

Stabilisotopenmuster – ein Verfahren zur Erkennung der geografischen Herkunft?

Stable isotope signatures – a method for the determination of the geographic origin?

H. WAGNER

Zusammenfassung

Futter und Trinkwasser weisen in Abhängigkeit von Zusammensetzung und geografischem Ursprung eine spezifische Isotopensignatur einiger Elemente auf. Diese Muster lassen sich unter Berücksichtigung stoffwechselbedingter Veränderungen in den Tieren wieder finden. Mögliche räumliche Veränderungen der Tierstandorte und variable Futterherkunft machen jedoch die Etablierung der Stabilisotopenanalytik als universell anwendbare Routinemethode zur Identifizierung der geografischen Herkunft auf dem Sektor der tierischen Produkte unwahrscheinlich. Fallbezogen angewendet ist jedoch die Bestätigung oder der Ausschluss einer geografischen Herkunft möglich, darüber hinaus können eventuell auch Informationen über Fütterung oder Bewirtschaftungsform geliefert werden.

Abstract

Dependent on composition and geographic origin, feed and drinking water show a specific stable isotope signature of some elements. Allowing for additional changes by metabolic processes, it is possible to find this pattern again in the animals. Due to the possible transport of the animals to other farms and the variable origin of the feed it is unlikely that stable isotope analysis will be established in the sector of animal products as a routine application for the identification of geographic origins. Case related, however, the confirmation or exclusion of the geographic origin may be possible, in addition informations regarding feeding or agricultural systems may be deductible.

Schüsselwörter stabile Isotope – geografische Herkunft – tierische Produkte

Key Words stable isotopes – geographic origin – animal products

Einleitung

Die meisten chemischen Elemente existieren als zwei oder mehrere stabile, d.h. nicht radioaktive Isotope mit gleichen chemischen Eigenschaften, aber unterschiedlichen Atomgewichten. Sie unterscheiden sich bei gleicher Anzahl von Protonen in der Anzahl von Neutronen im Atomkern. Die daraus aufgebauten Moleküle weisen geringfügige Unterschiede in ihren physikalischen Eigenschaften (z. B. Siedepunkt, Schmelzpunkt, Diffusions- bzw. Wanderungsgeschwindigkeiten) und Molekülstabilität auf (mit Einfluss auf Reaktionsgeschwindigkeiten und Gleichgewichtskonstanten chemischer Reaktio-

nen). Hieraus resultiert eine Diskriminierung „leichter“ und „schwerer“ Moleküle bei physikalischen und chemischen Prozessen.

Die Isotopenverhältnisse werden in der sog. δ -Notation, bezogen auf einen international einheitlichen elementspezifischen Standard in der Einheit ‰ angegeben (Tab. 1). Dadurch werden übersichtlichere Zahlenwerte erreicht, da die absoluten Isotopenverhältnisse sehr klein sind und erst in der dritten oder vierten Nachkommastelle Variationen aufweisen. Anreicherungen des schwereren Isotops führen zu größeren δ -Werten.

Tab. 1: Herleitung von δ ; Bezugsstandards für die verschiedenen Elemente
$$\delta = \left(\frac{R_{\text{Probe}}}{R_{\text{Standard}}} - 1 \right) \times 1000$$

δ : relatives Isotopenverhältnis in der Probe
 R_{Probe} , R_{Standard} : Absolutes Isotopenverhältnis in Probe und Standard

Standard	Element
Standard Mean Ocean Water (SMOW)	$^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$
Pee Dee Belemnite (PDB), Carbonat	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$
Luftstickstoff	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$
Canon Diabolo Troilite (Meteorit)	$^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$

Bedeutung einzelner Elemente hinsichtlich der Ermittlung der geografischen Herkunft

Das Element Kohlenstoff mit den stabilen Isotopen ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) wird über die Photosynthese in die Biosphäre eingeschleust (Assimilation). Pflanzen synthetisieren aus dem atmosphärischen Kohlendioxid ($\delta = -8\text{‰}$, wie auch im folgenden ein Mittelwert, falls nicht anders angegeben) Kohlenhydrate. Hierbei weisen Pflanzen der gemäßigten Klimazonen, z.B. Getreide, Raps, Kartoffeln, heimische Gräser, die den Calvin-Zyklus (C3) nutzen, ein δ von -27‰ (Bereich -31 bis -24‰) auf, Pflanzen, die in tropischen Klimazonen heimisch sind, z.B. Mais, Hirse, Zuckerrohr, und nach dem Hatch-Slack-Zyklus (C4) entstehen, ein δ von -13‰ (Bereich -16 bis -10‰). Werden die Pflanzen an Tiere verfüttert, resultiert in deren Protein eine Verschiebung von δ um jeweils ca. $+1\text{‰}$, im Fett um ca. -1‰ . Das Kohlenstoffisotopenverhältnis im Fleisch hängt also primär von der Futterzusammensetzung der Tiere ab. Über regionale Fütterungsgewohnheiten ist jedoch auch ein Hinweis auf die geografische Herkunft möglich.

