

Vergleich kommerzieller und frischgepresster Zitrussäfte mittels SPME-GC-MS und chemometrischer Methoden

Autor(en): **Reinhard, Hans / Sager, Fritz / Zoller, Otmar**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **95 (2004)**

Heft 6

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-981846>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Vergleich kommerzieller und frisch- gepresster Zitrussäfte mittels SPME-GC-MS und chemometrischer Methoden*

Hans Reinhard, Fritz Sager und Otmar Zoller, Bundesamt für Gesundheit, Sektion Lebensmittelchemie, 3003 Bern

Einleitung

Aus wirtschaftlichen Interessen muss damit gerechnet werden, dass Zitrussäfte nicht artenrein in den Verkauf gelangen. Beimischung von Grapefruit zu Orangensaft ist nur eines der Beispiele, Zugabe artfremder Aromen ein anderes (1).

Die Solid-phase microextraction-(SPME)-Technik hat sich als rasche, kostengünstige, lösungsmittelfreie, ohne Aufkonzentration auskommende Extraktionsmethode etabliert, bei der Analyten aus flüssigen oder gasförmigen Matrices aufgrund ihres Verteilungskoeffizienten an ein stationäres Phasenmaterial gebunden und anschliessend unter definierten Bedingungen desorbiert werden (2). In Kombination mit GC-MS können die erhaltenen Chromatogramm-Fingerprints mit multivariater Statistik ausgewertet werden. Diskriminierende Stoffe können ermittelt und identifiziert werden.

Im Sinne des Täuschungsschutzes sollte die Tauglichkeit der hier vorgestellten Methode bezüglich möglicher Zitrusaft-Verfälschungen geprüft werden. Im Speziellen wurde nach arttypischen Substanzen gesucht, sowie untersucht, ob die Kriterien frischer vs. kommerzieller, gelagert vs. frischer Saft unterschieden werden können und ob sich aufgrund des Erntezeitpunkts und der Herkunft Unterschiede aufzeigen.

Material und Methode

255 Saftproben und Getränke, davon 147 selbst gepresste, wurden untersucht. Es handelte sich dabei um 25 Zitronen-, 49 Grapefruit-, 2 Limetten-, 28 Mandarinen-, 125 Orangensäfte, sowie um 16 Getränke auf Mineralwasserbasis und 10 Stein- und Kernobstnektare. Die Proben wurden bei diversen Anbietern im

*Vortrag gehalten an der Jahresversammlung der SGLUC vom 9./10. September 2004

Zeitraum Frühling 2001 bis Frühling 2002 erhoben, um auch ein Abbild eventueller saisonaler Schwankungen zu erhalten.

Zur Saftherstellung wurden je nach Grösse 5 bis 40 reife Früchte (ca. 3 kg) geschält und durch Zentrifugation (Zentrifuge der Firma ROTOR, Typ Vitamat RVT) zu 1 bis 2 Liter Frischsaft verarbeitet. Aliquote wurden bei -20°C eingefroren. Die Proben, 1,5 ml je, wurden mit 0,5 ml gesättigter Kochsalzlösung und Standards zur Retentionszeitkorrektur (je 5 ppm Decanol-d21 und Dodecanol-d25) versehen und bei 80°C 30 Minuten konditioniert, anschliessend der Gasraum über der Flüssigkeit 10 Minuten einer DVB/CAR/PDMS-Mischfaser (Supelco Nr. 57328-U) ausgesetzt (Headspace-Methode). Nach manueller Injektion wurden die gebundenen Analyten bei 250°C während 5 Minuten desorbiert und auf einer HP5MS-Säule (30 m, 0,25 mm i.d., 0,25 μm Phasendicke) temperaturprogrammiert chromatografiert (Agilent GC 5890, Programmstart bei 50°C , nach 0,3 Minuten mit $12^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ bis 300°C , konstant gehalten für 2 Minuten. Der Helium-Trägergasstrom wurde zu konstantem Fluss 0,8 ml gewählt.). Als massenspezifischer Detektor diente ein MSD 5972 von Agilent, der im Massenbereich 50–300 amu betrieben wurde. Die resultierenden Chromatogramme wiesen zwischen 25 und 98 Verbindungen auf. Die in den 255 Proben gefundenen 336 Verbindungen wurden in einer Datenbank erfasst und die Chromatogrammfingerprints einer Diskriminanzanalyse unterzogen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Systat V9 (SPSS Inc. 1998), während die Identifikation der Verbindungen mit MassLib V8.7 (Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mühlheim 2004) erfolgte.

