Nachweis der geographischen Herkunft von Pistazien anhand der Stabilisotopenverhältnisse

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemikerin
Anke Heier
aus Berlin

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Rotard
Berichterin: Prof. Dr. A. Hartwig
Berichter: Prof. Dr. R. Wittkowski

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 07. September 2006

Berlin 2006

D 83

Für meine Mutter

Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie bei meinen Eltern für ihre langjährige Unterstützung bedanken, denn ohne ihre Ermutigung zum Studium und der finanziellen Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Herrn Professor Wittkowski danke ich ganz herzlich für die Bereitstellung des Themas und die Beurteilung dieser Arbeit sowie auch für seine Unterstützung bei meinem einjährigen Englandaufenthalt über das Marie Curie Stipendium.
Frau Professor Hartwig möchte ich ebenfalls für die Übernahme der Betreuung und die Beurteilung dieser Arbeit danken.
Herrn Professor Stan gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung und das Beurteilungsschreiben, durch die ich das NaFöG-Stipendium erhalten habe.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich auch bei meinem Arbeitskreis und den vielen lieben Kollegen am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) bedanken, in deren Mitte ich mich sehr wohl gefühlt habe und die mir immer hilfreich zur Seite standen – moralisch, technisch, statistisch, im Labor und bei der Auswertung und kritischen Beurteilung dieser Arbeit.

Meinen privaten Freunden gilt mein besonderer Dank, denn auch von dieser Seite habe ich viel Hilfe und Ermutigung bekommen und die nötige Ablenkung von der Arbeit. Vielen Dank auch an alle, die für mich fleißig Pistazienproben gesammelt haben.

Für die Bereitstellung von kostenlosem, authentischem Probenmaterial möchte ich folgenden Personen und Instituten recht herzlich danken:

Dr. F. Shojaee
Khatam Lab
Tehran, Iran

Dr. H. Yazdanpanah und Dr. M. Cheraghali
Ministry of Health and Medical Education
Food and Drug Control Labs
Tehran, Iran

B. Klein
California Pistachio Commission
Fresno, United States of America

L. Börs
Dr. Wierts – Dipl. Chem. Eggert – Dr. Jörissen GmbH
Handels- und Umweltschutzlaboratorium
Hamburg, Deutschland

Für den Einkauf und die Zusendung von Pistazien in/aus Kalifornien bedanke ich mich ebenfalls ganz herzlich bei Herrn M. Kracht und Frau S. Freihammer.

Abstract

Previously there was no established analytical procedure to prove the origin and authenticity of pistachio nuts. A simple, quick method is needed because every batch of Iranian and Turkish pistachios have to be inspected by law for aflatoxin contamination before they are allowed to be imported into the European Union (EU).
By contrast, US American pistachio nuts do not have to be checked. Therefore, Iranian pistachios are repeatedly labelled as being of US American origin to generate higher prices on the world market and to avoid the analytical control at the EU borders.

This work presents a fast method to provenance pistachio nuts grown by the three main producer countries: Iran, USA and Turkey. The δ-values of the elements oxygen, carbon and nitrogen measured by stable isotope ratio mass spectrometry (IRMS) are used as variables for univariate and multivariate statistics.

First, the IRMS method was validated in-house for each element and pistachio fraction. The repeatability (r) and reproducibility (R) for the EA methods are <0.6 ‰ whereas r and R for the TC/EA methods are higher (≤1.5 ‰) due to the linearity problems of this instrument. Pistachio oil was found to be the best fraction to analyse; its liquid matrix produces the lowest standard deviations and best r- and R-values in comparison with the solid fractions (grinded nut and defatted residue). The instruments were calibrated by reference materials prior to sample analysis and the stability of the reference materials, working standards and pistachio nuts were observed by control charts.

The dataset of the authentic pistachio samples was examined for outliers by cross-checking with three different tests and then by univariate statistic tests (normality, homogeneity of variance, post-hoc tests of observed means, analysis of correlation) and principal compound analysis before performing discriminant analysis.
25-30 authentic pistachio samples were collected for each country and used to set up the discriminant analysis model. This model is able to separate the three countries with 100 % statistical probability (95 % confidence level). 63 further pistachio samples were used to test the strengths and limits of the classification model.

Key words: pistachio nuts, origin, authenticity, isotopes, IRMS, EA, TC/EA, $\delta^{18}O$, $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$, multivariate statistics, discriminant analysis

Inhaltsverzeichnis

ABSTRACT ..... **IV**

INHALTSVERZEICHNIS ..... **V**

TABELLENVERZEICHNIS ..... **IX**

ABBILDUNGSVERZEICHNIS ..... **XII**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... **XV**

1. PROBLEMSTELLUNG **1**

2. EINLEITUNG **2**

3. ALLGEMEINER TEIL **5**

3.1 Pistazien **6**

3.1.1 Ernte/Verarbeitung 7

3.1.2 Klima 8

3.1.3 Wirtschaft 9

3.1.4 Aflatoxinproblematik 12

3.2 Stabilisotope **14**

3.2.1 Kohlenstoff 16

3.2.2 Stickstoff 22

3.2.3 Sauerstoff 25

3.2.3.1 Wasserkreislauf *25*

3.2.3.2 Sauerstoffkreislauf in Pflanzen *29*

3.2.3.3 Weitere Einflussfaktoren auf das $^{18}O/^{16}O$-Verhältnis von Pflanzen *31*

3.3 Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) **32**

3.3.1 IRMS-Basisgeräte 32

3.3.2 Elementaranalysator (EA) 34

3.3.3 ConFlo II^{TM}-Interface 35

3.3.4 High Temperature Conversion / Elemental Analyzer (TC/EA) 36

3.4 Multivariate Datenanalyse 38
3.4.1 Hauptkomponentenanalyse 39
3.4.2 Diskriminanzanalyse 40

4. ERGEBNISTEIL I: METHODENVALIDIERUNG 41

4.1 Kalibrierung der Arbeitsstandards 44

4.2 Stabilitätsprüfung der Referenzgas-Kalibrierung 47

4.3 Linearer Arbeitsbereich 49

4.4 Voruntersuchungen von Pistazien 50
4.4.1 Streubreite innerhalb einer Handelsverpackung 50
4.4.2 δ-Wert-Beziehungen zwischen einzelnen Pistazienbestandteilen 52

4.5 In-House-Validierung der IRMS-Methode 54
4.5.1 Richtigkeit 54
4.5.2 Präzision 55
4.5.3 Prüfung der Laborpräzision 58
4.5.4 Stabilität / Alterungsstudie 58

4.6 Prüfung der Öl-Extraktionsmethode 62
4.6.1 Diskriminierungsstudie anhand der Soxhletmethode 62
4.6.2 Vergleich der Soxhlet-Methode mit der ASE 63
4.6.3 Wiederholbarkeit der Extraktionsmethode 64

4.7 Einfluss von Röstung und Salzung auf den δ-Wert 66

5. ERGEBNISTEIL II: UNIVARIATE STATISTIK 69

5.1 Übersicht über das Probenmaterial 70

5.2 Box-Plot-Betrachtung des authentischen Datenmaterials 71

5.3 Univariate statistische Vorbetrachtung des authentischen Datenmaterials 74
5.3.1 Betrachtung der Ausreißer 75
5.3.1.1 Box-Plots 75
5.3.1.2 Ausreißertest nach Grubbs und Nalimov 77
5.3.2 Prüfung der Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov 80
5.3.3 Prüfung der Homogenität der Varianzen nach Levene 81
5.3.4 Prüfung auf Gruppenunterschiede mittels Post-Hoc-Mehrfachvergleichen 82
5.3.5 Korrelationsanalyse 84

6. ERGEBNISTEIL III: MULTIVARIATE STATISTIK 87

6.1 Betrachtung des authentischen Datenmaterials in x-y-Streudiagrammen 90

6.2 Hauptkomponentenanalyse 93

6.2.1 Prüfung der Eignung der Korrelationsmatrix 93

6.2.2 Extraktion der Faktoren (Komponenten) 95

6.2.3 Faktorinterpretation / Rotation 97

6.2.4 Grafische Darstellung der Faktorwerte 98

6.3 Diskriminanzanalyse 100

6.3.1 Schrittweise Diskriminanzanalyse 100

6.3.2 Erstellung des Diskriminanzmodells 103

6.3.2.1 Schätzung der Koeffizienten der Diskriminanzfunktionen 103

6.3.2.2 Beurteilung der Trennkraft/Güte der Diskriminanzfunktionen 103

6.3.2.3 Ableitung des Erklärungsbeitrags der einzelnen Variablen 105

6.3.3 Prüfung des Klassifizierungsmodells 107

6.3.4 Klassifizierungsfunktionen nach Fisher 109

6.3.5 Grafische Darstellung der Funktionswerte 111

6.3.6 Diskriminanzanalyse mit den Isotopenvariablen der Pistazien-Gesamtnuss 113

6.4 Anwendung der multivariaten Datenmodelle 117

6.4.1 Klassifizierung von Handelsproben mit deklarierter Herkunft 117

6.4.2 Klassifizierung von Handelsproben unbekannter Herkunft 119

6.4.3 Klassifizierung von Mischproben USA ↔ Iran 120

6.4.4 Klassifizierung der Ausreißer aus Kapitel 5.3.1 123

6.4.5 Multivariate Betrachtung anderer Länder 127

7. ERGEBNISDISKUSSION 129

8. ZUSAMMENFASSUNG 145

9. MATERIAL UND METHODEN 149

9.1 Probenliste 150

9.2 Standards und Referenzmaterialien 160

9.2.1 Referenzmaterialien der IAEA 160

9.2.2 In-House kalibrierte Arbeitsstandards 160

9.2.3 Gerätekontrollproben 161

9.3 Geräteeinstellungen und Probenvorbereitung 162
9.3.1 Isotopenmassenspektrometer 162
9.3.2 Elementaranalysator (EA) 162
9.3.3 Pyrolyseeinheit (TC/EA) 164
9.3.4 Probenvorbereitung für die IRMS 165
9.3.5 Gewinnung des Pistazienöls 166
9.3.6 Röstung und Salzung im Laborversuch 167

10. LITERATURVERZEICHNIS 169

ANHANG I

Anhang I: Formelverzeichnis II
Berechnung des δ-Werts II
Statistische Grundformeln IV
Statistische Tests VII

Anhang II: Weiterführende Erläuterungen zur mulitvariaten Statistik IX
Einteilung multivariater Analysenmethoden IX
Durchführung einer Hauptkomponentenanalyse X
Nähere Erläuterungen zur Diskriminanzanalyse XI

