R- γ -Dodecalacton sowie einen S- γ -Decalacton-Peak, der 4,4% des R- γ -Decalactons entspricht. Das Verhältnis von R- γ -Decalacton zu R- γ -Dodecalacton von 2,7 ist wesentlich kleiner als in (1) angegeben: dort schwankten die Verhältnisse zwischen 5,8 und 50, also wurde im Verhältnis zu R- γ -Decalacton wesentlich weniger R- γ -Dodecalacton gefunden. Für Aprikosenkonfitüren fanden wir ebenfalls Verhältnisse unter 3.

Im «Aprikosen-Brandy» 1 dominiert R- γ -Dodecalacton sogar das R- γ -Decalacton (R- γ -Decalacton/R- γ -Dodecalacton-Verhältnis: 0,77). Der Anteil an S- γ -Decalacton beträgt 4,7%. Weitgehend identische Resultate wurden für drei weitere Aprikosendestillate erhalten: R- γ -Decalacton/R- γ -Dodecalacton 0,52–0,81, 4–5% S- γ -Decalacton. Die Schnäpse sind offensichtlich nicht aromatisiert. Die Zusammensetzung der γ -Lactone wird aber vermutlich durch die Vergärung und/oder die Destillation verändert. Geht bei der Destillation soviel γ -Decalacton verloren?

Die Vorzüge des «Aprikosen-Brandys» 2 sind auf der Etikette in blumigen Worten beschrieben: «This delicate amber liqueur, distilled and infused from the kernel and the juicy pulp of ripe Apricots, has a fruity flavor». Doch in der Analyse findet man nur zwei kleine Peaks, welche racemisches γ -Decalacton anzeigen. Die R- γ -Decalactonkonzentration ist 15mal geringer als im Brandy 1 (und anderen echten Aprikosenbranntweinen). Der Anteil des aus Aprikosen gewonnenen Alkohols muss sehr gering gewesen sein (kleiner als 1%), da der R- γ -Decalacton-Peak nicht signifikant grösser ist als der S- γ -Decalacton-Peak und keinerlei R- γ -Dodecalacton zu sehen ist.

Aus der Anschrift «Aprikosen-Brandy» sowie aus der Anpreisung wird der Konsument 100% Aprikosendestillat erwarten. Das sollte auch die Richtschnur für die amtliche Beurteilung sein. Klein gedruckt findet sich auf der Etikette auch die Bezeichnung «Likör»: wohl ein (bisweilen sogar erfolgreicher) Versuch, sich juristisch aus der Schlinge zu ziehen. In der Zusammensetzung wird auch «natürliches Aroma» aufgeführt, was aber nach der Analyse unhaltbar ist: mindestens die γ -Lactone sind synthetisch hergestellt.

Das letzte Chromatogramm stammt von einem Aprikosenlikör. Gemäss Zusatzstoffverordnung des schweizerischen Lebensmittelbuches darf ein Likör mit Aromen «leicht» verstärkt werden, wobei als Aromen nur «naturidentische» Aro-

men zugelassen sind. Die Analyse zeigt einen hohen Gehalt an γ -Lactonen, wobei das γ -Undecalacton dominiert. Alle γ -Lactone sind racemisch, lassen damit keinerlei R- γ -Lactone aus Aprikosen erkennen. Derartige Resultate wurden für die Mehrzahl der untersuchten Likörs erhalten, was die Frage offen lässt, was als «leichte Verstärkung» des Aromas durch synthetisch erzeugte Aromen gelten darf.