Resultate und Diskussion

Tabelle 1 fasst die chromatografische Information der gemessenen Proben zusammen. Es fällt auf, dass die kommerziellen Säfte tendenziell mehr chromatografische Peaks als die Frischsäfte aufweisen. Ausserdem weisen die Mandarinen-säfte, sowie die Getränke und Nektare tendenziell wenig Peaks auf. Im Verlauf einer ersten Datenübersicht zeigte sich, dass es im beobachteten Analysefenster zwar art-spezifische Verbindungen gibt, diese jedoch nicht bei allen Vertretern der betreffenden Zitrusart nachweisbar waren (Tabelle 2). Artspezifische Substanzen eignen sich daher nur bedingt, um artfremde Beimischungen nachzuweisen und die Verwendung chemometrischer Methoden ist daher nötig.

Da befürchtet wurde, dass durch eine Hauptkomponentenanalyse der direkte Zusammenhang zwischen Variablen (entspricht einer definierten chemischen Substanz) und betreffendem diskriminierendem Einfluss verloren ginge, wurden die Daten direkt ohne Variablenreduktion mit linearer Diskriminanzanalyse (LDA) und Identifikationsanalyse ausgewertet. Generell ist dabei festzustellen, dass bedingt durch die hohe Anzahl potentiell diskriminierender Variablen ($n=336$) immer eine statistische Trennung in Gruppen erreicht wird, allerdings mit schwankender Präzision. Darüber hinaus sollte die Anzahl Variablen nicht mehr als ein Drittel der Anzahl gemessener Proben betragen (3).

Tabelle 1

Übersicht der untersuchten Proben und deren chromatografischer Information

	Anz. Messungen	Anzahl Peaks		
		min	max	median
Zitronensaft frisch	14	35	80	56
Zitronensaft kommerziell	11	55	92	80
Limettensaft frisch	2	89	89	
Grapefruitsaft frisch	27	37	91	70
Grapefruitsaft kommerziell	22	35	98	75
Mandarinensaft frisch	22	29	56	44
Mandarinensaft kommerziell	4	51	64	58
Orangensaft frisch	77	30	95	63
Orangensaft kommerziell	50	32	92	67
Getränke	16	30	68	48
Stein- und Kernobstnektar	10	25	48	38

Tabelle 2

Auftreten artspezifischer Peaks in den untersuchten Proben

	Artspez. Peaks	Prozentuales Auftreten (%)
Zitronensaft frisch	0	
Zitronensaft kommerziell	6	9–54
Limettensaft frisch	0	
Grapefruitsaft frisch	2	4
Grapefruitsaft kommerziell	3	18–59
Mandarinensaft frisch	0	
Mandarinensaft kommerziell	0	
Orangensaft frisch	4	1–9
Orangensaft kommerziell	4	2–6
Getränke	1	38
Stein- und Kernobstnektar	24	10–60

Grapefruit in Orangensaft

In einem ersten Schritt wurden die Daten für die vier Gruppen frische und kommerzielle Grapefruit- und Orangensäfte (n=164) in zwei gleich grosse, zufällig zugeordnete Datensets unterteilt. Ein Set diente der Modellentwicklung, das andere der Modellvalidierung (50/50-Modell) der linearen Diskriminanzanalyse.

Die Gruppen Orangen und Grapefruit erscheinen im Modell statistisch getrennt. Während sich die frischen von den kommerziellen Grapefruitsäften trennen lassen, liegen die Gruppen der frischen und kommerziellen Orangensäfte übereinander. Dabei ist die Reklassifizierung nach Jackknife für die im Modell verwendeten Daten gut, hingegen für die Modellierten speziell für kommerziellen Grapefruitsaft (in 82% der Fälle als frischer Grapefruitsaft erkannt) schlecht (Tabelle 3). Dieses Modell scheint uns insofern nicht vertrauenswürdig, als der Probenumfang für die Modellentwicklung, ideal wären 30–50 Messungen je Gruppe, zu gering ist.