Anhang III: Probenliste mit δ-Wert-Messergebnissen XIV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Exportmengen und Handelswerte von Pistazien aus den drei Hauptanbauländern .. 13
Tabelle 2: Relative natürliche Häufigkeiten der stabilen Isotope der Bioelemente 14
Tabelle 3: Internationalen Bezugsstandards, typische Messgase und Isotopenverhältnisse der Bioelemente für die IRMS Messung..... 15
Tabelle 4: Ausmaß und Faktoren der Unterschiede im $\delta^{13}C$-Wert von C3-Pflanzen 21
Tabelle 5: Jahresdurchschnittliche $\delta^{18}O$-Werte des Niederschlags in den Hauptanbaugebieten der Pistazien..... 27
Tabelle 6: Geografische Lage zentraler Städte in den Pistazienanbaugebieten der drei Hauptproduzenten Iran, Türkei und USA 28
Tabelle 7: Ergebnisse der Kalibrierung der Feststoff-Arbeitsstandards mittels IAEA-Referenzmaterialien 45
Tabelle 8: Ergebnisse der Referenzgas-Kalibrierung (Mittelwerte aus verschiedenen Standards und Sequenzen) 45
Tabelle 9: Ermittelte lineare Arbeitsbereiche für die ^{13}C-, ^{15}N- und ^{18}O-Methode 49
Tabelle 10: $\delta^{13}C$-Ergebnisse des Vergleichs der Standardabweichung von 10 einzelnen Pistaziennüssen und einer 20 g-Mischprobe derselben Tüte 50
Tabelle 11: $\delta^{15}N$-Ergebnisse des Vergleichs der Standardabweichung von 10 einzelnen Pistaziennüssen und einer 20 g-Mischprobe derselben Tüte 51
Tabelle 12: $\delta^{18}O$-Ergebnisse des Vergleichs der Standardabweichung von 10 einzelnen Pistaziennüssen und einer 20 g-Mischprobe derselben Tüte 51
Tabelle 13: Minimale, maximale und mittlere Differenz zwischen den δ-Werten von Haut ↔ Kern und Schale ↔ Kern aus der Untersuchung von einzelnen Pistaziennüssen ... 52
Tabelle 14: Pearson-Korrelationsmatrix für $\delta^{13}C$ von Schale, Haut und Kern 52
Tabelle 15: Pearson-Korrelationsmatrix für $\delta^{15}N$ von Haut und Kern 53
Tabelle 16: Pearson-Korrelationsmatrix für $\delta^{18}O$ von Schale, Haut und Kern 53
Tabelle 17: Überprüfung der Methoden-Richtigkeit mittels der Arbeitsstandards und Proben bekannten δ-Werts 55
Tabelle 18: Ergebnisse der Ermittlung der Präzisionsdaten für die ^{13}C-Methode 56
Tabelle 19: Ergebnisse der Ermittlung der Präzisionsdaten für die ^{15}N-Methode 56
Tabelle 20: Ergebnisse der Ermittlung der Präzisionsdaten für die ^{18}O-Methode 57
Tabelle 21: Daten für die Qualitätsregelkarten zur Kontrolle der Verfahrensstabilität aus der Vorperiode 59
Tabelle 22: Ergebnisse der Alterungsstudie mit Pistazien 60
Tabelle 23: Vergleich der δ-Werte zweier Öle vor und nach Soxhlet-Extraktion 62

Tabelle 24: Vergleich der δ-Wert-Ergebnisse nach der Extraktion mit der Soxhlet- und der ASE-Methode 63
Tabelle 25: Ergebnisse des Vergleichs der Mittelwerte (n = 5) von sechs ASE-Extraktionen einer Pistazienprobe 64
Tabelle 26: Einfluss des Röstens und Salzens auf den $\delta^{13}C_{PDB}$-Wert 66
Tabelle 27: Einfluss des Röstens und Salzens auf den $\delta^{15}N_{Air}$-Wert 67
Tabelle 28: Einfluss des Röstens und Salzens auf den $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Wert 67
Tabelle 29: Zusammenfassung der Box-Plot-Ausreißer und -Extremwerte des authentischen Datenmaterials der USA 75
Tabelle 30: Zusammenfassung der Box-Plot-Ausreißer und -Extremwerte des authentischen Datenmaterials der Türkei 75
Tabelle 31: Zusammenfassung der Grubbs-/Nalimov-Test-Ausreißer des authentischen Datenmaterials des Irans 77
Tabelle 32: Zusammenfassung der Grubbs-/ Nalimov-Test-Ausreißer des authentischen Datenmaterials der USA 77
Tabelle 33: Zusammenfassung der Grubbs-/Nalimov-Test-Ausreißer des authentischen Datenmaterials der Türkei 78
Tabelle 34: Signifikanzergebnisse (P = 95%) des K-S-Normalverteilungstests vom authentischen Datenmaterial ohne Ausreißer 80
Tabelle 35: Signifikanzergebnisse des Levene-Tests auf Varianzhomogenität 81
Tabelle 36: Signifikanz-Ergebnisse multipler Vergleichstests 82
Tabelle 37: Korrelationskoeffizienten nach Pearson für die Variablen der authentischen Proben 84
Tabelle 38: Ergebnis des Bartlett-Tests und Wert des KMO-Kriteriums 94
Tabelle 39: Ergebnisse des MSA-Maßes 94
Tabelle 40: Eigenwerte und prozentueller Beitrag der Komponenten zur Erklärung der Gesamtvarianz 95
Tabelle 41: Anfängliche und mit zwei Faktoren extrahierte Kommunalitäten 96
Tabelle 42: Komponentenmatrix 97
Tabelle 43: Rotierte Komponentenmatrix 97
Tabelle 44: Ergebnis der schrittweisen Diskriminanzanalyse mit allen Variablen des authentischen Datensatzes der Pistazien 101
Tabelle 45: Ergebnis der schrittweisen Diskriminanzanalyse mit sechs Variablen 102
Tabelle 46: Maßzahlen zur Überprüfung der Modellgüte der Diskriminanzanalyse mit 3 und 2 Variablen 104
Tabelle 47: Wilks´ Lambda und χ^2-Test zur Bewertung der Modellgüte 104
Tabelle 48: Struktur-Matrix der 3-Variablenkombination 105

Tabelle 49: Struktur-Matrix der 2-Variablenkombination 105
Tabelle 50: Klassifikationsmatrix mit den Ergebnissen der 3- und 2-Variablenkombination nach der R-, L- und H-Methode 108
Tabelle 51: Fisher-Klassifikationsmatrix mit den Ergebnissen der 3- und 2-Variablenkombination nach der R- und H-Methode 110
Tabelle 52: Klassifikationsmatrix aus der Diskriminanzanalyse der 3- und 2-Variablenkombination der Pistazien-Gesamtnuss mit den Ergebnissen nach der R-, L- und H-Methode 114

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Separationsergebnis nach Ländern von Pistazienproben mit einer Auftragung des C/N-Verhältnisses gegen den δ^{15}N-Wert ... 3
Abbildung 2: Nährstoffzusammensetzung [%] von Pistazien ... 6
Abbildung 3: Klimadiagramme der iranischen Städte Kerman, Shiraz und Yazd ... 8
Abbildung 4: Klimadiagramme der amerikanischen Stadt Fresno (California Central Valley) und der türkischen Stadt Urfa ... 8
Abbildung 5: Pistazienweltproduktion 2003 ... 9
Abbildung 6: Hauptexporteure (links) und -importeure (rechts) von Pistazien 2003 ... 9
Abbildung 7: Irankarte und Hauptexportländer für iranische Pistazien 2003 ... 10
Abbildung 8: Türkeikarte und Hauptexportländer für türkische Pistazien 2003 ... 10
Abbildung 9: Kalifornienkarte und Hauptexportländer für amerikanische Pistazien 2003 ... 11
Abbildung 10: Hauptimport- (links) und Exportländer (rechts) Deutschlands 2003 ... 11
Abbildung 11: Strukturformel Aflatoxin B_1 ... 12
Abbildung 12: δ^{13}C-Verteilung des Kohlenstoffs in der Natur ... 16
Abbildung 13: Querschnitte durch Blätter von C_3- und C_4-Pflanzen mit schematischer Darstellung der relevanten Schritte bei den unterschiedlichen Photosynthesewegen ... 17
Abbildung 14: δ^{13}C-Werte verschiedener Kohlenstoffpools ... 18
Abbildung 15: $\delta^{15}N_{Air}$-Werte verschiedener Stickstoffpools ... 22
Abbildung 16: Stickstoffkreislauf der wichtigsten N-Verbindungen zwischen Atmosphäre, Boden und Grundwasser ... 23
Abbildung 17: Schematische Darstellung der verschiedenen, natürlichen Faktoren, die auf das Sauerstoffisotopenverhältnis der Pflanzen Einfluss nehmen ... 25
Abbildung 18: Schema des globalen Wasserkreislaufs ... 26
Abbildung 20: Durchschnittliche $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Zusammensetzung des Niederschlags in Nord-Amerika 2001 ... 27
Abbildung 21: Zusammenhang zwischen den primären Sauerstoffquellen und den δ^{18}O-Werten organischer Komponenten und funktionellen Gruppen ... 30
Abbildung 22: $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte verschiedener Sauerstoffpools ... 30
Abbildung 23: δ^{15}N- und δ^{18}O-Werte verschiedener Düngernitrate ... 31
Abbildung 24: Schema der Ionenoptik eines Finnigan Delta^{plus}-IRMS ... 33
Abbildung 25: Schema des Aufbaus und der Funktionsweise des EA ... 34
Abbildung 26: Schema der Funktionsweise eines ConFlo II^{TM}-Interfaces im Dualgasmode ... 35
Abbildung 27: Schema des Aufbaus und der Funktionsweise des TC/EA ... 36
Abbildung 28: Qualitätsregelkarte Acetanilid zur Überprüfung der CO_2-Referenzgas-kalibrierung ... 47

Abbildung 29: Qualitätsregelkarte Acetanilid zur Überprüfung der N_2-Referenzgas-kalibrierung 47
Abbildung 30: Qualitätsregelkarte Cellulose zur Überprüfung der CO-Referenzgas-kalibrierung 48
Abbildung 31: Lineare Regression zwischen $\delta^{13}C$ von Haut und Kern 52
Abbildung 32: Lineare Regression zwischen $\delta^{15}N$ von Haut und Kern 53
Abbildung 33: Lineare Regression zwischen $\delta^{18}O$ von Haut und Kern 53
Abbildung 34: Qualitätsregelkarte von Atropin (GKP) zur Prüfung der Verfahrensstabilität der ^{13}C-Methode 59
Abbildung 35: Qualitätsregelkarte von Atropin (GKP) zur Prüfung der Verfahrensstabilität der ^{15}N-Methode 59
Abbildung 36: Qualitätsregelkarte von Benzoesäure (GKP) zur Prüfung der Verfahrens-stabilität der ^{18}O-Methode 60
Abbildung 37: Überblick über das untersuchte Probenmaterial 70
Abbildung 38: Box-Plot-Darstellung der $\delta^{13}C$-Messwerte des authentischen Datensatzes 71
Abbildung 39: Box-Plot-Darstellung der $\delta^{15}N$-Messwerte des authentischen Datensatzes 72
Abbildung 40: Box-Plot-Darstellung der $\delta^{18}O$-Messwerte des authentischen Datensatzes 72
Abbildung 41: Auftragung der $\delta^{13}C_{PDB}$- gegen die $\delta^{15}N_{Air}$-Messwerte der authentischen Pistazien 90
Abbildung 42: Auftragung der $\delta^{15}N_{Air}$- gegen die $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Messwerte der authentischen Pistazien 90
Abbildung 43: Auftragung der $\delta^{13}C_{PDB}$- gegen die $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Messwerte der authentischen Pistazien 91
Abbildung 44: Wiederholung der Abbildung 1 zum Vergleich 91
Abbildung 45: Grafische Darstellung der Varimax-rotierten Faktorwerte aus der Hauptkomponentenanalyse mit dem authentischen Pistaziendatensatz 98
Abbildung 46: Grafische Darstellung der Funktionswerte aus der Diskriminanzanalyse mit 3 Variablen 111
Abbildung 47: Grafische Darstellung der Funktionswerte und Trenngeraden aus der Diskriminanzanalyse mit 2 Variablen 112
Abbildung 48: Grafische Darstellung der Funktionswerte aus der Diskriminanzanalyse mit den 3 Pistazien-Gesamtnussvariablen 115
Abbildung 49: Grafische Darstellung der Funktionswerte und Trenngeraden aus der Diskriminanzanalyse mit den 2 Pistazien-Gesamtnussvariablen 115
Abbildung 50: Grafische Darstellung der Klassifizierung von Handelsproben mit deklarierter Herkunft durch das 3-Variablen-Diskriminanzmodell aus Kapitel 6.3.2 118