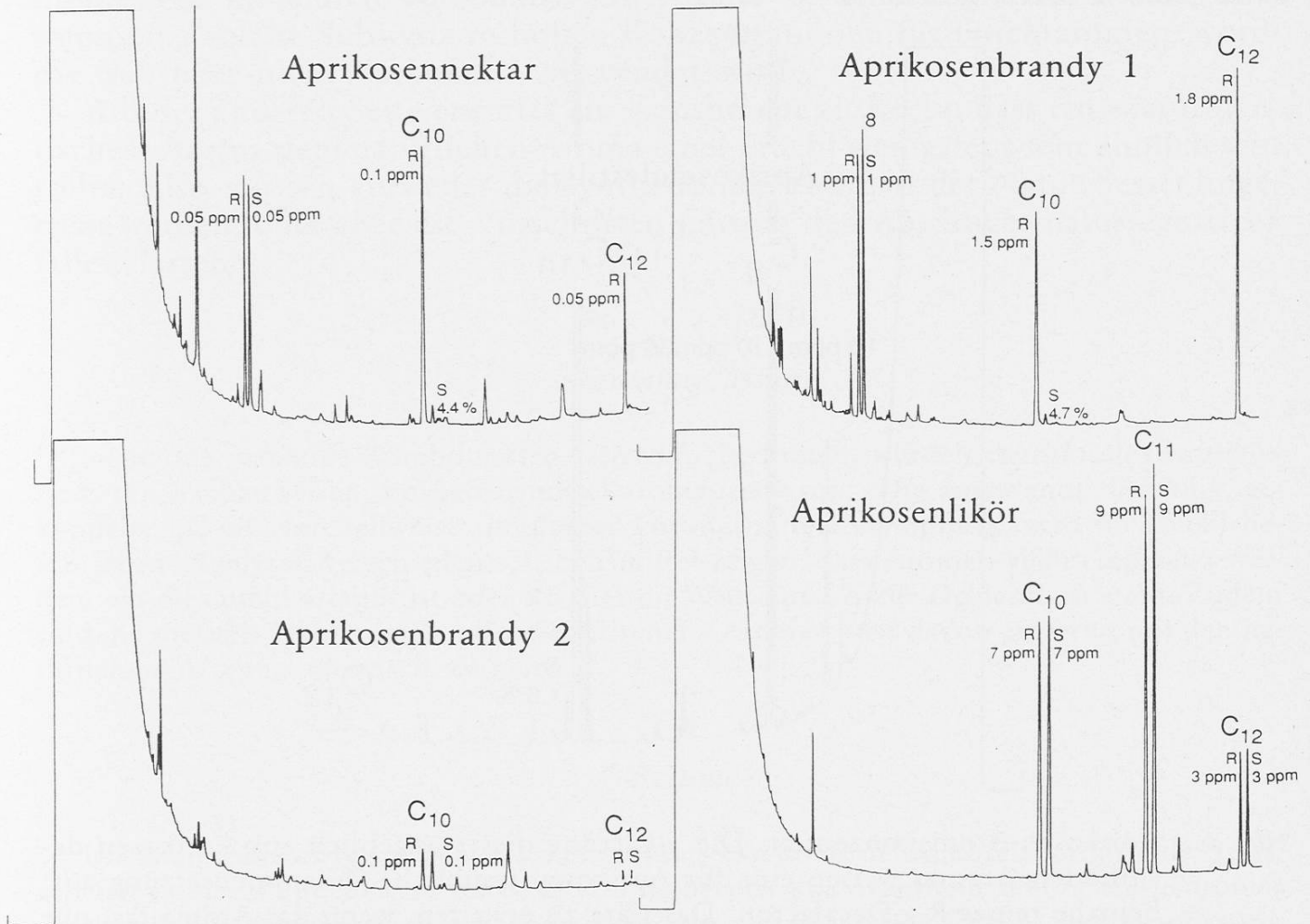


Abb. 5. γ -Lactone aus Aprikosenprodukten. Die Zusammensetzung der γ -Lactone im Nektar entspricht jener in Aprikosen. In aus Aprikosen hergestellten Branntweinen («Brandy» 1) ist das γ -Dodecalacton gegenüber dem γ -Decalacton angereichert. «Brandy» 2 dürfte aus aromatisiertem Feinsprit bestehen. Auch der Likör enthält keine nachweisbare Menge Aroma aus Aprikosen

Aromakonzentrat aus Aprikosen (?)

Abbildung 6 zeigt die γ -Lactone eines Aromakonzentrates, bezeichnet als Destillat aus Aprikosen. Die Zusammensetzung der γ -Lactone weicht stark von jener der Abbildung 5, insbesondere von jener des Nektars, ab: Das Verhältnis von

R- γ -Decalacton zu R- γ -Dodecalacton überschreitet 300. Der Gehalt an S- γ -Decalacton entspricht 1,6% des R- γ -Decalactons, was ebenfalls abnormal ist. Die Analyse legt eine kräftige Verstärkung durch fermentativ aus Ricinolsäure hergestelltes γ -Decalacton nahe, das praktisch R-enantiomerenrein ist. Der Zusatz von solchem Aroma kann fast nur über das Verhältnis von R- γ -Decalacton zu R- γ -Dodecalacton festgestellt werden, da das «passende» R/S-Verhältnis leicht über einen kleinen Zusatz von racemischem γ -Lacton erhalten werden kann (was in diesem Falle jedoch nicht geschah).