Tabelle 3

Vergleich der linearen Diskriminanzmodelle «50/50» vs. Identifikationsanalyse bezüglich der entsprechenden (Jackknife-)Reklassifizierung

	Anz. Messungen	Anz. Variablen	Grapefruit frisch	Jackknife		
				Orangen frisch	Grapefruit kommerz.	Orangen kommerz.
50/50-Modell Modelldaten	84	23	100%	97%, (1 Orang. kommerz.)	100%	100%
50/50-Modell Testdaten	80	23	100%	94%, (2 Grapefr. frisch)	18%, (9 Grapefr. frisch)	100%
Identifikations- analyse	111	13	96%, (1 Orang. frisch)	100%	100%	

Bei der Identifikationsanalyse hingegen wird ein Modell mit vorgegebenen, als bekannt angenommenen Gruppen modelliert und anschliessend die zu klassifizierenden Daten über das Modell gelegt, was für unsere Grapefruit-/Orangendaten in Abbildung 1 veranschaulicht wird. Als bekannt wurden die Gruppen Orangensaft frisch und kommerziell, sowie Grapefruitsäfte kommerziell angenommen und daraus ein entsprechendes Modell entwickelt, welches brauchbare Reklassifizierung zeigt (Tab. 3). Unter Verwendung der in Abbildung 1 dargestellten 95 %-Vertrauensellipsen lassen sich 5 der kommerziellen Orangensäfte (n=50) der Gruppe frische

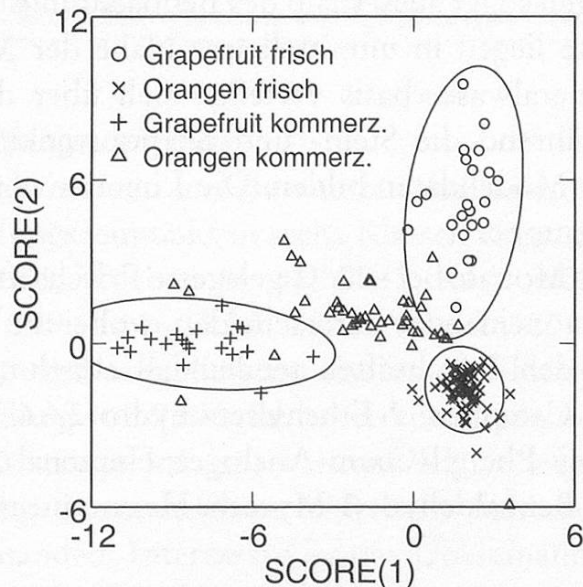


Abbildung 1 Identifikationsanalysemodell Grapefruit in Orangensaft. Modellentwicklung erfolgte mit den Gruppen Grapefruit- und Orangenfrischsaft, sowie Grapefruit kommerziell. Dargestellt sind die 95 %-Vertrauensellipsen der jeweiligen Gruppen

Grapefruitsäfte und 1 kommerzieller Orangensaft der Gruppe kommerzielle Grapefruitsäfte zuordnen. Ob diese Zuordnungen jedoch relevant sind, müsste durch weitere, speziell authentische Proben definierter Grapefruit-/Orangengemische verifiziert werden. Das Identifikationsmodell erscheint aber gegenüber dem 50/50-Modell vertrauenswürdiger, stehen für die Modellentwicklung mehr Daten zur Verfügung und eine statistische Trennung der Gruppen ist mit nur ca. der halben Anzahl Variablen erreichbar (Tab. 3).

Die 13 relevanten Variablen im Identifikationsmodell konnten folgendermassen charakterisiert werden: Mit den Datenbanken übereinstimmende Verbindungen: Styrol; 5-Isoprenyl-2-Methyl-2-Vinyltetrahydrofuran; α -Phellandren; Carvyl-Acetat; 1-Methyl-2-(2-Propenyl)-Benzol; 3,5,5-Trimethyl-2-Cylohexen-1-on; 1,2,3,5-Tetramethyl-Benzol; 10,10-Dimethyl-2,6-bis(Methylen)-Bicyclo[7.2.0]Undecan. Mit den Datenbanken ähnliche Verbindungen: Citral; α -Terpinolen. Vorläufig nicht identifiziert: 3 Verbindungen.