Abbildung 51: Grafische Darstellung der Klassifizierung von Handelsproben unbekannter Herkunft durch das 3-Variablen-Diskriminanzmodell aus Kapitel 6.3.2 119
Abbildung 52: Grafische Darstellung der Klassifizierung von USA-Iran-Mischproben verschiedener Verhältnisse durch das 3-Variablen-Diskriminanzmodell aus Kapitel 6.3.2 121
Abbildung 53: Grafische Darstellung der Klassifizierung von USA-Iran-Mischproben verschiedener Verhältnisse durch ein 2-Länder-Diskriminanzmodell im Vergleich mit der $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Messreihe des Öls 122
Abbildung 54: Klassifizierung der Ausreißer aus dem authentischen Pistaziendatensatz mit dem 3-Variablenmodell 123
Abbildung 55: Klassifizierung der Ausreißer aus dem authentischen Pistaziendatensatz mit dem 2-Variablenmodell 124
Abbildung 56: Wiederholung der Abb. 46 aus Kap. 6.3.5 (Darstellung der Diskriminanz-funktionswerte) 138
Abbildung 57: Auftragung der $\delta^{13}C_{PDB}$- gegen die $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Messwerte der authentischen Pistazienöle 138

Abkürzungsverzeichnis

$	Dollar
%	Prozent
∅	Durchmesser
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
‰	Promille
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
AES	Atomemissionsspektroskopie
Air	Stickstoff der Luft: Bezugstandard für Stickstoffisotopenmessung
allg.	allgemein
Anm.	Anmerkung
ANOVA	**AN**alysis **O**f **VA**riance
ASE	Accelerated Solvent Extraction
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung (ehemals BgVV)
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CAM	Crassulacean Acid Metabolism
CO	Kohlenmonoxid
CO_2	Kohlendioxid
DSC	Differential Scanning Calorimeter
EA	Elemental Analyser: Elementaranalysator
EG	Europäische Gemeinschaft
et al.	et alii: und andere
EU	European Union
Forts.	Fortsetzung
g	Gramm
GC	Gaschromatografie
GFS	Gemeinsame Forschungsstelle
GISP	Greenland Ice Sheet Precipitation: Referenzwasser der IAEA
GNIP	Global Network of Isotopes in Precipitation
H	Wasserstoff
H_2O	Wasser

ha	Hektar
He	Helium
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography: Hochdruckflüssigkeitschromatrografie
IAEA	International Atomic Energy Agency: Internationale Atomenergiebehörde
ICP	Inductive Coupled Plasma
int.	international
IRMS	Isotope Ratio Mass Spectrometry: Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
kJ	Kilojoule
km²	Quadratkilometer
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LSD	paarweiser multipler Vergleichstest auf geringste signifikante Differenz
m	Meter
mg	Milligramm
MHmV	Mykotoxin-Höchstmengenverordnung
min.	Minute
mm	Millimeter
N	Stickstoff
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Nr.	Nummer
O	Sauerstoff
o.g.	oben genannt
p	Signifikanz
P	Wahrscheinlichkeitsniveau
PDB	Pee Dee Belemnite: Bezugsstandard für die Kohlenstoffisotopenmessung
r	Wiederholbarkeit
R	Vergleichbarkeit
r.F.	relative Luftfeuchtigkeit
Ref.gas	Referenzgas
s	Sekunde
s	Standardabweichung
S	Spannweite
s.	siehe
s.o.	siehe oben
sog.	so genannt
Std.	Standard

t	Tonne
Tab.	Tabelle
TC/EA	High Temperature Combustion Elemental Analyser: Pyrolyseeinheit
ü.d.M.	über dem Meeresspiegel
vgl.	vergleiche
VO	Verordnung
VSMOW	Vienna Standard Mean Ocean Water: Bezugstandard für Sauerstoffisotopenmessung und Referenzwasser der IAEA
x	Mittelwert
X	Mittelwert der Mittelwerte (Gesamtmittelwert)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
zw.	zwischen
Σ	Summe

1. Problemstellung

Die Hauptanbaugebiete von Pistazien liegen im Iran und den USA. Diese beiden Länder teilen sich fast den gesamten Pistazien-Weltmarkthandel, jedoch erzielen die USA aufgrund modernerer Erntemethoden eine bessere Qualität hinsichtlich der Schimmelpilzbelastung. Daraus resultiert ein etwas höherer Weltmarktpreis für amerikanische Pistazien. Bei iranischen Pistazien (wie auch bei türkischen) wird häufiger eine Überschreitung des Mykotoxingrenzwerts (MHmV) gefunden und daher unterliegen diese einer Vorführpflicht in der Europäischen Union (EU), amerikanische jedoch nicht. Aus diesem Grund kommt es immer wieder vor, dass iranische Ware umetikettiert und als teurere, amerikanische verkauft wird, so dass der Verbraucher gemäß §11 des deutschen Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) getäuscht wird.

Die EU zeigt an Methoden zur Feststellung der geografischen Herkunft von Lebensmitteln auch ein großes Interesse, was die Inhalte der Forschungsthemen des 5. und 6. Rahmenprogramms zeigen. Es wird nicht mehr nur der gesundheitliche Verbraucherschutz gefördert, sondern auch der Schutz von Lebensmitteln, die sich durch die Produktion in einer bestimmten Region qualitätsmäßig und damit auch preislich hervorheben. Bei hochwertigen Lebensmitteln besteht somit immer die Gefahr einer Nachahmung, Verfälschung oder falschen Deklaration von Lebensmitteln. Daher wird im Anhang 2 der Entscheidung des Rats vom 30. September 2002 (2002/836/EG) als ein Kernbereich die „öffentliche Sicherheit und Betrugsbekämpfung“ genannt. In der näheren Erklärung heißt es explizit: „Die GFS beabsichtigt, die Anwendung neuer Technologien zu prüfen ... Korrelation der Isotopen-Analysen von Getränken und Lebensmitteln zur Bestimmung von Bestandteilen und Herkunft ...“. Des Weiteren heißt es in der Entscheidung des Rats vom 30. September 2002 (2002/834/EG) im Anhang 1 unter dem Ziel 1.1.5 „Lebensmittelqualität und -sicherheit“: „Im Mittelpunkt der Forschung werden folgende Themen stehen: ... Implementierung und Validierung von Methoden für die gesamte Lebensmittelkette; Sicherstellung der Unverfälschbarkeit; Echtheit von Kennzeichnungen ...“.

Aus diesen Gründen besteht hier (vor allem in der Lebensmittelüberwachung) der Bedarf an einer effizienten Methode, um die geografische Herkunft von Pistazien in Handelsware ermitteln und ihre Kennzeichnung überprüfen zu können. Das Hauptziel dieser Arbeit soll daher die Entwicklung einer Methode sein, mit der Pistazien der beiden Hauptanbauländer Iran und USA unterschieden werden können, sowie auch die der Türkei, da diese gleichermaßen einer Vorführpflicht in der EU unterliegen und häufig auf dem deutschen Markt zu finden sind.

2. Einleitung

Pistazien werden in ihrem Ursprungsland Iran häufig noch traditionell per Hand durch Schütteln des Baums und Aufsammeln der heruntergefallenen Nüsse von Matten geerntet. Dadurch kann neben Schmutz und Mikroorganismen auch der Schimmelpilz *Aspergillus flavus* in die geöffneten Schalen gelangen, der als Ausscheidungsprodukt die hoch krebserzeugenden Aflatoxine bildet. Feuchtigkeit und Wärme unterstützen zudem ein rasches Wachstum dieses Schimmelpilzes. Dies stellt vor allem bei iranischen Pistazien ein Problem dar, da sie oftmals nicht ausreichend getrocknet werden und noch lange in schlecht gelüfteten Silos lagern, bevor sie zur Weiterverarbeitung (Rösten und Salzen) mit Containerschiffen in die Verbraucherländer transportiert werden.
1997 wurden bis zu 70 % der iranischen Pistazienlieferungen aufgrund zu hoher Aflatoxinwerte an den europäischen Grenzen abgelehnt und die EU reagierte darauf mit einem europaweiten Einfuhrstopp. Eine Pistazienverordnung (97/830/EG) löste Ende 1997 das Einfuhrverbot durch eine noch heute gültige Einfuhrbeschränkung ab. Seitdem müssen von allen iranischen Pistazienimporten Proben genommen und auf ihre Unbedenklichkeit hin untersucht werden. Seit 2002 gilt diese Vorführpflicht auch für Pistazien aus der Türkei (2002/80/EG). Im Gegensatz dazu werden die Pistazien in den USA rein maschinell geerntet, gewaschen, getrocknet, sortiert und meist noch auf der Ranch geröstet und gesalzen. Die Ware ist daher kaum aflatoxinkontaminiert, so dass amerikanische Pistazien auf dem Weltmarkt einen höheren Preis erzielen und keinerlei Einfuhrkontrollen unterliegen. USA-Pistazien sind daher aus Gewinngründen dazu geeignet, mit den günstigeren iranischen verschnitten oder ganz ausgetauscht zu werden. Desgleichen können auch die zwar kleinen, aber geschmacklich hochwertigen türkischen Pistazien mit iranischen verschnitten oder ausgetauscht sein, da ihr Weltmarktpreis noch viel höher liegt. Eine Methode zur Feststellung der geografischen Herkunft von Pistazien wäre daher für die Lebensmittelüberwachung sehr hilfreich.

Eine Literaturstudie hinsichtlich Veröffentlichungen, die sich mit der geografischen Herkunft von Pistazien befassen, erbrachte nur wenige Ergebnisse. 1989 und 1990 wurden von S.M. Dyszel et al.[73,74] zwei Arbeiten herausgebracht, die aus der Datenkombination eines sehr hohen Geräteaufwands (HPLC, DSC, AAS/ICP bzw. GC) iranische, kalifornische und türkische Pistazien unterscheiden konnten. Die untersuchte Probenanzahl wurde in den Artikeln nicht genannt. R. Schwartz und L. Hecking[241] beschrieben 1991 eine weitere langwierige und komplizierte Methode aus ICP-AES, AAS und mulivariater Statistik, mit der Pistazienproben aus sechs verschiedenen Ländern richtig klassifiziert werden konnten. Es wurden jedoch insgesamt nur 33 Proben untersucht, was für eine aussagekräftige statistische Auswertung zu wenig ist und einen sog. „Lasso-Effekt“ (näheres s. Kap. 3.4.2) erzeugt.

Ein weiterer Versuch, die Authentizität von Pistazien aus den drei Haupterzeugerländern Iran, Kalifornien (USA) und Türkei nachzuweisen, wurde erst kürzlich von K. Anderson und B. Smith (2005)[7] unternommen. Hier wurde die Trennung der drei Länder mit Hilfe der ICP-AES-Technik und multivariater Methoden (u.a. Haupkomponenten- und Diskriminanzanalyse) versucht. Anders als bei dem Versuch von R. Schwartz und L. Hecking (1991)[241], wurden hier knapp 380 Proben aus zwei aufeinander folgenden Erntejahren vermessen, jedoch sind die Probenzahlen pro Land und Erntejahr sehr unterschiedlich. Es konnte eine grafisch sichtbare Auftrennung der ICP-MS-Daten in drei Punktwolken erreicht werden, jedoch kommen Überlappungen vor (Klassifikationsmatrix gibt Zuordnungssicherheit zwischen 65-100 % aus). Bei der Türkei treten hierbei die größten Fehlerraten auf. Als Erklärung dafür wurden von den Autoren die vorher mit der ANOVA nachgewiesenen, saisonalen Unterschiede, eine breitere geografische Streuung der gesammelten Proben aus dem Jahr 2001 und evtl. Sortenunterschiede postuliert.
Neben der ICP-AES-Messung wurde von K. Anderson und B. Smith[7] auch ein Teil (n=71) des Gesamtdatensatzes aus 2001 auf $\delta^{13}C$- und $\delta^{15}N$-Isotopendaten sowie das gesamt C/N-Verhältnis vermessen. Die von den ICP-MS-Daten separate, statistische Auswertung der δ-Werte blieb univariat, da mit einer Auftragung des C/N-Verhältnisses gegen den $\delta^{15}N$-Wert die kalifornischen Proben klar von den anderen abgetrennt sind. Die Punktwolken der türkischen und iranischen Pistazienproben liegen jedoch sehr nahe beieinander und eine klare Trennung ist hier nicht zu erkennen. Außerdem können mit diesem Modell unbekannte Proben, die in diesen Schnittmengenbereich fallen, nicht klar identifiziert werden. Die nachfolgende Abbildung 1 zeigt das Ergebnisdiagramm von K. Anderson und B. Smith[7].