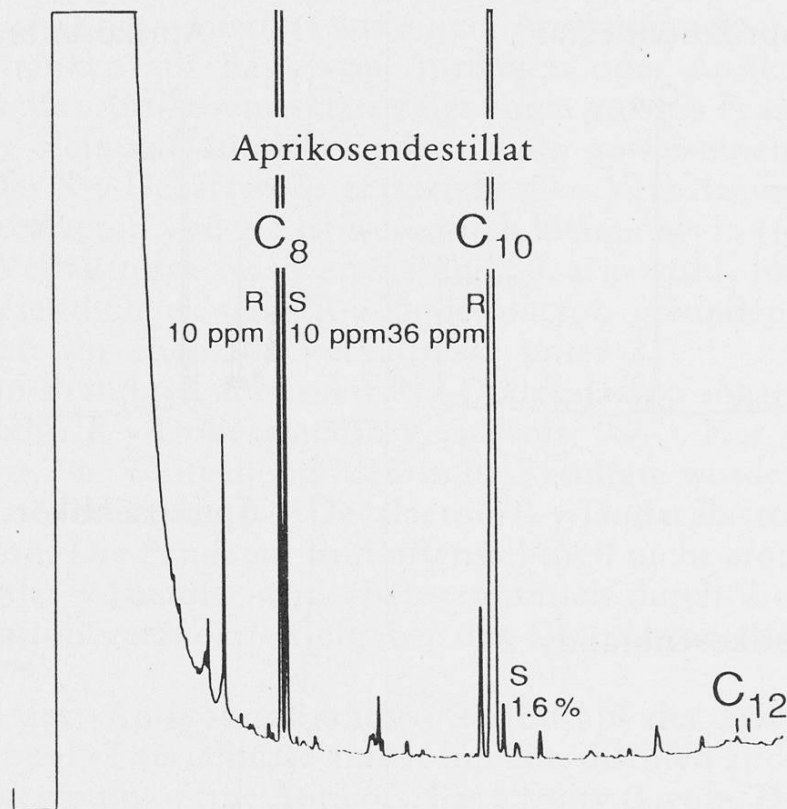


Abb. 6. Aprikosen-Aromakonzentrat. Die γ -Lactone dieses angeblich aus Aprikosen destillierten Aromas weisen eine für Aprikosen unübliche Zusammensetzung auf: beinahe reines R- γ -Decalacton. Das wäre zu erwarten, wenn das Aroma fast nur aus Ricinolsäure hergestelltes Lacton enthielte

Diskussion

Breitere Analytik der γ -Lactone wurde erst durch die Einführung chiraler Trennphasen möglich und hat wesentlich von der effizienten Vorreinigung durch LC profitiert. Die Resultate zeigen ein Bild, wie es in einem Gebiet zu erwarten ist, das bisher analytisch vernachlässigt wurde: Die Möglichkeit, Früchte durch billigere Aromen zu ersetzen, wurde (mindestens) bis an den Rand der gesetzlichen Anforderungen ausgenützt.

Die Anforderung der eidgenössischen Lebensmittelverordnung, dass synthetische Aromen in den meisten Fällen «naturidentisch» sein müssen, bedarf wohl

einer genaueren Definition. Die gezeigten Chromatogramme zeigen deutlich, dass «naturidentische» Aromen oft weit davon entfernt sind, mit der Natur identisch zu sein. Weder stimmt das Verhältnis der Enantiomeren untereinander noch die Anzahl der Kohlenstoffatome mit den natürlichen Aromen überein (in «naturidentischen» Aromen überwiegt häufig das Undecalacton, das in der Natur höchstens in geringen Spuren vorkommt). Im Sinne des Gesetzes gilt die Regel, dass eine Substanz dadurch «naturidentisch» wird, dass sie irgendwo in der Natur mindestens in Spuren vorkommt. Ein Aroma ist auch dann «naturidentisch», wenn eine solche Substanz in hohen Konzentrationen für Fruchtaromen, worin die Substanz nicht vorkommt, verwendet wird.

Auf der anderen Seite erwartet ein Konsument zu Recht, dass ein «naturidentisches» Aroma dem natürlichen Aroma einer Frucht wenigstens sehr ähnlich sein sollte. Also müssen entweder die synthetischen Aromen der Natur besser angepasst werden, oder aber die Vorschriften müssen den Ausdruck «naturidentisch» fallen lassen.

Zusammenfassung

γ -Lactone, wichtige Komponenten vieler Fruchtaromen, wurden enantioselektiv analysiert, um nachzuweisen, ob Lebensmittel aromatisiert sind. Die angewandte Technik, gekoppelte LC-GC mit teilweise simultaner Lösungsmittelabdampfung, wird im Detail beschrieben. Analysen verschiedener Lebensmittel zeigen, dass Aromen auch eingesetzt werden, wo dies nicht erlaubt ist oder wo dies im Widerspruch zur Deklaration steht. Zudem sind die meisten verwendeten «naturidentischen» Aromen weit davon entfernt, mit den natürlichen Aromen identisch zu sein.

Résumé

Les énantiomères des γ -lactones, composants essentiels de nombreux arômes de fruits, ont fait l'objet d'une analyse sélective afin de déceler une éventuelle adjonction d'arômes synthétiques aux aliments. La méthode employée, soit le système CL-CG avec évaporation en partie simultanée du solvant est décrite en détail. Les analyses montrent que des arômes synthétiques sont parfois ajoutés à des aliments pour lesquels une telle adjonction n'est pas permise ou que leur présence n'est pas mentionnée correctement dans la liste des ingrédients. En outre, la majeure partie des arômes «identiques aux naturels» employés sont en réalité loin d'être identiques aux naturels.

Summary

γ -Lactons, important components of many fruit flavours, were enantioselectively analyzed for determining whether foods contain synthetic flavours. The analytical technique applied, coupled LC-GC involving partially concurrent eluent evaporation, is described in detail. Analyses of several foods reveal that some artificial flavours are used against the law

or against the declaration. Furthermore, most of the synthetic flavours, which must be «identical with nature» according to Swiss law, are far removed from being so.