Vergleich der Frischsäfte gegen alle anderen

Eine statistische Trennung der Gruppen frische Zitronen-/Mandarinen-/Orangen-/Grapefruitsäfte war nur durch ein LDA-Modell mit 54 Variablen (Anzahl Messungen=124) und hoher Toleranz (0,1) zu erreichen. Das Modell erscheint zwar anschaulich, Identifikationszuordnungen wären jedoch im gegebenen Fall mit Vorsicht zu geniessen und müssten mit authentischen Mustern überprüft werden. Tendenziell erscheinen jedoch die bei -20°C gelagerten Frischsäfte in der Nähe, für Orangensaft sogar deckungsgleich mit der Gruppe der Frischsäfte, hingegen streuen die Lagewerte für die kommerziellen Grapefruitsäfte breit, diejenigen für kommerzielle Zitronensäfte liegen sogar ausserhalb des Beobachtungsfensters. Die kommerziellen Mandarinsäfte liegen in unmittelbarer Nähe der Mandarinenfrischsäfte. Die Getränke auf Mineralwasserbasis verteilen sich über die Gruppen Orange/Grapefruit/Zitrone, während die Stein- und Kernobstnektare wie erwartet eine Gruppe ausserhalb der Modelldaten bilden. Die Limettenwerte liegen in der Nähe der Zitronenfrischsaftgruppe.

Frischsäfte und vier Monate bei -20°C gelagerte Frischsäfte lassen sich über drei bis vier Verbindungen voneinander unterscheiden, wobei die unten genannten Verbindungen gegenüber den Frischsäften tendenziell abnehmen oder ganz fehlen: Zitronensaft (α -Pinen; Camphen; 2-Ethenyltetrahydro-2,6,6-Trimethyl-2H-Pyran), Grapefruitsaft (Methoxy-Phenyl-Oxim-Analogen; Heptenal-Analogen; β -Myrcen), Orangensaft (α -Pinen; Benzaldehyd; β -Myrcen; Hexansäure-Ethylester).

Herkunft

Ein LDA-Modell konnte lediglich für Orangenfrischsäfte entwickelt werden, weil nur hier genug Daten und Herkunftsangaben zur Verfügung standen. Für die Gruppen Italien (IT, n=34), Spanien (ES, n=17), Griechenland (GR, n=6) und Südafrika (ZA, n=4) wurde mit 26 Variablen die in Abbildung 2 gezeigte Gruppentren-

nung erreicht. Die Jackknife-Reklassifizierung lag für ES bei 88 % (1 GR, 1 IT), GR 83 % (1 IT), IT 91 % (2 GR, 1 ZA) und ZA 100%. Während die Gruppen Italien, Spanien und Griechenland relativ nahe beieinander liegen, ist die Gruppe Südafrika weit abgeschlagen. Die nicht modellierten Gruppen Marokko (MA, n=3), Israel (IL, n=2), Türkei (TR, n=1) und Uruguay (UY, n=1) sind in Abbildung 2 über die Modelldaten gelegt und erscheinen, ausser den breit streuenden Werten für Marokko, getrennt von den für das Modell verwendeten Gruppen.

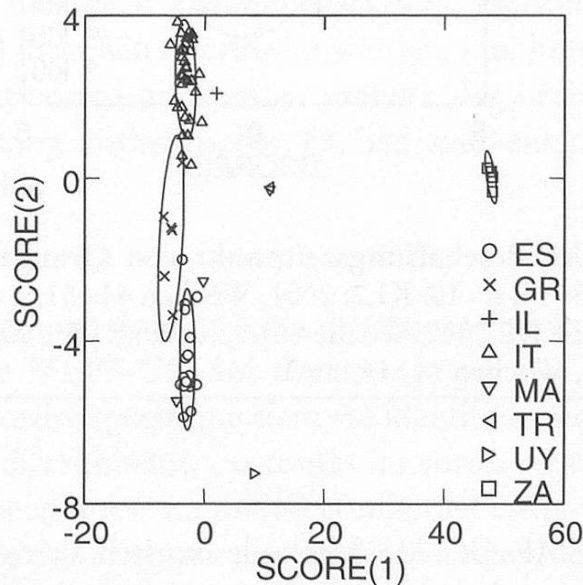


Abbildung 2 LDA-Modell Herkunft von Orangenfrischsaft. Länderbezeichnung nach ISO 3166. Modellentwicklung erfolgte mit den Gruppen ES, GR, IT und ZA