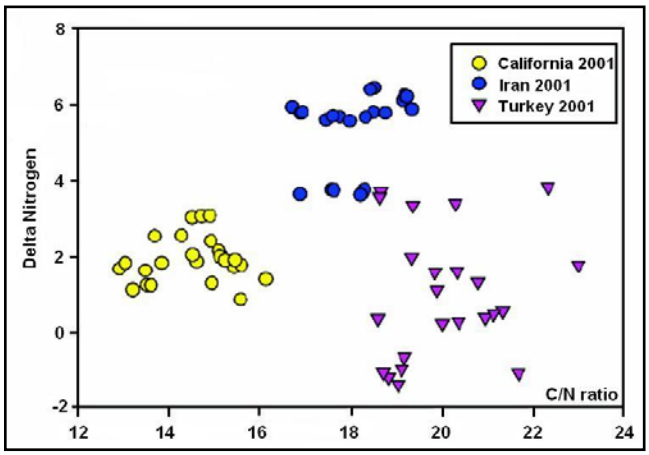


Abbildung 1:
Separationsergebnis nach Ländern von Pistazienproben mit einer Auftragung des C/N-Verhältnisses gegen den $\delta^{15}N$-Wert

Originalgrafik verändert nach Anderson et al.[7]

Die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) hat sich schon häufig in der Lebensmittelanalytik auf den Gebieten des Authentizitäts- und Verfälschungsnachweises als leistungsstark bewährt. Die Methodik nutzt aus, dass in der Natur sog. Isotopeneffekte auftreten, durch die es zu erheblichen globalen Unterschieden in der Isotopenzusammensetzung kommt, die sich wiederum in den Pflanzen und damit auch in den daraus hergestellten Lebensmitteln niederschlagen.

Daher können über einzelne Stabilisotopengehalte (Bioelemente H, O, C, N) oder deren Kombination z.B. die Herkunft hochwertiger Lebensmittel wie Wein[30,94,109,115,136,222], Vanillin[125,188], Honig[188,218,301], Olivenöl[154,249,250], Kaffee[52,188,276] oder Tee[279,280] unterschieden werden. Außerdem eignet sich diese Technik auch zur Unterscheidung von Pflanzenarten oder synthetischen von natürlichen Produkten. So kann z.B. die Zuckerung von Honig[218,288,290,291], Fruchtsaft[68,104,161,169,219] und Wein[91,220,221], der Ersatz von natürlichen Aromen durch synthetisch hergestellte[20,27,29,33,225] oder die Rohstoffgrundlage von Whisky[188,195] oder Tequila[16] mit der Isotopenmassenspektrometrie festgestellt werden. Ein umfassender Übersichtsartikel über die Anwendung der Stabilisotopenanalytik zur Bestimmung der Herkunft und Authentizität von Lebensmitteln wurde erst kürzlich von Schmidt et al. (2005)[233] veröffentlicht.

Nach den Ergebnissen von Anderson et al.[7] wird daher angenommen, dass die Frage nach der geografischen Herkunft von amerikanischen, iranischen und türkischen Pistazien mit Hilfe einer einfachen und schnellen IRMS-Methode eindeutiger gelöst werden könnte. Es stand in dieser Arbeit neben dem Elementaranalysator (EA) zur Messung des Kohlenstoff- und Stickstoffisotopenverhältnisses auch eine Pyrolyseeinheit (TC/EA) zur Sauerstoffbestimmung bereit. Diese Geräte erlauben schnelle Analysenzeiten (ca. 10 Minuten) und eine einfache Probenvorbereitung (Einwaage der zermahlenen Probe). Da evtl. eine multivariate Datenanalyse zur Auswertung in Frage kam, musste eine genügend große Anzahl authentischer Proben vermessen werden (mindestens 30 authentische Proben pro Land). Außerdem sollten auch bestimmte Pistazieninhaltsstoffe (z.B. Öl, Eiweiß, Zucker) vermessen werden, da in der Literatur eine Isotopendiskriminierung in den Sekundärstoffwechseln der Pflanzen beschrieben wird, die zu einer Verschärfung der Messwertunterschiede führen könnte.[216,228,293,294] Literaturveröffentlichungen auf dem Gebiet der IRMS bezüglich der Frage nach Pistazien- oder allg. Nussauthentizität konnten zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit nicht gefunden werden. Daher überschneiden sich die Untersuchungen und Ergebnisse teilweise mit der Arbeit von Anderson et al.[7], die nach den Angaben der untersuchten Erntejahre (2000 und 2001) zur gleichen Zeit durchgeführt wurde.

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden zusätzlich von K. Zur (2004)[302] ein Großteil der gewonnen Pistazienöle mittels ^{1}H- and ^{13}C-NMR-Spektroskopie vermessen, um die Frage nach der Herkunft von Pistazien über ihre klimaabhängige Fettsäurezusammensetzung mit dieser Technik zu testen. Mit Hilfe multivariater Statistik konnte hier eine 100 %ige Trennung in die drei Hauptanbaugebiete Iran, USA und Türkei erreicht werden, allerdings dauert die Messung mit dem NMR wesentlich länger als eine IRMS-Messung und ist kostenintensiver.

3.

Allgemeiner Teil

3.1 Pistazien

Die Pistazie (Pistachia vera, „Grüne Mandel“) kommt ursprünglich aus dem Mittleren Osten und wurde bereits vor über 4000 Jahren in Assyrien in Kultur genommen. Sie gehört zur Familie der Anacardiaceae und ist botanisch eine Steinfrucht und damit mit der Cashewnuss und der Mango verwandt. Sie ist sehr einweiß- und fettreich (Energiegehalt: 2405 kJ/100 g) und liefert unter allen Nüssen den höchsten Gehalt an Eisen (7,3 mg/100 g) und Kalium (1020 mg/100 g).[35,96,248,258]

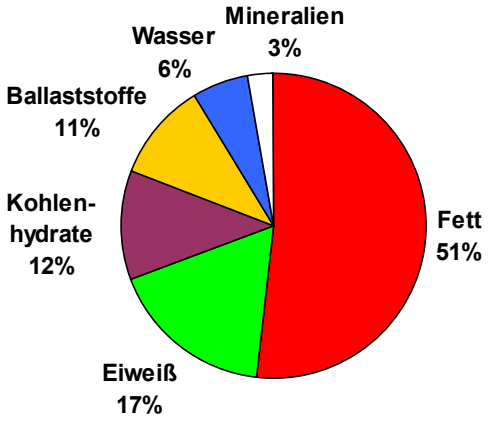


Abbildung 2:
Nährstoffzusammensetzung [%] von Pistazien

Ein Pistazienbaum kann bis zu 10 m hoch und 200-300 Jahre alt werden und kommt in beiden Geschlechtern vor (nur der weibliche trägt die Nüsse). Er wächst sehr langsam und hat wie viele andere Nussbäume eine zweijährige Fruchtfolge (abwechselnd große und kleine Ernten), so dass Spitzenerträge von bis zu 40 kg Früchten (1,8-3,4 t/ha) erst nach ca. 20 Jahren erzielt werden können. Eine adäquate Düngung mit kommerziellen oder organischen Düngern ist außerdem unerlässlich für ein gutes Wachstum und hohe Ernteerträge.[43,96,286]

Pistazien wachsen in traubenähnlichen Gruppen und während des Reifungsprozesses färbt sich die äußere Haut des Fruchtfleisches rosa und die innere Schale wird durch den wachsenden grünen Kern auf natürliche Weise am vorderen Teil gespalten. Sobald sich die äußere Fruchtfleischhülle von der inneren Schale trennt und der grüne Kern in seiner rötlich-violetten Samenschale offen liegt, sind Pistazien erntereif.

In der Farbe des Kerns spiegeln sich hierbei die Sorten- und Qualitätsunterschiede wider: gelbliche Kerne sind von geringer Qualität, grüne von der besten.[96,286] Im traditionellen Hauptanbauland Iran gibt es insgesamt 60 Sorten, davon sind die gängigsten *Momtaz* (klein, aber teuer), *Kalleghuchi* (sehr groß), *Akbari* (länglich), *Badami* (mandelförmig) und *Fandoghi* (rundlich).[95] Sie werden dort meist sonnengetrocknet, ungeröstet und ungesalzen verzehrt, wie es auch im übrigen Orient und Südeuropa üblich ist. Eine wichtige, auch aus dem Iran stammende Sorte, ist die *Kerman*, die fast ausschließlich in Kalifornien angebaut wird. Sie bildet eine besonders große Nuss und eine weitgespaltene Schale.[1,286]

3.1.1 Ernte/Verarbeitung

Die Erntezeit der Pistazien liegt je nach Anbauregion im September/Oktober und dauert nur 3-6 Wochen an. Der Erntezeitpunkt ist sehr wichtig, um eine möglichst große Menge an natürlich gespaltenen („lachenden“) Nüssen zu erzielen, die jedoch noch nicht von selbst zu Boden gefallen sind. Zu Boden gefallene Pistazien würden eine sehr aufwändige Reinigung verursachen, da der grüne Kern durch die natürlich geöffneten Schalen frei zugänglich für Schmutz und Mikroorganismen ist.[1,286]

Pistazien werden entweder maschinell vom Baum geschüttelt und in eine Auffangeinreichung geworfen („tree/trunk-shakers“), ohne den Boden zu berühren (pro Baum weniger als eine Minute erforderlich) oder, vornehmlich im Iran, noch traditionell per Hand vom Baum gepflückt, geklopft oder geschüttelt und in am Boden ausgelegten Netzen oder Matten gesammelt. Danach müssen sie innerhalb von 12 bis 24 Stunden enthülst und getrocknet werden, da andernfalls die Fruchtfleischhülle Feuchtigkeit aufnimmt und sich dadurch die Schalen verfärben.[1,44,79,96,286]

Schälmaschinen („hullers“) befreien die Pistazien von ihrer rosa Fruchtfleischhülle, bevor sie in riesigen Tanks gewaschen und von den an der Oberfläche schwimmenden, leeren Früchte (ca. 1/3 der Ernte) abgetrennt werden. Durch die nachfolgende Trocknung bei relativ niedrigen Temperaturen (60 °C) bis auf 5-7 % Restfeuchtigkeit wird der Pilzwuchs und Insektenbefall vermieden. Das Gewichtsverhältnis zwischen frischen und geschälten, getrockneten Pistazien liegt etwa bei drei zu eins. Anschließend werden die geöffneten von den geschlossenen Pistazien durch eine rotierenden Röhre („needle picker“) getrennt, deren Innenwand mit einer weichen Nadelmatte ausgelegt ist, die nur die geöffneten Pistazien aufnimmt. Die geschlossenen Pistazien können dann separat weiterverarbeitet werden (z.B. maschinelle Öffnung der Schalen oder Entfernung der Schalen zum Verkauf der Kerne). Ein elektronisches Auge sortiert fleckige Pistazien aus, bevor sie nach Größe und letztendlich auch noch einmal per Hand sortiert werden. Durch diesen Sortierungsprozess werden >99 % der defekten Nüsse erkannt, die meistens auch für die Aflatoxinkontamination verantwortlich sind.