Bei den Isotopen des Stickstoffs ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) existiert im Gegensatz zum Kohlenstoff keine einheitliche Ausgangsbasis. Die Isotopenverhältnisse im Bewuchs (δ zwischen -8 und $+18\text{‰}$) hängen ab von Düngung (organisch, anorganisch), Wirtschaftsform, Klima, Niederschläge (saurer Regen) und vom Pflanzentyp (Wurzeltiefe, den Luftstickstoff fixierende

Pflanzen). Diesem geografischen Muster überlagert sich bei der Aufnahme in Tiere eine Verschiebung von etwa 3‰ , die auch für jede weitere Stufe innerhalb des Tiersektors der Nahrungskette hinzuzufügen ist, so dass bei Tieren, an die Milch oder verbotenerweise Tiermehl verfüttert wurde, eine Verschiebung von etwa 6‰ resultiert. Unter dem Vorbehalt dieser Variationsmöglichkeiten wird das Isotopenverhältnis des Stickstoffs in tierischen Eiweißstoffen im wesentlichen von den regionalen Gegebenheiten bestimmt. Diese Aufgliederung ist kleinräumig, d.h. die Situation kann sich abhängig von der Vorgeschichte des Bodens abrupt an Feld- oder Flurgrenzen ändern.

Das Isotopenverhältnis des Schwefels ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) im Boden hängt ab von der Geologie des Untergrunds, der Düngung und von Depositionen aus der Luft, wie sie durch Industrieabgase, vulkanische Gase oder salzhaltige Aerosole in der Nähe des Meeres zustande kommen. Die Verschiebungen zwischen den Gliedern der Nahrungskette sind gering, wenn schwefelhaltige Aminosäuren komplett übernommen und eingebaut werden, da der relative Massenunterschied der Moleküle klein ist. Damit wird δ -Schwefel im wesentlichen von den regionalen Gegebenheiten bestimmt.

Der Quotient $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ in Pflanzen und Tieren spiegelt das ortsspezifische Verhältnis, das wegen der unterschiedlichen Entstehungsgeschichte der beiden Isotope regional sehr variiert. ^{87}Sr ist das Zerfallsprodukt des radioaktiven ^{87}Rb . Letzteres

verhält sich chemisch völlig anders als Strontium. Strontium ist dem im wesentlichen in den Knochen zu findenden Element Calcium chemisch sehr ähnlich. Aufgrund der relativ zur Atommasse geringen Massendifferenz findet keine messbare Verschiebung des Isotopenverhältnisses zwischen dem Boden und den verschiedenen Gliedern der Nahrungskette statt. Dementsprechend gibt das in verschiedenen Skelettteilen gefundene Sr-Verhältnis das jeweils zur Zeit der Bildung dieser Komponenten aktuelle Verhältnis in den Pflanzen bzw. im Boden wieder.

Das Sauerstoffisotopenverhältnis ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) bei Pflanzen und Tieren unterliegt allein schon aufgrund multipler Zufuhrformen des Sauerstoffs mit unterschiedlichen Isotopenverhältnissen komplexen Verschiebungen. Die Zufuhr bei Pflanzen erfolgt in Form von Wasser, darin gelösten sauerstoffhaltigen Verbindungen und atmosphärischem Kohlendioxid, bei Tieren in Form von Wasser, atmosphärischem Sauerstoff und in den chemischen Verbindungen des Futters. Eine Vereinfachung hinsichtlich der Bestimmung der geografischen Herkunft ergibt sich aus der Tatsache, dass bei der Resorption von Wasser in Pflanzen- und Tiergeweben praktisch keine Isotopenverschiebung auftritt, so dass man näherungsweise davon ausgeht, dass $\delta^{18}\text{O}$ des relativ leicht als Messprobe gewinnbaren freien Gewebewassers gleich dem des resorbierten Wasser ist. Hierbei wird jedoch der Anteil des durch Metabolisierung des Futters gebildeten Wassers vernachlässigt und es ergibt sich eine Abweichung durch die verdunstungs- (Pflanze) bzw. transpirationsbedingte (Tier) Anreicherung des schwereren ^{18}O im Gewebewasser, die mit der Jahreszeit und der Haltungsform (Stall- oder Weidetier) variiert. Das geografische Muster wird durch das Niederschlagswasser vorgegeben, das die Basis für das Tieren zur Verfügung stehende Trinkwasser bzw. das Gewebewasser der Futterpflanzen darstellt. $\delta^{18}\text{O}$ des Niederschlagswassers wird auf dem Weg von den Ozeanen ins Landesinnere von Verdunstungs- und Kondensationsvorgängen bestimmt, es ist abhängig von geografischer Breite, Entfernung von den Küsten,