Literatur

1. Guichard, E., Kustermann, A. and Mosandl, A.: Chiral flavour compounds from apricots. Distribution of γ -lactone enantiomers and stereodifferentiation of dihydroactinidiolide using multi-dimensional GC. *J. Chromatogr.* **498**, 396–401 (1990).
2. Mosandl, A., Hener, U., Hagenauer-Hener, U. and Kustermann, A.: Direct enantiomer separation of chiral γ -lactones from foods and beverages by multidimensional GC. *HRC* **12**, 532–536 (1989).
3. Feuerbach, M., Fröhlich, O. and Schreier, P.: Chirality evaluation of 1,4-decanilide in peach. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 1236–1237 (1988).
4. Engel, K. H.: Investigation of chiral compounds in biological systems by chromatographic micromethods. In: Schreier, P. (ed.), *Bioflavor '87*, p. 75–88. De Gruyter, Berlin, New York 1988.
5. Juvancz, Z., Alexander, G. and Szeitli, J. Permethylyated beta-cyclodextrin as stationary phase in capillary GC. *HRC & CC* **10**, 105–107 (1987).
6. Aichholz, R., Bölz, U. and Fischer, P.: A standard mixture for assessing enantioselectivity of chiral phase capillary GC columns – CHIRAL-test I for amide phases. *HRC* **13**, 234–238 (1990).
7. Bernreuther, A., Christoph, N. and Schreier, P.: Determination of enantiomeric composition of γ -lactones in complex natural matrices using multidimensional capillary GC. *J. Chromatogr.* **481**, 49–54 (1989).
8. Schmarr, H.-G., Mosandl, A. and Grob, K.: Stereoisomeric flavour compounds XXXVIII: Direct chiroselective analysis of γ -lactones using on-line coupled LC-GC with a chiral separation column. *Chromatographia* **29**, 125–130 (1990).
9. Grob, K.: On-line coupled LC-GC. Hüthig, Heidelberg 1990.
10. Grob, K.: Making and manipulating capillary columns for GC. Hüthig, Heidelberg 1986.
11. Schmarr, H.-G.: Dissertation, Universität Frankfurt (in preparation).
12. Weast, R.C. (Ed.): *Handbook of chemistry and physics*, p. 59th ed., D-228. CRC Press, Cleveland, OH 1978.
13. Grob, K.: On-column injection in capillary GC. Hüthig, Heidelberg 1987.
14. Grob, K., Neukom, H. P., Schmarr, H.-G. and Mosandl, A.: Separation efficiency versus resolution: Chiral separation of γ -lactones by capillary GC on derivatized cyclodextrin. *HRC* **13**, 433–436 (1990).
15. Schmarr, H.-G., Mosandl, A. and Grob, K.: Coupled LC-GC: Evaporation rates for partially concurrent eluent evaporation using an early solvent vapor exit. *HRC* **12**, 721–726 (1989).

Anna Artho
Dr. Konrad Grob
Kantonales Laboratorium
Postfach
CH-8030 Zürich

Kurze Mitteilungen — Communications brèves

Praktische Erfahrungen mit den Selektivmedien Oxford und Palcam zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* aus kontaminierten Materialien

Practical Experiences with the Selective Media Oxford and Palcam for Isolating *Listeria monocytogenes* from Contaminated Materials

T. Jemmi, P.-F. Gobat und Susanne Guyer
Bundesamt für Veterinärwesen, Liebefeld-Bern

Einleitung

Vier Listerioseepidemien in Nordamerika und der Schweiz (1–4) haben einen gesicherten Zusammenhang zu kontaminierten Lebensmitteln aufgezeigt. Diese Ereignisse verstärkten das Bedürfnis nach selektiven Nachweisverfahren für *Listeria (L.) monocytogenes* aus Lebensmitteln und anderen kontaminierten Materialien. Vor 1983 waren nur vier Selektivmedien in der Literatur beschrieben (5–8) und meist wurde mit der Kälteanreicherung gearbeitet. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Kulturmedien und Methoden beschrieben (9). In mehreren Studien wurden diese Nachweisverfahren untereinander verglichen (10–13).

In der Schweiz wurde 1988 ein Verfahren in das Schweizerische Lebensmittelbuch (14) aufgenommen, das auf einer zweistufigen Warmanreicherung mit nachfolgender Isolation auf den beiden Medien modified McBride-Agar (mMB) und Acriflavin-Ceftacidime-Agar (AC) beruht (15–16).

1989 wurden zwei neue Agarmedien, Oxford (17) und Palcam (18), beschrieben. Diese steigern im Gegensatz zu mMB- und AC-Agar die Isolationsraten für Listerien aus Lebensmitteln deutlich (19). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die beiden Medien Oxford und Palcam miteinander zu vergleichen und ihre Eignung für die Praxis genauer zu untersuchen.

Material und Methoden

Insgesamt wurden 1 814 Proben qualitativ auf das Vorkommen von *L. monocytogenes* untersucht. Dabei handelte es sich um 1 048 Fleischerzeugnisse, 474 Fischerzeugnisse sowie 292 Proben aus Umgebungsuntersuchungen in Schlacht-

höfen. Die Proben stammten teils aus unseren Untersuchungen zu Handen des grenztierärztlichen Dienstes, teils wurden sie im Rahmen zweier Forschungsprojekte (20–21) erhoben.