Am Ende werden die Pistazien geröstet und gesalzen (häufig erst in den Verbraucherländern), indem sie durch Sprühdüsen mit einer Salzlösung besprüht oder darin gebadet werden. Dann folgt die Röstung für ca. 20 Minuten bei ~170 °C. Kühl und trocken gelagert halten sich Pistazien bis zu zwei Jahre, jedoch verlieren sie schneller als andere Nüsse an Qualität, da sie aufgrund ihres hohen Ölanteils leicht ranzig werden.[1,43,44,95,101]

3.1.2 Klima

Pistazienbäume bevorzugen wüstenähnliche Regionen, denn sie benötigen kühle Winter und lange, heiße, trockene Sommer. Sie können Temperaturen zwischen -25 °C und +45 °C aushalten, kommen mit 250-380 mm Niederschlag aus und sind bezüglich des Bodens sehr anspruchslos. Daher verdrängten Pistazien im Iran wegen zunehmender Wasserknappheit in den fünfziger Jahren Kulturen wie Baumwolle, Gerste und Weizen. Das Hauptanbaugebiet des Irans liegt in der Provinz Kerman und speziell um die Stadt Rafsanjan, wo ein mildes bis trockenes Klima herrscht und der meiste Regen im Februar und März fällt (100 mm jährlicher Niederschlag).[95,96,258,286] Das amerikanische Pistazienanbaugebiet liegt vornehmlich im südlichen San Joaquin Valley (Kalifornien). Auch dort ist das Klima während der Wachstumsperiode heiß und trocken (~ 38 °C) und es fällt praktisch kein Regen zwischen Mai und Oktober. Daher müssen die Pistazienfelder bewässert werden.[43]
Aus den nachfolgend abgebildeten Klimadiagrammen[185] (s. Abbildung 3 und 4) der zentralen Städte der drei Hauptanbauländer Iran, USA und Türkei ist abzulesen, dass die Pistazienanbaugebiete des Irans wesentlich höher liegen (>1000 m) und trockener sind als die der Türkei und vor allem der USA. Die Stadt Fresno im „California Central Valley“ liegt fast auf Meeresspiegelhöhe. Im türkischen Pistazienanbaugebiet um die Stadt Urfa herum fällt dagegen der meiste Regen und es werden mit 18 °C recht hohe Durchschnittstemperaturen erreicht.

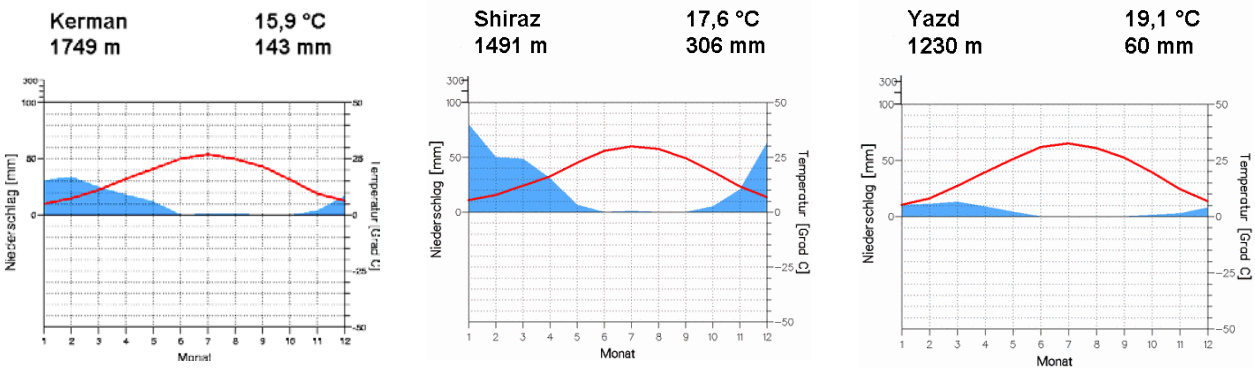


Abbildung 3: Klimadiagramme der iranischen Städte Kerman, Shiraz und Yazd

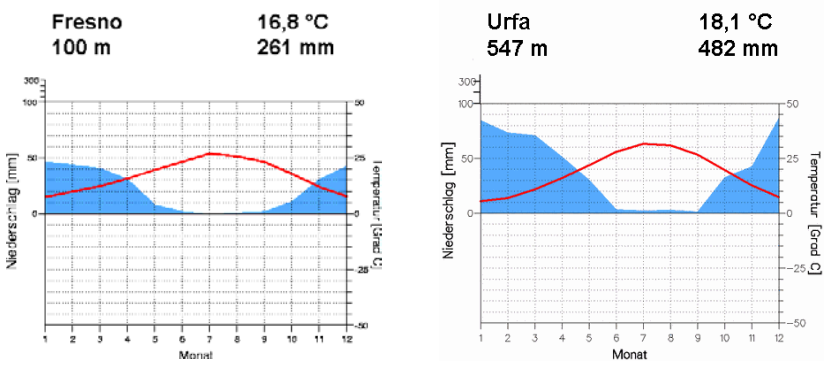


Abbildung 4: Klimadiagramme der amerikanischen Stadt Fresno (California Central Valley) und der türkischen Stadt Urfa

3.1.3 Wirtschaft

Wild wachsend sind Pistazien von Syrien bis Irak, vom Nordost-Iran bis Nord-Afghanistan und sogar in Indien anzutreffen. Gewerbsmäßig kultiviert werden sie dagegen vor allem im Iran, den USA (Kalifornien), der Türkei, Syrien, Griechenland (Ägina), Italien (Sizilien) und China. Die Weltproduktion an Pistazien aus dem Jahr 2003[286] ist in Abbildung 5 als Kreisdiagramm prozentual dargestellt.

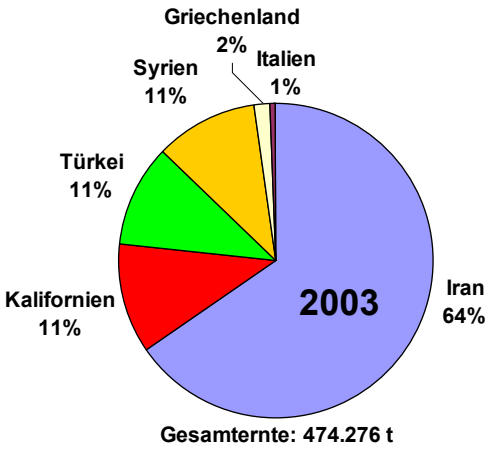


Abbildung 5: Pistazienweltproduktion 2003

Der Iran ist traditionsgemäß mit über 60 % Weltmarktanteil das mit Abstand größte Erzeugerland von Pistazien und auch der mit Abstand weltgrößte Exporteur (s. Abbildung 6[261]). Pistazien stellen dort nach Erdöl und Perserteppichen das drittwichtigste Exportgut dar.

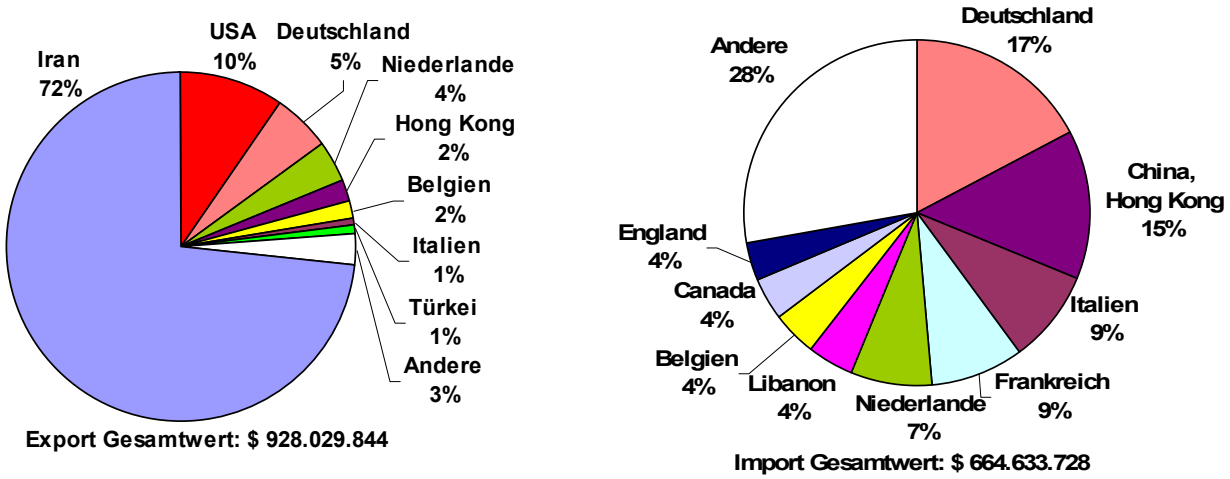


Abbildung 6: Hauptexporteure (links) und -importeure (rechts) von Pistazien 2003

Das Hauptanbaugebiet des Irans liegt bei der Stadt Rafsanjan in der Provinz Kerman, die sich in den klimatisch und geologisch besonders günstig liegenden trockenen Hochebene (1200-1600 m) im Südosten des Landes befindet, daneben Yazd und Shiraz (s. Abbildung 7[261]). 95 % der iranischen Pistazienproduktion kommen aus dieser Region, dies entspricht ungefähr 50 % der weltweit erzeugen Gesamternte. Die Hauptabnehmer iranischer Pistazien waren im Jahr 2003 die Arabischen Emirate, Deutschland und Hong Kong (s. Abbildung 7[261]).[95,215,258]