Meereshöhe, Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Das resultierende Muster ist jedoch relativ grob und eine räumliche Differenzierung maximal in der Größenordnung von 100 km möglich. Bezüglich einer geografischen Herkunftsbestimmung von Tieren über $\delta^{18}\text{O}$ existieren die folgenden Probleme (THIEM *et al.*, 2004; LÜPKE *et al.*, 2005):

- Wie oben bereits erwähnt, entstehen durch Verdunstung bei Pflanzen und Tieren jahreszeitlich variable Verschiebungen von $\delta^{18}\text{O}$ im Gewebewasser.
- Als Tränkwasser verwendetes Grundwasser weist bezüglich $\delta^{18}\text{O}$ Verschiebungen gegenüber dem Niederschlagswasser auf, die im günstigsten Fall nur in einer zeitlichen Verschiebung bestehen.
- Gewebewasser enthält auch durch Metabolisierung des Futters entstandene Anteile.
- Fehler können bei der Zerlegung und Lagerung der Tierkörper und Teilstücke entstehen, wenn an der Oberfläche Wasser verdunstet, an gekühlten Schlachtkörpern kondensiert oder zur Kühlung Wasser aufgesprüht wird.

Ein Teil der Probleme kann vermieden werden, wenn $\delta^{18}\text{O}$ an anderen Molekülen als Wasser bestimmt wird.

Das Isotopenverhältnis des im Wassermolekül gebundenen Wasserstoffs ($^2\text{H}/^1\text{H}$) ist wegen der für beide Elemente gemeinsam verlaufenden Prozesse über eine Näherungsformel, die „meteoric water line“ ($\delta^2\text{H} = 8 \times \delta^{18}\text{O} + 10$) an das Isotopenverhältnis des Sauerstoffs gekoppelt und kann z.B. hinsichtlich der Ermittlung der geografischen Herkunft über Gewebewasser keine zusätzliche Information liefern. $\delta^2\text{H}$ von organisch gebundenem nicht austauschbarem Wasserstoff wird jedoch z.B. für den Nachweis organischer Zusätze in Wein ausgewertet.

Generelles Fazit zu Isotopensignaturen

Die Auswertung der Isotopenverhältnisse mehrerer Elemente, eventuell ergänzt

durch Daten von Spurenelementen und/oder Kontaminanten führt zu charakteristischen Mustern oder Fingerprints, die im Fall der Stabilisotopen als Isotopensignaturen bezeichnet werden. Jede spezifische Elementsignatur wird durch unterschiedliche Prozesse innerhalb des jeweiligen Kreislaufes geprägt und beinhaltet somit eine eigenständige Information. Die Auswertung mehrerer Parameter erschwert Betrugsversuche durch gezielten Zusatz von Stabilisotopen. Mit zunehmender Anzahl eingesetzter Elemente sinkt indes die Übersichtlichkeit; multivariate statistische Verfahren können dann eingesetzt werden, um die aussagekräftigste Elementkombination zu finden und Daten unbekannter Herkunft mit Referenzdaten (eventuell aus einer Datenbank) zu vergleichen bzw. sie zuzuordnen.

Literatur zu Stabilisotopenanwendungen bei tierischen Produkten

HEGERDING *et al.* (2002) fanden heraus, dass unter Berücksichtigung des Verhältnisses allein der Sauerstoffisotope eine regionale Zuordnung von Rindfleischproben innerhalb Deutschlands nicht möglich ist, wohl aber eine Differenzierung zwischen Rindfleisch aus Argentinien und Deutschland. Das C- und S-Isotopenverhältnis in Leberproben wurde untersucht, um „iberische Schweine“ zu charakterisieren und zu identifizieren, die sich durch eine bestimmte Rassezugehörigkeit und Fütterung mit Eicheln auszeichnen (GONZALEZ-MARTIN *et al.*, 2001). Die Erkenntnisse aus den Untersuchungen von DELGADO und GARCIA (2001), die mittels des N-Isotopenverhältnisses den Versuch unternahmen, die Verfütterung von Tiermehl nachzuweisen, lassen sich auch zum Herkunftsnachweis einsetzen. Es ist jedoch anzunehmen, dass in Anbetracht der vielen weiteren Variationsursachen für $\delta^{15}\text{N}$ die Nachweisgrenze dieses patentierten Verfahrens relativ hoch ist. SCHWERTL *et al.* (2005) untersuchten die C- und N-Signatur in den Haaren von Weide- und Stallrindern aus 13 Bauernhöfen in Oberbayern. Der Querschnitt umfasste konventionelle und „Bio“-bewirtschaftung, Weide- und Stalltiere.