Ernte- bzw. Beschaffungszeitpunkt

Vorgängig zur Diskriminanzanalyse wurden die Daten für Orangenfrischsäfte gemäss ihrem Beschaffungszeitpunkt in sechs Klassen eingeteilt (KL1: 2001, Wochen 15–16, n=10; KL2: 2001, Wochen 44–51, n=15; KL3: 2002, Wochen 2–4, n=14; KL4: 2002, Wochen 6–9, n=16; KL5: 2002, Wochen 10–11, n=10; KL6: 2002, Wochen 14–16, n=3), und anschliessend das in Abbildung 3 dargestellte LDA-Modell unter Verwendung von 23 Variablen errechnet. Statistisch gesehen könnten die Klassen 3, 4 und 5 vereint werden, während Klasse 1 einen Übergang zur von den obigen Klassen abgetrennten Klasse 2 darstellt. Saisonale Schwankungen sind somit tendenziell vorhanden. Interessant ist das Übereinanderliegen der Klassen 1 und 6, was gegen Jahr-zu-Jahr-Unterschiede der Jahrgänge 2001/2002 spricht. Allerdings ist auch hier die Anzahl Messungen, speziell der Klasse 6, höchst gering und die Dateninterpretation daher mit Vorsicht zu geniessen.

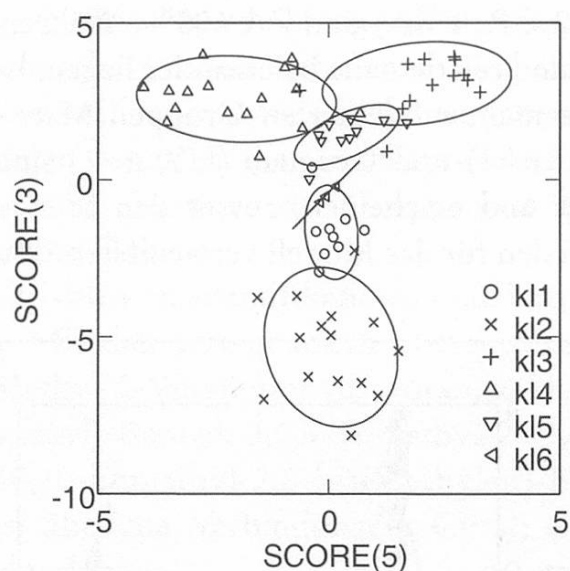


Abbildung 3 LDA-Modell Beschaffungszeitpunkt von Orangenfrischsaft. KL1: 2001, Wochen 15–16, n=10; KL2: 2001, Wochen 44–51, n=15; KL3: 2002, Wochen 2–4, n=14; KL4: 2002, Wochen 6–9, n=16; KL5: 2002, Wochen 10–11, n=10; KL6: 2002, Wochen 14–16, n=3

Schlussfolgerungen

Die angewandte SPME-GC-MS-Methode hat sich als robust erwiesen und die erhaltenen Ergebnisse erscheinen brauchbar, zur vertieften Dateninterpretation wären jedoch weiterreichende Anstrengungen angezeigt.

Beim Vergleich der frischen vs. kommerziellen Säfte darf nicht ausser Acht gelassen werden, dass die kommerzielle Saftherstellung, sowie Qualität und Reifegrad der Früchte nicht mit den von uns hergestellten Säften übereinstimmen müssen. Eine Vergleichbarkeit wäre also strikt genommen erst gegeben, wenn authentische Muster vor und nach der Saftherstellung gezogen werden könnten. Bereits der Gesetzgeber kann weitere analytische Herausforderungen bieten, in dem zum Beispiel wie in der Schweiz eine 10%ige Beimischung von Mandarinen- zu Orangen-saft (und umgekehrt) erlaubt ist (4).

Die Datenaufarbeitung hat sich als sehr aufwendig erwiesen, da diese nur bedingt automatisiert werden konnte. Die statistische Datenauswertung zeigte sich durch zu geringe Probenzahl anfällig und tendenziös. Das Verhältnis Datenbewirtschaftung zu Variablenrelevanz ist für die durchgeführten Messungen ungünstig, da viele redundante Variablen auftreten und somit die Eignung der Methode zur raschen Dateninterpretation in Frage gestellt ist.