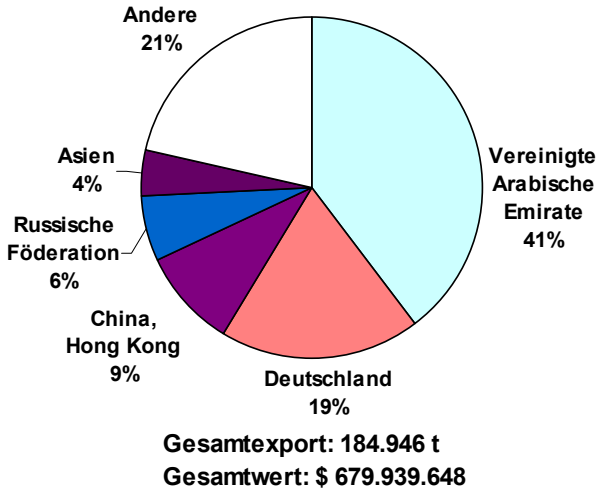


Abbildung 7: Irankarte und Hauptexportländer für iranische Pistazien 2003

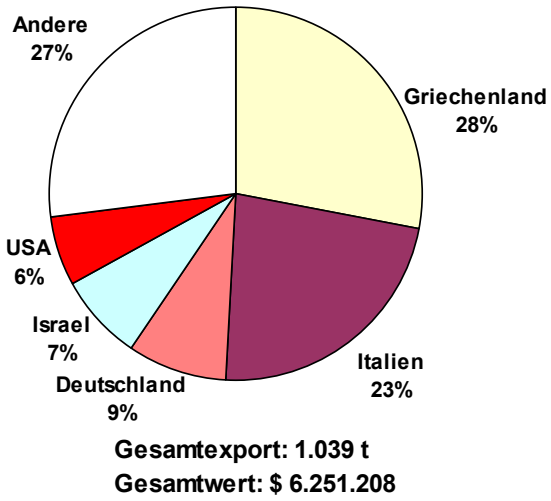
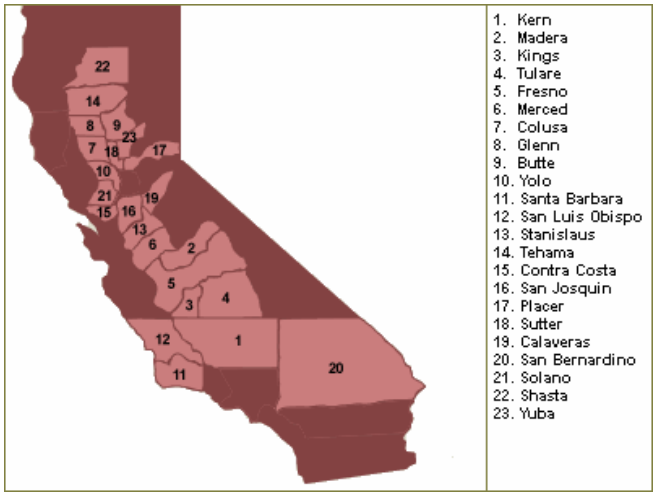
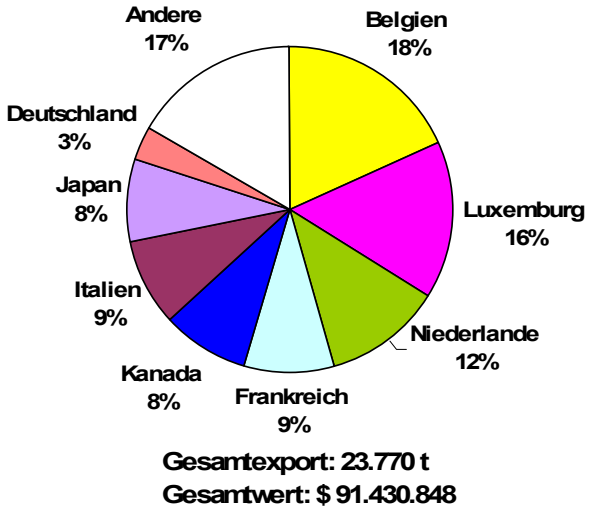


Abbildung 8:
Türkeikarte und Hauptexportländer für türkische Pistazien 2003

In der Türkei hat der Pistazienanbau auch eine große Tradition, hier begann der kommerzielle Anbau im 18. Jahrhundert. Sie ist das drittgrößte Erzeugerland und das Hauptanbaugebiet liegt hier in Südostanatolien, an der Grenze zu Syrien. Die Pistazie wird nach ihrem berühmten Herkunftsgebiet, der Provinz Gaziantep, auch „Antep-Nuss“ genannt. Die Hauptabnehmer für türkische Pistazien waren 2003 Griechenland, Italien, Deutschland, Israel und die USA (s. Abbildung 8[261]).

Türkische Pistazien sind im Allgemeinen klein, nur wenig geöffnet und haben eine dunkle Schale und stehen damit ganz im Gegensatz zu den amerikanischen Ansprüchen. Viele Kenner schätzen die türkische Pistazie jedoch wegen ihres besonderen Aromas. Die dunkle Farbe entsteht durch die Lagerung „in Rot“, d.h. die getrocknete Fruchthülle wird nicht binnen 24 Stunden nach der Ernte entfernt, sondern bis zur Verarbeitung an der Schale belassen.[215]





Pistazien sind in Amerika erst seit 1976 (erste Ernteerfolge) für kommerzielle Zwecke gezüchtet worden. Seitdem erhöhen sich die Anbauflächen und Erträge stetig, so dass die USA heute nach dem Iran der Hauptproduzent von Pistazien ist. 98 % der amerikanischen Pistazien werden in Kalifornien (Central Valley) auf ca. 356 km² produziert, wobei die Hauptproduktionsstätte aufgrund des wüstenähnlichen Klimas im San Joaquin Valley liegt; kleine Anbauflächen finden sich aber auch in Arizona, New Mexico und West-Texas. 50 % der kalifornischen Ernte wurde 2003 exportiert, die Hauptabnehmer waren die EU, Kanada und Japan (s. Abbildung 9[261]).[42,215]

Abbildung 9:
Kalifornienkarte und Hauptexportländer für amerikanische Pistazien 2003

In Abbildung 6 ist außerdem zu erkennen, dass Deutschland als einer der größten Pistazienhändler der Welt fungiert. Aus den Im- und Exportdaten Deutschlands von 2003 (s. Abbildung 10[261]) ist zu ersehen, dass große Mengen Pistazien vornehmlich aus dem Iran (71 %) und den USA (25 %) nach Deutschland importiert wurden. Ca. die Hälfte davon wurde im gleichen Jahr wieder weiter in andere europäische Länder exportiert.

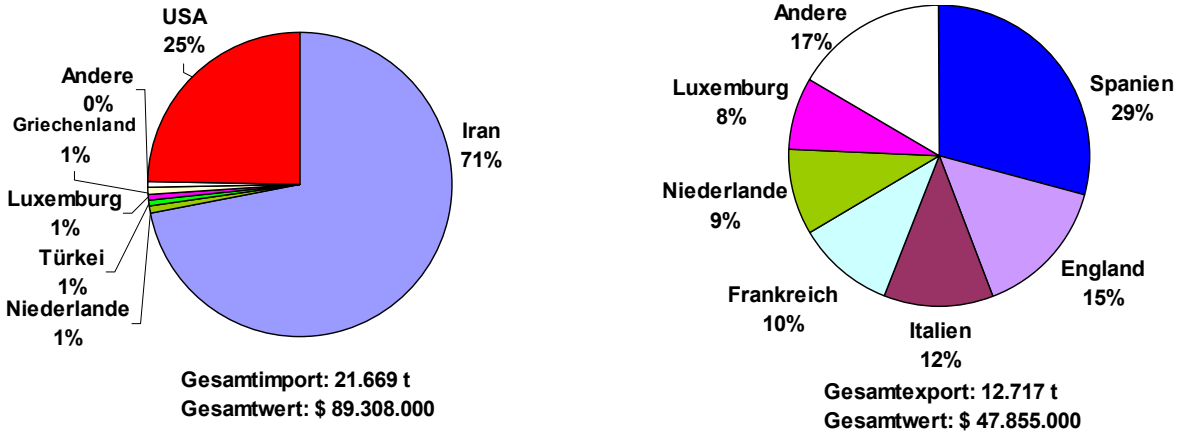


Abbildung 10: Hauptimport- (links) und Exportländer (rechts) Deutschlands 2003

3.1.4 Aflatoxinproblematik

Die Schimmelpilzarten *Aspergillus flavus* und *parasiticus* sind auf Produkten aus warmen, feuchten Regionen zu finden, wie z.B. Pistazien, Getreide und anderen Schalen- und Trockenfrüchten. Sie sind potentiell sehr gefährlich, da sie als Stoffwechselprodukte die hochgiftigen und mutagen wirkenden Aflatoxine bilden können. Die Ursache für eine hohe Schimmelpilz- und Aflatoxinbelastung bei Pistazien liegt meist in einer unsorgfältigen Ernte, einer zu langsamen Trocknung oder einer zu feuchten oder zu warmen Lagerung. Die günstigsten Wachstumsbedingungen für Aflatoxinbildner sind Temperaturen zwischen 25 und 40 °C, daher erfolgt die Kontamination der Lebensmittel mit Aflatoxinen meist in den tropischen und subtropischen Anbauländern und weniger im europäischen Raum mit seinen gemäßigten Klimazonen.[50,192] Um die Bildung von Aflatoxinen zu vermeiden oder vorzubeugen, sollten u.a. beschädigte und fleckige Nüsse aussortiert, der Wassergehalt auf ca. 6 % während der Lagerung reduziert und Stahlsilos mit hoher Luftzirkulation als Lagerbehältnis verwendet werden.[1,43]

Aflatoxine gehören zu den stärksten bisher bekannten Leberkanzerogenen und das Aflatoxin B_1 (s. Abb. 11) gilt als einer der stärksten krebsauslösenden Naturstoffe überhaupt. Die Pilzgifte sind unsichtbar und gehen durch Erhitzen/Rösten oder andere Verarbeitungsschritte nicht oder nur geringfügig verloren. Auch durch Bestrahlung werden Aflatoxine weder eliminiert noch verringert.[50,192]

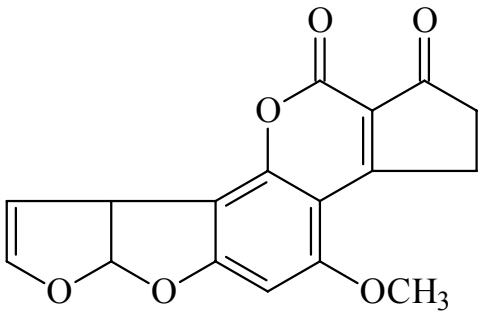


Abbildung 11: Strukturformel Aflatoxin B_1

Schimmelpilze befallen nur einzelne Nüsse und sind deswegen in einer Pistazienpartie nicht homogen verteilt (Nesterbildung). Daher spielt die richtige Probennahme eine große Rolle, um eine möglichst verlässliche Aussage über den Grad einer Aflatoxinkontamination treffen zu können. Aus diesem Grund sind von der EU-Kommission für Lebensmittel detaillierte Probenahmeverfahren und -mengen (EG-Richtlinie 98/53/EG) festgelegt worden. Sie sind als repräsentativ für eine betreffende Partie anzusehen, jedoch kann dadurch trotzdem nicht mit hundertprozentiger Sicherheit gewährleistet werden, dass in einer Partie die Aflatoxingehalte unterhalb der zulässigen Höchstgrenze liegen.[50,130]

Die Höchstgrenzen für Mykotoxine sind von der Europäischen Gemeinschaft in der Kontaminanten-Höchstgehaltverordnung (VO (EG) 466/2001) für bestimmte Lebensmittel (Schalenfrüchte, Trockenfrüchte, Getreide, Gewürze) festgelegt worden, während in der Bundesrepublik

Deutschland die Mykotoxin-Höchstmengenverordnung (MHmV) die Grenzwerte für alle Lebensmittel regelt[50] (Aflatoxin B_1: 2 µg/kg, Summe Aflatoxine B_1, B_2, G_1 und G_2: 4 µg/kg).