Die Untersuchungen auf *L. monocytogenes* wurde gemäss dem Schweizerischen Lebensmittelbuch (14) durchgeführt, ausser dass anstelle des AC- und mMB-Agars die neuen Medien Oxford und Palcam eingesetzt wurden (19). Alle Medien wurden teils selbst hergestellt, teils als Fertigmedien im Handel gekauft.

Statistische Auswertungen wurden mit Hilfe des t-Testes (22) durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

In insgesamt 280 Proben (15%) konnten Listerien gefunden werden, wovon 92mal (5%) *L. monocytogenes*. Die Isolationshäufigkeiten der beiden Medien Oxford und Palcam sind in Tabelle 1 festgehalten. Meistens wurden die Listerien auf beiden Medien nachgewiesen; es gab aber auch Fälle, in denen sie nur auf einem Medium festgestellt wurden. Auf dem Palcam-Medium werden zwar höhere Isolationsraten sowohl für das Genus *Listeria* als auch die Spezies *L. monocytogenes* verzeichnet, doch sind diese Unterschiede minim und statistisch nicht signifikant. Oxford und Palcam sind demnach in bezug auf die Nachweishäufigkeit als gleichwertig einzustufen.

Tabelle 1. Nachweishäufigkeiten von Listerien mit den beiden Agarmedien Oxford und Palcam

Untersuchungsgut	Nachweis von Listerien		Nachweis von <i>L. monocytogenes</i>	
	Oxford	Palcam	Oxford	Palcam
Fleischerzeugnisse (<i>n</i> = 1 048)	144 (13,7%)	159 (15,2%)	39 (3,7%)	43 (4,1%)
Fischerzeugnisse (<i>n</i> = 474)	77 (16,2%)	78 (16,5%)	34 (7,2%)	32 (6,8%)
Umgebungsproben (<i>n</i> = 292)	32 (11,0%)	35 (12,0%)	13 (4,5%)	14 (4,8%)
TOTAL (<i>n</i> = 1 814)	253 (14,0%)	272 (15,0%)	86 (4,7%)	89 (4,9%)

Bei insgesamt 963 Proben (560 Fleisch- und 188 Fischerzeugnisse, 215 Umgebungsuntersuchungen) wurde auch das Wachstum bzw. die Hemmung der Begleitflora untersucht, um Unterschiede in der Selektivität der beiden Medien feststellen zu können (Tabelle 2). Die Ergebnisse zeigen, dass der Palcam-Agar deutlich selektiver ist: während beim Oxford-Agar 69,4% aller Platten Wachstum an-

Tabelle 2. Wachstum von Listerien und anderen Keimen auf Oxford- und Palcam-Agar

	Oxford	Palcam
Wachstum Listerien	134	140
Wachstum andere Keime	668	150
kein Wachstum	161	673
TOTAL	963	963

derer Keime zeigten, waren es mit Palcam nur 15,6%. Dieser Unterschied ist statistisch hochsignifikant. Für die routinemässige Isolierung von Listerien aus kontaminierten Materialien ist dies insofern bedeutsam, weil mit Palcam, im Vergleich zu Oxford, weniger störende Begleitflora in die Auswertung miteinbezogen werden muss. Die Erkennbarkeit der listerienverdächtigen Kolonien wird demnach durch die Verwendung des Palcam-Agars vor allem für ungeübte Personen erheblich erleichtert. Dieser Nachteil des Oxford-Agars wird aber, je mehr man damit arbeitet, nicht mehr so ins Gewicht fallen.

Auf Oxford setzt sich die Begleitflora meistens aus Enterokokken, vereinzelt Staphylokokken und selten Hefen zusammen, während auf Palcam praktisch nur Enterokokken festzustellen sind.

Beide Medien haben den Vorteil, dass die Henry-Beleuchtung (14, 23) im Gegensatz zu mMB und AC wegfällt und die Diagnostik somit bedeutend erleichtert wird. Sie können für die Untersuchung von *L. monocytogenes* aus Fleischerzeugnissen und anderen kontaminierten Materialien empfohlen werden. Der Palcam-Agar hat den Vorteil der höheren Selektivität. Es sind aber die folgenden Punkte zu beachten:

- In verschiedenen Laboratorien (Bundesamt für Veterinärwesen, Bundesamt für Gesundheitswesen, Forschungsanstalt für Milchwirtschaft) wurden sowohl beim kommerziell erhältlichen als auch beim selbsthergestellten Palcam-Agar mehrmals pH-Werte zwischen 6,2 und 6,5 festgestellt (*Baumgartner* und *Kaufmann*, pers. Mitteilungen). Agarplatten mit solchen pH-Werten weisen eine manifest schlechtere Selektivität auf, wodurch die Erkennbarkeit der listerienverdächtigen Kolonien sinkt. Der pH-Wert des Palcam-Agars muss daher auf $7,2 \pm 0,1$ eingestellt werden (18).
- Der Palcam-Agar muss mikroaerophil bebrütet werden, bei aerober Bebrütung wachsen vermehrt andere Keime.
- Im Unterschied zum Oxford-Agar muss der Palcam-Agar 72 Stunden bebrütet werden, wenn Anaerobentöpfe mit mikroaerophiler Atmosphäre verwendet werden. Nach 48 Stunden ist oft nur wenig Wachstum festzustellen, was auch anderweitig beobachtet wurde (*Baumgartner*, pers. Mitteilung). Wird aber ein Anaerobenbrutschrank mit mikroaerophilem Gasgemisch verwendet, kann auch beim Palcam-Agar die Bebrütungszeit auf 48 Stunden reduziert werden. Der Grund dafür ist, dass beim Anaerobenschrank die gewünschten Bedin-