Relevante Aussagen werden nur möglich, wenn kontinuierlich Daten über lange Zeiträume erhoben werden können, was entsprechende Datenbankpflege und die Verfügbarkeit authentischer Muster voraussetzt.

Zusammenfassung

255 Saftproben, davon 147 selbst hergestellte Zitrusäfte, wurden untersucht. Die von uns verwendete SPME-GC-MS-Methode hat sich dabei als robust erwiesen. Obwohl artspezifische Substanzen identifizierbar waren, konnte dieses Kriterium nicht angewendet werden, da diese Substanzen nicht bei allen Vertretern einer bestimmten Art auftraten. Im Spannungsfeld zwischen Anzahl Messungen, vorhandenen Variablen und verwendetem statistischen Modell ergaben sich diverse, sich nicht unbedingt deckende Ergebnisse, die nach weiteren validierenden Messungen verlangen, sollen verlässliche Aussagen abgeleitet werden können. Trotzdem konnten klare Tendenzen bezüglich Zusammensetzung, Herkunft und Erntezeitpunkt der Zitrusfrüchte und ihrer Äfte bestimmt werden. Um hingegen Fälschungsfragen klar und sicher beantworten zu können, müsste der betriebene Aufwand durch kontinuierliche Messung authentischer Proben und entsprechender Datenbankpflege gesteigert werden.

Résumé

255 échantillons de jus, dont 147 jus d'agrumes fraîchement préparés, ont été analysés. La méthode MEPS-CG-SM développée par nos soins est robuste. Bien que des substances d'ordre spécifique aient été identifiées, nous n'avons pas pu tenir compte de ce critère discriminant, car toutes les sortes représentées ne contenaient pas ces substances spécifiques. Le milieu conflictuel entre un nombre de mesures insuffisant, la présence de variables et les modèles statistiques utilisés, ne permet pas de recouvrir globalement les divers résultats obtenus. D'autres mesures de validation sont requises pour confirmer les valeurs obtenues. Cependant, nous avons pu déterminer des tendances claires relatives à la composition, la provenance et le moment de la récolte des agrumes et de leur jus. Pour pouvoir répondre sans ambiguïté de manière claire et sûre aux questions d'authenticité, il est primordial de fournir des efforts supplémentaires au travers de la continuité d'analyses d'échantillons authentiques ainsi que la mise à jour de la banque de données correspondante.

Summary "Comparison of Commercially Available and Freshly Prepared Citrus Juices by SPME-GC-MS and Chemometrics"

255 juice samples, from which 147 were self prepared citrus juices, have been investigated. The developed SPME-GC-MS method proved to be robust. Although species-specific substances were identified, this discriminating criterion could not be exploited since not all representatives of one species contained these substances. In the conflict of lacking of a representative number of measurements, given number of variables and statistical model used, diverse and not necessarily corresponding results evolved. Here, further validating measurements are demanded, if reliable statements are required. Still, apparent tendencies in what concerns composition, origin and harvest of the citrus fruits and their juices could be determined. However, to be able to identify unambiguously tasks in authenticity, additional effort

ought to be made to continuous measurements of authentic samples and updating of the corresponding data bases.

Key words

Citrus juices, SPME-GC-MS, Authenticity, Discriminant Analysis

Literatur

- 1 *Scotter C.N.G, Lees M., Martin G.G., Holland J. and Branch S.*: Fruit-based products. In: *Lees M.* (Hsg.), *Food authenticity – issues and methodologies*. Eurofins Scientific; Nantes 1998
- 2 *Penton Z.*: Method development with solid phase microextraction. In: *Scheppers Wercinski, S.A.* (Hsg.), *Solid phase microextraction – a practical guide*. Dekker; Basel 1999
- 3 *Goodner K. and Rouseff R.L.*: Using an ion-trap ms sensor to differentiate and identify individual components in grapefruit juice headspace volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 250–253 (2001)
- 4 *Systematische Sammlung des Schweizer Bundesrechts: Lebensmittelverordnung (LMV) SR 817.02 vom 1. März 1995, Stand am 29. Juni 2004. Art. 232, Abs. 1, Bst. c.*
http://www.bk.admin.ch/ch/d/sr/817_02/index.html

Korrespondenzadresse: Hans Reinhard, Bundesamt für Gesundheit, Sektion Lebensmittelchemie, 3003 Bern, E-Mail: hans.reinhard@bag.admin.ch