Zu hohen Aflatoxinbelastungen kommt es in Ländern wie dem Iran oder der Türkei, in denen häufig noch traditionelle Erntemethoden angewendet werden. Die Pistazien werden dort von den Bäumen geschüttelt und liegen danach längere Zeit in Netzen oder Matten auf dem Boden, d.h. frei zugänglich für Schmutz und Mikroorganismen. Sie werden dann zwar gewaschen, getrocknet und sortiert, aber teilweise lagern die Nüsse noch monatelang in schlecht belüfteten Kühlhäusern, bevor sie verkauft werden.[130]

Pistazien aus dem Iran fielen daher wegen erhöhter Gehalte an Aflatoxinen in der Vergangenheit immer wieder auf und die EU reagierte darauf mit der noch heute gültige Pistazien-Verordnung (s. auch Einleitung), die eine strenge Kontrolle der Pistazien vor der Einfuhr in ein EU-Mitgliedsland verlangt (Vorführpflicht §55 Abs. 1 Nr. 3 LFBG)[39]. So müssen Importeure Unbedenklichkeitsbescheinigungen (Gutachten von amtlich zugelassenen Laboratorien) aus dem Erzeugerland Iran und dem EU-Importland vorweisen, um Pistazien in der EU in den Handel bringen zu dürfen. Dies bedeutet, dass von jeder Partie iranischer Pistazien eine Probe an den gesetzlich festgelegten Eingangszollstellen (2004/429/EG) genommen wird. Im Jahr 2003 wurden in Schleswig-Holstein immer noch 34 % (359 Proben) der iranischen Pistazienpartien aufgrund zu hoher Aflatoxinwerte abgelehnt, wobei sich vor allem Pistazien mit Schale als kritisch erwiesen. Durch die verstärkten Untersuchungen auffälliger Erzeugnisse und Importeure musste das für die amtlichen Untersuchungen in Hamburg zuständige Institut für Hygiene und Umwelt jedoch beobachten, dass 2004 wesentlich weniger iranische Pistazien über Hamburg eingeführt wurden.[214,252]

Da es auch bei Pistazien aus der Türkei immer wieder zu Überschreitungen der Mykotoxinhöchstwerte kam, erließ die EU-Kommission im Februar 2002 eine gleichartige Sondervorschrift (2002/80/EG) für türkische Pistazien.[50] Amerikanische Pistazien unterliegen dagegen keiner gesetzlichen Vorführpflicht, da in den USA rein maschinell geerntet, getrocknet und sortiert wird, was zu einer besseren Qualität hinsichtlich der Aflatoxinbelastung und dadurch auch zu einem etwas höheren Weltmarktpreis führt (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Exportmengen und Handelswerte von Pistazien aus den drei Hauptanbauländern

2003	Exportmenge	Handelswert	Preis pro kg
Iran	184.946.224 kg	$ 679.939.648	3,66 $/kg
USA	23.769.662 kg	$ 91.430.848	3,85 $/kg
Türkei	1.039.321 kg	$ 6.251.208	6,01 $/kg

Daten stammen von der Website www.unstats.un.org[261]

3.2 Stabilisotope

Die meisten Bioelemente kommen in der Natur als Gemische mehrerer stabiler Isotope vor; dabei handelt es sich um Atome der gleichen Kernladungszahl, aber verschiedener Neutronenzahl. Moleküle, die aus unterschiedlichen Isotopen aufgebaut sind, werden als Isotopomere bezeichnet. In Tabelle 2 sind die wichtigsten stabilen Isotope der Bioelemente mit ihren relativen natürlichen Häufigkeiten aufgeführt. Es ist darin zu erkennen, dass im Allgemeinen bei weitem der Anteil des "leichten" Hauptisotops überwiegt (>99 Atom-%).[40,159]

Tabelle 2: Relative natürliche Häufigkeiten der stabilen Isotope der Bioelemente

Element	Ordnungszahl im PSE	stabile Isotope	relative natürliche Häufigkeit [Atom-%]
Wasserstoff	1	^{1}H	99,985
		^{2}H	0,015
Kohlenstoff	6	^{12}C	98,892
		^{13}C	1,108
Stickstoff	7	^{14}N	99,634
		^{15}N	0,366
Sauerstoff	8	^{16}O	99,759
		^{17}O	0,037
		^{18}O	0,204

Obwohl die Isotope eines Elements die gleiche Elektronenkonfiguration besitzen, bedingen die geringfügigen Unterschiede in Kernmasse und -symmetrie ein unterschiedliches Verhalten bei physikalischen und chemischen Prozessen. Dies wird als „Isotopeneffekt" bezeichnet. Durch ihre höhere Bindungsenergie reagieren z.B. Moleküle mit "schwereren Isotopen" im Allgemeinen langsamer und reichern sich bei chemischen Umsetzungen im Ausgangspool an (Diskriminierung). Die Auswirkungen dieses "kinetischer Isotopeneffekts" sind umso stärker, je größer die relative Massendifferenz zweier Isotope ist, d.h. bei den Isotopen des Wasserstoffs ist der kinetische Isotopeneffekt am stärksten ausgeprägt.[40,159,159,279]

Die physikalischen Eigenschaften von Molekülen wie chromatografisches Verhalten, Molvolumen oder Dampfdruck werden durch Isotope ebenfalls beeinflusst: Bei der Destillation verbleiben die schwereren Moleküle länger in der flüssigen Phase[93], bei der HPLC an Normalphasen (z.B. Kieselgel) lösen sich die Kohlenstoffisotopomere mit höheren Massenzahlen langsamer von der stationären Phase, während sie auf reversed-phase Säulen sowohl bei der HPLC als auch

bei der GC schneller eluieren.[28,106] Dieses Verhalten wird als "thermodynamischer Isotopeneffekt" bezeichnet.[40,279]

Kinetische und thermodynamische Isotopeneffekte finden auch bei der Biosynthese von Molekülen in Pflanzen und Tieren statt, so dass in der Natur nicht die mittleren Isotopenverteilungen der Bioelemente (s. Tabelle 2) sondern unterschiedliche Isotopenverhältnisse vorkommen. Derzeit sind schon viele biochemische Umsetzungen in der Natur aufgedeckt worden, bei denen eine Fraktionierung der stabilen Isotope der Bioelemente stattfindet. Dies wird in den nachfolgenden Kapiteln 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.3 näher ausgeführt.

Für die Angabe des Isotopenverhältnisses einer Probe wird der sog. *delta(δ)-Wert* in Promille (‰) verwendet. Der δ-Wert gibt an, wie stark die Isotopenzusammensetzung einer Probe von der eines international festgelegten Standards abweicht. Das Verhältnis zwischen "schwerem" zu "leichtem" Isotop in einer Probe kann mit einem IRMS-Gerät sehr genau gemessen werden. Nebenstehend ist die Formel für die Berechnung des δ-Werts dargestellt.[159,294]

$$\delta X = [(R_{Probe} / R_{Standard}) - 1] \times 10^3$$

mit X = schweres Isotop (^{13}C, ^{15}N, ^{18}O etc.)

R = Verhältnis schweres Isotop/Hauptisotop (z.B. $^{13}C/^{12}C$, $^{15}N/^{14}N$, $^{18}O/^{16}O$ etc.)

Aus der Formel für den δ-Wert folgt, dass der Anstieg des δ-Werts auch einen Anstieg des Gehalts an schwererem Isotop bedeutet und folglich eine reziproke Abnahme des leichteren (Haupt-) Isotops.[199] Die internationalen Bezugsstandards für die einzelnen Bioelemente sind in Tabelle 3 aufgeführt. Diese gibt zusätzlich die am häufigsten verwendeten Messgase und das in der Regel gemessene Stabilisotopenverhältnis wieder. Die Standards sind fast nur von der internationalen Atomenergiebehörde (IAEA) in Wien zu beziehen, wegen Knappheit zum Teil sogar nur in bestimmten Zeitabständen.

Tabelle 3: Internationalen Bezugsstandards, typische Messgase und Isotopenverhältnisse der Bioelemente für die IRMS Messung

Element	Messgas	Verhältnis	internationaler Bezugsstandard	Abk.
Wasserstoff	H_2	D/H	**V**ienna **S**tandard **M**ean **O**cean **W**ater	VSMOW
Kohlenstoff	CO_2	$^{13}C/^{12}C$	**P**ee **D**ee **B**elemnite* (fossiles $CaCO_3$)	PDB
Stickstoff	N_2	$^{15}N/^{14}N$	Stickstoffgas der Luft	Air
Sauerstoff	CO	$^{18}O/^{16}O$	**V**ienna **S**tandard **M**ean **O**cean **W**ater	VSMOW
Schwefel	SO_2	$^{34}S/^{32}S$	**C**añon **D**iablo **T**roilite (FeS-Meteorit)	CDT

* Calcit-Fossil aus der PeeDee Formation in South Carolina

3.2.1 Kohlenstoff

Die primäre Quelle des Kohlenstoffs in biologischen Systemen ist das atmosphärische CO_2, das aufgrund eines thermodynamischen Isotopeneffekts gegenüber dem gelöstem HCO_3^- der Ozeane (~0 ‰) um ca. 7 ‰ an ^{13}C abgereichert ist.[152] Organisch gebundener Kohlenstoff weist wiederum ein Defizit an ^{13}C gegenüber dem CO_2 der Luft auf.
Kohlenstoff wird aus dem CO_2 der Luft durch die Photosynthese der Pflanzen organisch gebunden. Da $^{13}CO_2$ langsamer reagiert als $^{12}CO_2$, tritt bei der primären CO_2-Bindung ein erheblicher Isotopeneffekt auf, wobei das schwerere ^{13}C diskriminiert wird. Die dadurch auftretende ^{13}C-Abreicherung in organisch gebundenem Kohlenstoff ist jedoch nicht in jeder Pflanze gleich, sondern das Ausmaß hängt von deren jeweiligen Photosynthesetyp ab. Es werden nach den Photosynthesewegen drei Pflanzengruppen unterschieden: C_3-, C_4- und CAM- (**C**rassulacean **A**cid **M**etabolism) Pflanzen.[131,193,246] Abbildung 12 gibt einen Überblick über die $\delta^{13}C$-Verteilung des Kohlenstoffs in der Natur.

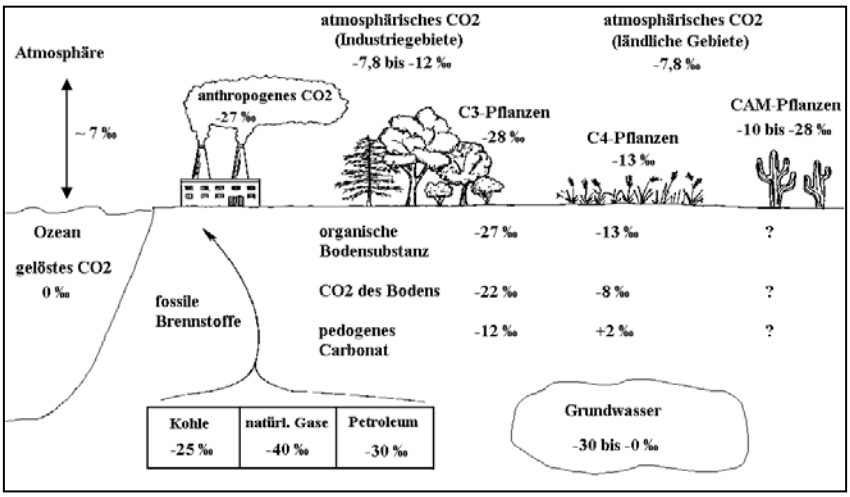


Abbildung 12:
$\delta^{13}C$-Verteilung des Kohlenstoffs in der Natur

Originalgrafik verändert nach einer Präsentation von Oeßelmann et al.[188,199]

Die Gruppe der C_3-Pflanzen bindet in den Chloroplasten atmosphärisches CO_2 im sog. Calvin-Cyclus durch die Ribulosediphosphat(RuBP)-Carboxylase zu dem C_3-Primärprodukt 3-Phosphoglycerinsäure.[45] Die Mehrzahl der Kulturpflanzen wie die europäischen Getreidearten, Reis, Zuckerrüben, Kartoffeln, Maniok, Weintrauben, Zitrusfrüchte und Sojabohnen sind C3-Pflanzen, sowie viele andere überwiegend in der gemäßigten Klimazone wachsenden Pflanzen. Auch die in dieser Arbeit untersuchten Pistazien gehören der C_3-Pflanzengattung an. Der $\delta^{13}C$-Wert dieser Pflanzen liegt zwischen -32 und -24 ‰ („leichte Pflanzen“).[294]

C_4-Pflanzen wachsen dagegen an wasserarmen, heißen Standorten und nehmen zur Vermeidung von Transpirationsverlusten das CO_2 vorwiegend nachts auf. Mit Hilfe der Phosphoenolpyruvat(PEP)-Carboxylase wird das CO_2 im sog. Hatch-Slack-Zyklus[123] zu dem C_4-Primärprodukt Oxalessigsäure in den Mesophyllzellen fixiert und als stabileres Malat zwischen-

gespeichert. Durch Dehydrierung und Carboxylierung wird tagsüber in den Gefäßbündelscheidezellen aus dem Malat wieder CO_2 freigesetzt und die freigewordene 3-Phosphoglycerinsäure dem Calvin-Zyklus zum Kohlenhydrataufbau zugeführt. Da die PEP-Carboxylase eine hohe Affinität zu ihrem Substrat (HCO_3^-) zeigt, wird praktisch das gesamte aufgenommene CO_2 gebunden und dadurch aufkonzentriert, während die Photosynthese bei den C_3-Pflanzen ausschließlich auf Diffusion des atmosphärischen CO_2 in die Photosynthesezellen beruht (s. Abbildung 13).