gungen sofort herrschen, wohingegen bei den Anaerobentöpfen mit einer Verzögerung von mehreren Stunden zu rechnen ist.

Bei Beachtung der obigen Punkte können beide Medien für den Nachweis von *L. monocytogenes* aus kontaminierten Materialien bestens empfohlen werden.

Zusammenfassung

1 814 Proben (Fleisch- und Fischerzeugnisse, Proben aus Umgebungsuntersuchungen aus Schlachthöfen) wurden auf das Vorkommen von *L. monocytogenes* untersucht, wovon sich 92 (5%) als positiv erwiesen. Die beiden selektiven Agarmedien Oxford und Palcam, die wir für die Untersuchungen verwendeten, wurden dabei verglichen. Es wurden annähernd gleiche Isolationsraten festgestellt. In der Selektivität unterschieden sich die Medien jedoch deutlich, indem auf dem Palcam-Agar die Begleitflora bedeutend stärker unterdrückt wurde.

Beide Medien können für den Nachweis von *L. monocytogenes* aus kontaminierten Materialien empfohlen werden.

Résumé

1 814 échantillons (produits de viande et de poissons, échantillons de l'environnement de chaînes d'abattage) ont été examinés quant à la présence de *L. monocytogenes*; 92 (5%) se sont révélés positifs. Les deux géloses Oxford et Palcam utilisées pour nos analyses ont été comparées. On a constaté des fréquences d'isolation à peu près semblables pour les deux géloses. En ce qui concerne la sélectivité, les géloses se distinguent toutefois nettement l'une de l'autre en ce sens que la flore d'accompagnement est notablement mieux atténuée par Palcam-agar que par Oxford-agar.

Les deux géloses peuvent être recommandées pour la mise en évidence de *L. monocytogenes* dans du matériel contaminé.

Summary

1 814 samples (meat and fish products, samples from the environment in slaughterhouses) were analysed for the presence of *L. monocytogenes*; 92 (5%) turned out to be positive. We compared the selective agar media Oxford and Palcam, which were used in this study. As for the detection frequency, no differences were found. But as far as the selectivity is concerned, a clear distinction could be established, because the competitive flora on Palcam-agar was heavily more inhibited than on the Oxford medium.

Both media can be recommended for the isolation of *L. monocytogenes* from contaminated materials.

Literatur

1. Schleich, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S. and Broome, C. V.: Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *New Engl. J. Med.* **308**, 203–206 (1983).

2. Fleming, D. W., Cochi, S. L., Macdonald, K. L., Brondum, J., Hages, P. S., Plikaytis, B. D., Holmes, M. B., Audurier, A., Broome, C. V. and Reingold, A. L.: Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New Engl. J. Med.* **312**, 404–407 (1985).
3. James, S. M., Fannin, S. L., Agee, B. A., Hall, B., Parker, E., Vogt, J., Run, G., Williams, J. and Lieb, L.: Listeriosis outbreak associated with Mexicanstyle cheese. *California Morb. Mort. Weekly Rep.* **34**, 357–359 (1985).
4. Bille, J. et Glauser, M. P.: Listériose en Suisse. *Bull. Bundesamt für Gesundheitswesen* **3**, 28–29 (1988).
5. McBride, M. E. and Girard, K. F.: A selective method for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations. *J. Lab. Clin. Med.* **55**, 153–157 (1960).
6. Despierres, M.: Isolation of *Listeria monocytogenes* in a medium inhibitory to *Streptococcus faecalis*. *Ann. Inst. Pasteur* **121**, 493–501 (1971).
7. Ralovich, B., Forray, A., Mero, E., Malovics, H. and Szazados, J.: New selective medium for isolation of *Listeria monocytogenes*. *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A* **216**, 88–91 (1971).
8. Mavrothalassitis, P.: A method for the rapid isolation of *Listeria monocytogenes* from infected material. *J. Appl. Bacteriol.* **43**, 47–52 (1977).
9. Baird, R. M., Corry, J. E. L., Curtis, G. D. W., Mossel, D. A. A. and Skovgaard, N. P.: Pharmacopoeia of culture media for food microbiology – additional monographs; media for *Listeria spp.* *Int. J. Food Microbiol.* **9**, 89–127 (1989).
10. Loessner, M. J., Bell, R. H., Jay, J. M. and Shelef, L. A.: Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria spp.* *Appl. Environm. Microbiol.* **54**, 3003–3007 (1988).
11. Lovett, J.: Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes*. *Food Technol.* **42**, 172–175 (1988).
12. Truscott, R. B. and McNab, W. B.: Comparison of media and procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from ground beef. *J. Food Prot.* **51**, 626–628 (1988).
13. Buchanan, R. L., Stahl, H. G., Bencivengo, M. M. and Corral, F.: Comparison of lithium chloride-phenylethanol-moxolactam and modified Vogel Johnson agars for detection of *Listeria spp.* in retail-level meats, poultry and seafood. *Appl. Environm. Microbiol.* **55**, 599–603 (1989).
14. Schweizerisches Lebensmittelbuch, 2. Band, 5. Aufl., Kapitel 56, Abschnitt 7.25. Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1985/88.
15. Lovett, J., Francis, D. W. and Hunt, J. M.: *Listeria monocytogenes* in raw milk: Detection, incidence and pathogenicity. *J. Food Prot.* **50**, 188–192 (1987).
16. Bannermann, E. S. and Bille, J.: A new selective medium for isolating *Listeria spp.* from heavily contaminated material. *Appl. Microbiol.* **54**, 165–167 (1988).
17. Curtis, G. D. W., Mitchell, R. G., King, A. F. and Griffin, E. J.: A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Letters Appl. Microbiol.* **8**, 95–98 (1989).
18. van Netten, P., Perales, I., Curtis, G. D. W. and Mossel, D. A. A.: Liquid and solid selective differential media for the enumeration of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **8**, 299–316 (1989).
19. Jemmi, T.: Stand der Kenntnisse über Listerien bei Fleisch- und Fischprodukten. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **81**, 144–157 (1990).
20. Gobat, P.-F.: Présence de *Listeria monocytogenes* sur les carcasses animales; recherches épidémiologiques dans les abattoirs. *Diss. med. vet.*, Bern 1990.
21. Guyer, S.: *Listeria monocytogenes* in geräuchertem Lachs. Forschungsauftrag des Bundesamtes für Veterinärwesen 1989/90 (Publikation in Vorbereitung).