$\delta^{13}\text{C}$ erlaubte eine klare Zuordnung zu drei Gruppen unterschiedlicher Fütterung

- Heu, Gras
- Mais
- Getreide-, Leguminosenkonzentrate.

Bezüglich $\delta^{15}\text{N}$ konnten Korrelationen zur Belegungsdichte und zum Überschuss der Stickstoffzufuhr festgestellt werden: In vermehrt auf dem Boden ausgebrachten Exkrementen reichert sich ^{15}N beim Abgasen von Ammoniak und Auslaugen des Nitrats an. PIASENTIER *et al.* (2002) untersuchten die Eignung von $\delta^{15}\text{N}$ - und $\delta^{13}\text{C}$ -Daten für die Zuordnung von Lammfleisch zu sechs europäischen Ländern und drei Fütterungsgruppen, was in ersterem Fall in etwa 70 % und in letzterem Fall zu ca. 90 % gelang. GEBBING *et al.* (2004) untersuchten an Ochsen den Einfluss einer Fütterungsumstellung von Gras- auf Mais-silage auf $\delta^{13}\text{C}$ und konnten feststellen, dass auch 230 Tage nach dem Futterwechsel noch keine komplette Umstellung im Muskelprotein erfolgt war. RENOUE *et al.* (2004) untersuchten Fleisch von 36 Ochsen an drei verschiedenen Standorten in Frankreich mit zwei Fütterungsarten (Maissilage im Stall, Weidegras) anhand von $\delta^{18}\text{O}$ aus Gewebewasser und mittels NMR gewonnener Daten von $\delta^2\text{H}$ und Fettsäureanteilen (mehrfach ungesättigte, einfach ungesättigte und gesättigte Fettsäuren). Sie konnten nach einer Diskriminanzanalyse allen Tieren die Herkunft zuordnen und fast allen Tieren den Fütterungstyp. BONER und FÖRSTEL (2005) sind überzeugt, dass über die Signaturen der stabilen Isotope von C, O, H, N und S eine Rückverfolgung der geografischen Herkunft und der Erzeugungsbedingungen von Rindfleisch möglich ist, gehen allerdings offensichtlich davon aus, dass das Futter vor Ort erzeugt wird. Hinweise speziell auf die Anwendbarkeit der Untersuchung der H- und O-Isotope zur Bestimmung der regionalen Herkunft von Rindern lassen sich in einem Artikel von BONER und FÖRSTEL (2001) finden. Dieselben Autoren untersuchten die Verhältnisse der Sauerstoff- und Wasserstoffisotope von Fleisch aus Biobetrieben in Nord- und Süddeutschland sowie Fleisch aus Argen-

tinien und erstellten ein geografisches Muster der Isotopenverhältnisse von Stickstoff und Schwefel von Fleisch aus Biobetrieben im Raum der Kölner Bucht (FÖRSTEL und BONER, 2001).

Im gleichen Hause (Fa. AGROISOLAB) wurde ein Verfahren entwickelt, das über den Zusatz an schwerem Wasserstoff angereicherten Wassers zu Lebensmitteln und Rohstoffen (Futtermitteln) deren Rückverfolgbarkeit gewährleisten soll. Die Behandlung z. B. von Futtermitteln mit an schwerem Wasserstoff angereicherter Wasser führt zu einer nach Bestimmung von $\delta^2\text{H}$ und $\delta^{18}\text{O}$ feststellbaren Abweichung von der „meteoric water line“ (s.o.), die auch in den Folgeprodukten erkennbar ist.