22. Schweizerisches Lebensmittelbuch, 2. Band, 5. Aufl., Kapitel 60, Abschnitt 3.4.2. Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1989.
23. Henry, B. S.: Dissociation in the genus *Brucella*. J. Inf. Dis. **52**, 374–402 (1953).

Dr. T. Jemmi
Dr. P.-F. Gobat
Dr. Susanne Guyer
Bundesamt für Veterinärwesen
Sektion Mikrobiologie
Schwarzenburgstrasse 161
CH-3097 Liebefeld-Bern

Programme de calcul pour l'évaluation de la fidélité par essais interlaboratoires

Computational Programme for the Determination of the Precision by Inter-
laboratory Tests

E. Martin et J. Vogel
Laboratoire cantonal de chimie, Genève

Principe

Un programme a été établi qui permet à partir des données fournies par un essai interlaboratoire de déterminer le niveau moyen, la répétabilité et la reproductibilité d'une méthode quantitative. Ce programme est applicable à un essai comportant des sous-niveaux. Il est basé sur les principes définis dans la norme internationale ISO 5725-1986 (1).

Appareillage

Calculatrice Hewlett-Packard 11-C ou 15-C (2)

Formules de calcul (1)

Pour faciliter la compréhension, la nomenclature ISO a été conservée.

$$S_1 = \sum \bar{y}_j$$

$$S_2 = \sum \bar{y}_j^2$$

$$S_3 = \sum d_j$$

$$S_4 = \sum d_j^2$$

$$S_r^2 = \frac{pS_4 - S_3^2}{2p(p-1)}$$

$$S_L^2 = \frac{pS_2 - S_1^2}{p(p-1)} - \frac{S_r^2}{2}$$

$$m = \frac{S_1}{p}$$

$$r = 2,83 \sqrt{S_r^2}$$

$$R = 2,83 \sqrt{(S_L^2 + S_r^2)}$$

Dans ces formules:

S_r^2 est la variance de la répétabilité

S_L^2 est la variance de la reproductibilité

m représente la valeur moyenne

r est la répétabilité

R est la reproductibilité

Si $S_L < 0$, il faut utiliser $S_L = 0$ dans l'expression de R .

Le programme proposé comporte un branchement, qui tient compte de cette condition. Il comporte 75 lignes. Il fait intervenir les adresses A et C. Les registres utilisés sont:

Calculatrice HP-11C

R_0 : nombre de laboratoires

R_1 : $\sum d_j$

R_2 : $\sum d_j^2$

R_3 : $\sum \bar{y}_j$

R_4 : $\sum \bar{y}_j^2$

R_5 : inutilisé

R_6 : ps_r

R_7 : S_r^2

Calculatrice HP-15C

R_0 : inutilisé

R_1 : inutilisé

R_2 : nombre de laboratoires

R_3 : $\sum d_j$

R_4 : $\sum d_j^2$

R_5 : $\sum \bar{y}_j$

R_6 : $\sum \bar{y}_j^2$

R_7 : inutilisé

R_8 : inutilisé

R_8 : ps_r

R_9 : inutilisé

R_9 : S_r^2

Programme

Passer en mode programme (séquence [g] [P/R]) et introduire le programme suivant:

Appuyer sur:	Affichage:	Appuyer sur:	Affichage:
[f] [LBL] [A]	001-42, 21, 11	[RCL] [5]	034- 45, 5
[\sum_+]	002- 49	[g] [x^2]	035- 43, 11
[R/S]	003- 31	[CHS]	036- 16
[f] [LBL] [C]	004-42, 21, 13	[RCL] [8]	037- 45, 8
[RCL] [5]	005- 45, 5	[+]	038- 40
[RCL] [2]	006- 45, 2	[STO] [.] [4]	039- 44 .4
[\div]	007- 10	[RCL] [2]	040- 45, 2
[R/S]	008- 31	[1]	041- 1
[RCL] [3]	009- 45, 3	[-]	042- 30
[g] [x^2]	010- 43, 11	[RCL] [2]	043- 45, 2
[STO] [.] [0]	011- 44 .0	[x]	044- 20
[RCL] [2]	012- 45, 2	[1/x]	045- 15
[RCL] [4]	013- 45, 4	[RCL] [.] [4]	046- 45 .4
[x]	014- 20	[x]	047- 20
[RCL] [.] [0]	015- 45 .0	[STO] [.] [5]	048- 44 .5
[-]	016- 30	[RCL] [9]	049- 45, 9
[STO] [.] [1]	017- 44 .1	[2]	050- 2
[RCL] [2]	018- 45, 2	[\div]	051- 10
[1]	019- 1	[CHS]	052- 16
[-]	020- 30	[RCL] [.] [5]	053- 45 .5
[RCL] [2]	021- 45, 2	[+]	054- 40
[x]	022- 20	[g] [TEST] [2]	055-43, 30, 2
[2]	023- 2	[0]	056- 0
[x]	024- 20	[STO] [.] [6]	057- 44 .6
[STO] [.] [3]	025- 44 .3	[RCL] [9]	058- 45, 9
[RCL] [.] [1]	026- 45 .1	[$\sqrt{-}$]	059- 11
[RCL] [.] [3]	027- 45 .3	[2]	060- 2
[\div]	028- 10	[.]	061- 48
[STO] [9]	029- 44, 9	[8]	062- 8
[RCL] [2]	030- 45, 2	[3]	063- 3
[RCL] [6]	031- 45, 6	[x]	064- 20
[x]	032- 20	[R/S]	065- 31
[STO] [8]	033- 44, 8	[RCL] [.] [6]	066- 45 .6

Appuyer sur:	Affichage:	Appuyer sur:	Affichage:
[RCL] [9]	067— 45, 9	[8]	072— 8
[+]	068— 40	[3]	073— 3
[√-]	069— 11	[x]	074— 20
[2]	070— 2	[R/S]	075— 31
[.]	071— 48		

Une fois le programme introduit dans la calculatrice, il est nécessaire de passer en mode utilisateur pour entrer les données numériques et procéder aux calculs. Pour cela il faut effectuer les opérations suivantes:

Appuyez sur:

[f] [CLEAR] [REG]

Introduire les valeurs numériques de y_j et de d_j :

\bar{y}_1 [ENTER] d_1 [A]

\bar{y}_2 [ENTER] d_2 [A]

\bar{y}_p [ENTER] d_p [A]

Appuyer sur [C] et la valeur de m est affichée

Appuyer sur [R/S] et la valeur de r est affichée

Appuyer sur [R/S] et la valeur de R est affichée

Le programme a été appliqué aux données de base originales, sans codage, citées au § 14.11 de la norme ISO 5725-1981 et a fourni des résultats identiques à ceux publiés dans cette norme. Il a également été appliqué aux résultats de l'essai interlaboratoire sur le dosage des nitrates dans l'eau de boisson, qui sont publiés à titre d'exemple au chapitre «Ringversuche» du Manuel suisse des denrées alimentaires (3). Les résultats fournis par le programme de calcul concordent avec ceux du Manuel.

Résumé

Un programme pour la détermination de la fidélité d'une méthode d'analyse quantitative par essais interlaboratoires comportant des sous-niveaux est proposé. Il a été appliqué à des données de la norme ISO 5725-1986.

Zusammenfassung

Es wird ein Programm für die Bestimmung der Präzision einer quantitativen Analyse-methode durch Ringversuche mit «Split-level» vorgeschlagen. Es wurden Werte der Norm ISO 5725-1986 angewendet.

Summary

A computational programme is proposed which enables the determination of the precision of a quantitative analytical method by inter-laboratory tests with split-levels. It has been applied to data given in the ISO Standard 5725-1986.

Bibliographie

1. ISO 5725 Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a Standard test method by inter-laboratory tests, 2nd edition, 1986.
2. Manuels d'utilisation des calculateurs HP-11C et HP-15C. Hewlett-Packard France, 1982.
3. Schweiz. Lebensmittelbuch, Kapitel 60, Statistik und Ringversuche. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1989.

Dr E. Martin
Dr J. Vogel
Laboratoire cantonal de chimie
Case postale 166
CH-1211 Genève 4