Prinzipielle Probleme bei tierischen Lebensmitteln

Die Stabilisotopenanalytik wird schon seit geraumer Zeit bei Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs zur Bestimmung der (geografischen) Herkunft und der Authentizität (Verfälschung der Zusammensetzung) z. B. bei Wein, Spirituosen, Sekt, Fruchtsäften, Obst, Olivenöl, Honig und Aromastoffen angewendet. Anwendungen bei tierischen Produkten sind noch Gegenstand intensiver Forschung, anlässlich eines Subventionsbetrugs bei Butter konnte jedoch auch auf diesem Sektor bereits ein Erfolg in der Praxis erzielt werden. Dass noch keine routinemäßige Anwendung der Stabilisotopenanalytik auf diesem Sektor existiert, hat mehrere Gründe:

- Tierische Produkte stehen in der Nahrungskette auf einer höheren Stufe als pflanzliche, der Abstand zu den für eine geografische Lokalisierung ausschlaggebenden Bodendaten ist größer, damit gewinnen den Zusammenhang störende Einflüsse aus den Tieren selbst oder ihrem Umfeld an Bedeutung und der Bezug wird weniger signifikant.
- Im Gegensatz zu Pflanzen, die von der Aussaat bis zur Ernte an einem Standort wachsen, kommt bei Untersuchun-

gen an Tieren erschwerend hinzu, dass diese selbst mobil sind, bzw. über weite Entfernungen gehandelt werden können.

- Auch das Futter stammt nicht zwingend aus der unmittelbaren Umgebung der Tiere. Zukauf von Sojaschrot aus den USA, Heu oder Cobs von anderen landwirtschaftlichen Betrieben können die Isotopenverhältnisse in den tierischen Produkten ändern.

Es ist anzunehmen, dass sich die wechselnden Standorte der Tiere verfolgen lassen, wenn dies mit einer Veränderung des Futters/Wassers verbunden ist. Die Grundlage hierfür beruht darauf, dass sich die verschiedenen Gewebe, Organe, Knochen, Haare/Borsten darin unterscheiden, wie rasch sie ein neues Isotopengleichgewicht mit der veränderten Nahrung einstellen. Diese Komplexität wird jedoch sicher einer Etablierung der Stabilisotopenanalytik als Routinemethode auf diesem Sektor nicht förderlich sein.

Literatur

AGROISOLAB (2004): http://www.laves.niedersachsen.de/master/C5513135_N4270905_L20_D0_I826.html

BONER M., FÖRSTEL H. (2001): Möglichkeiten der Herkunftsbestimmung von Lebensmitteln mit Hilfe der Stabil-Isotopen-Methode am Beispiel von Rindfleisch. *Lebensmittelchemie* 55, 151.

BONER M., FÖRSTEL H. (2005): Rückverfolgung der Herkunft und Erzeugung von Rindfleisch – Variation der stabilen Isotope der „Bioelemente“ als natürliche Markierung. *Lebensmittelchemie* 59, 13.

DELGADO A., GARCIA N. (2001): $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ analysis to identify cattle fed on feed containing animal proteins: a safety/quality index in meat milk and cheese. 6th International Symposium on Food Authenticity and Safety November 28, 29 & 30 2001 Nantes France.

FÖRSTEL H., BONER M. (2001): Der Fingerabdruck der Natur gibt Auskunft. *Labfuture* 2002, 84-88.

GEBBING T., SCHELLBERG J., & KÜH-BAUCH W. (2004). Switching from grass to maize diet changes the C isotope signature of meat and fat during fattening of steers. In Proceedings of the 20th general meeting of the European grassland federation. *Grassland Science in Europe* (Vol. 9, pp. 1130–1132). Lucern: European Grassland Federation.

GONZALEZ-MARTIN I., GONZALEZ-PEREZ C., HERNANDEZ MENDEZ J., SANCHEZ GONZALEZ C. (2001): Differentiation of dietary regimen of Iberian swine by means of isotopic analysis of carbon and sulfur in hepatic tissue. *Meat Science* 58, 25-30.

HEGERDING L., SEIDLER D., DANNEEL H.J., GESSLER A., NOWAK B. (2002): Sauerstoff-Verhältnis-Analyse zur Herkunftsbestimmung von Rindfleisch. *Fleischwirtschaft* 82, 95-100.

LÜPKE M., THIEM I., SEIFERT H. (2005): Differenzierung zu ungenau. *Fleischwirtschaft* 85 (3), 22-24.

PIASSENTIER E., VALUSSO R., CAMIN F., VERSINI G. (2003): Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. *Meat Science* 64 (3), 239-247.

RENOU J.P., BIELICKI G., DEPONGE C., GACHON P., MICHOL D., RITZ P. (2004): Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry. Part II: Beef meat. *Food Chemistry* 86, 251–256

SCHWERTL, M., AUERSWALD, K., SCHÄUFELE, R., SCHNYDER, H. (2005): Carbon and nitrogen stable isotope composition of cattle hair: ecological fingerprints of production systems? *Agriculture Ecosystems & Environment*. In press

THIEM I., LÜPKE M., SEIFERT H. (2004): FACTORS influencing the O-18/O-16-ratio in meat juices. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 40 (3), 191-197.