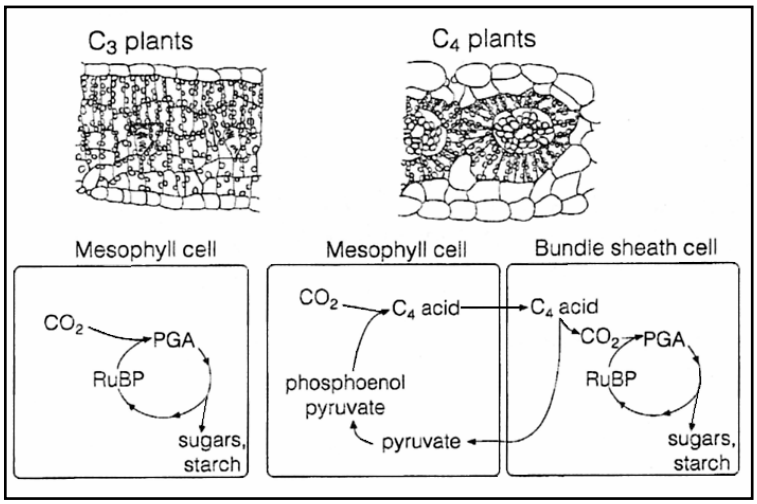


Abbildung 13:
Querschnitte durch Blätter von C_3- und C_4-Pflanzen mit schematischer Darstellung der relevanten Schritte bei den unterschiedlichen Photosynthesewegen

Originalgrafik aus der Veröffentlichung von J.R. Ehleringer[75]

Die Fixierung des CO_2 aus der Luft mittels der PEP-Carboxylase ist somit der kürzere und schnellere Weg verglichen mit dem Calvin-Zyklus und verläuft mit einem geringeren Isotopeneffekt als bei der RuBP-Carboxylase. Daher weist die Biomasse der C_4-Pflanzen $\delta^{13}C$-Werte zwischen -16 und -10 ‰ auf („schwere Pflanzen“). Zu dieser Gruppe gehören Kulturpflanzen wie Hirse, Mais, Zuckerrohr und Sorghum, sowie viele tropische Gräser.
CAM-Pflanzen können das atmosphärische CO_2 je nach äußeren Gegebenheiten sowohl auf dem C_3- als auch auf dem C_4-Weg fixieren. Daher haben CAM-Pflanzen wie z.B. Ananas und Vanille $\delta^{13}C$-Werte zwischen -30 und -12 ‰.[40,75,85,131,279,294]

Der $\delta^{13}C$-Wert gilt heute als zuverlässigstes Indiz für die Zuordnung der Arten zum C_3- oder C_4-Pflanzentyp, da er sich als streng korreliert mit dem Photosynthesetypus erwiesen hat.[189] So kann z.B. die Herkunft von Saccharose ermittelt werden, da die Zuckerrübe eine C_3-Pflanze ist und Rohrzucker sowie Maishydrolysate zu den C_4-Pflanzen gehören.[294] Die Messung des $\delta^{13}C$-Werts in Lebensmitteln (häufig auch in Kombination mit anderen Elementen) hat sich im Zusammenhang mit Verfälschungsfragen vor allem bei Fruchtsäften[34,66,112,116,143-145], Honigen[218,288-292,301] und alkoholischen Getränken (Zuckergrundlage des Gärungsalkohols[147,195,208,220,222,275] oder Kohlendioxids[23,71]) bewährt, aber auch bei Glycerol[41,99,100,274], Essig[168,210] und Öl.[153,249,250,295]
Auch die Unterscheidung natürlicher Substanzen von synthetischen Analoga ist mit dem $\delta^{13}C$-Wert möglich. Die meisten synthetischen Austauschstoffe werden nämlich aus fossilen Kohlen-

stoffquellen (Erdöl, Kohle) hergestellt, die mit δ^{13}C-Werte zwischen -22 und -35 ‰ grundsätzlich verschieden von C_4-Pflanzen sind.[296] Es wurden hier vor allem Arbeiten auf dem Gebiet der Aromen[20,27,29,46,126,148,278] geleistet, besonders zur Authentizitätsprüfung von natürlichem Vanillin, das wesentlich teurer ist als industriell synthetisiertes.[33,135,151,170,171,225] Auch die Zugabe von synthetisch hergestellten Fruchtsäuren zu Fruchtsäften[67,105] oder die Unterscheidung von synthetischem Essig und Gärungsessig[210,226] sind möglich.

Neben den großen Unterschieden aufgrund des Photosynthesetypus kommt es auch innerhalb der einzelnen Teile und Substanzklassen einer Pflanze zu kleinen, aber signifikanten Unterschieden in den δ^{13}C-Werten. Diese hängen von einer Reihe exogener und endogener Faktoren ab, von denen der Sekundärmetabolismus den größten Einfluss hat.

Die höchsten ^{13}C-Gehalte in Pflanzenmaterial finden sich in Kohlenhydraten (Zucker, Cellulose, Stärke) und organischen Säuren, den Primärprodukten der Photosynthese. Lipide und Phenole sind demgegenüber bis zu 8 ‰ abgereichert.[2,58,182,194,287] Aminosäuren und Proteine weisen wiederum δ^{13}C-Werte zwischen denen der Zucker und Lipide auf und sind um ca. 2-3 ‰ gegenüber den Kohlenhydraten erniedrigt.[40,190,216,231] Abbildung 14 zeigt die Unterschiede des δ^{13}C-Werts in den verschiedenen Kohlenstoffpools und innerhalb der verschiedenen Substanzklassen der Pflanzen.

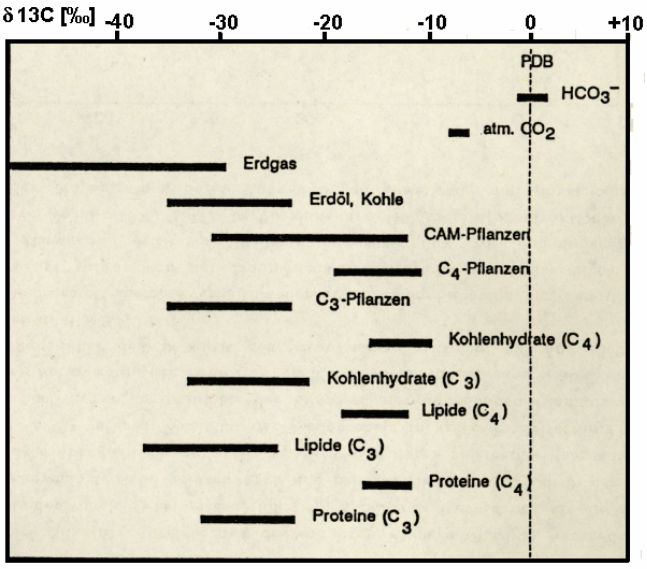


Abbildung 14:
δ^{13}C-Werte verschiedener Kohlenstoffpools

Originalgrafik aus der Veröffentlichung von Butzenlechner[40]

Die Ursache für diese generellen Muster (intermolekulare Korrelation) liegt in Kohlenstoff-Isotopenfraktionierungen bei Schlüsselreaktionen im Verlauf der Biosynthesen und Verzweigungen im Stoffwechsel. So ist z.B. ein großer kinetischer ^{13}C-Isotopeneffekt bei der Pyruvat-Decarboxylase-Reaktion[58] und der Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion[182] zu beobachten, den einleitenden Schritten zur Biosynthese von Lipiden und einigen Aminosäuren aus Kohlenhydraten. Durch die bevorzugte Übertragung von ^{12}C-haltigen Gruppen durch Enzyme sind die aus Acetylresten aufgebauten Sekundärmetabolite gegenüber den primären an ^{13}C verarmt. Dies erklärt auch die Beobachtung mehrerer Autoren[237], dass der Gesamt-δ^{13}C-Wert einer Pflanze einer zeitlichen Änderung über deren Entwicklungszeitraum unterliegt: Nach der Wachstums-

phase werden in verstärktem Maße Sekundärmetabolite (niedrigere δ^{13}C-Werte) synthetisiert, während gegen deren Ende Reservekohlenhydrate (Primärmetabolite = höhere δ^{13}C-Werte) eingelagert werden.[236]
Weitere Diskriminierungen des Kohlenstoff-Isotopenverhältnisses, die zu definierten Mustern in bestimmten Substanzklassen beitragen, werden durch die Aldolase- und Transketolase-Reaktion sowie enzymkatalysierten Esterkondensationen eingebracht und sind vor allem auch in Sekundärmetaboliten des Shikimisäurewegs (z.B. Lignin, Aromaten, Flavonoide) zu finden. Die Stärke der Abreicherung hängt hier davon ab, wie weit die betrachteten Sekundärstoffe im biologischen Kreislauf von den Primärsubstraten entfernt liegen.[104,110,231,260] Die konstanten Differenzen zwischen den verschiedenen Fraktionen einer Pflanze, wie z.B. Zucker zu Lipiden, erlauben zudem eine interne Standardisierung.[34,143,145,219,230,291] So können z.B. einem Lebensmittel hinzugefügte Bestandteile leicht erkannt werden, da diese das $^{13}C/^{12}C$-Verhältnis von bestimmten Fraktionen zueinander verändern.[216,294]

Durch positionelle δ^{13}C-Bestimmungen mittels IRMS konnte außerdem nachgewiesen werden, dass auch die ^{13}C-Verteilung in einzelnen Molekülen nicht statistisch ist, sondern An- und Abreicherungen in bestimmten Positionen auftreten (intramolekulare Isotopenmuster).[229] Die Fruktose-1,6-Bisphosphataldolase bewirkt z.B. eine ^{13}C-Anreicherung in den Positionen C-3 und C-4 des Primärprodukts Glucose,[111,217,227] was sich natürlich auch in den Folgeprodukten bemerkbar macht, so z.B. in Ethanol, organischen Säuren, funktionellen Gruppen an Aromaten, sowie Pyruvat, dem Ausgangsstoff vieler sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe. Auch die Isotopeneffekte bestimmter Schlüsselreaktionen (Enzymreaktionen) führen zu ganz spezifischen Verteilungsmustern in den Produkten. So ist z.B. in der Carboxylgruppe von Acetyl-CoA eine starke ^{13}C-Abreicherung zu finden (und damit auch in den daraus synthetisierten Fettsäuren), genauso wie in den Methoxylgruppen von Pektin und Lignin (δ-Werte bis zu -77 ‰).[103,155,159,216,294]

Die Überlagerung der bisher beschriebenen endogenen Faktoren erklärt weitestgehend die Variationsbreite der natürlich vorkommenden δ^{13}C-Werte. Dazu kommen jedoch auch noch exogene (ökologische) Faktoren, die zu kleinen, aber trotzdem signifikanten, regionalen Unterschiede im $^{13}C/^{12}C$-Verhältnis der Pflanzen führen können.
Geringe Schwankungen des δ^{13}C-Werts pflanzlichen Materials werden z.B. durch unterschiedliche Isotopengehalte des atmosphärischen CO_2's verursacht. In Gebieten mit geringer industrieller Ansiedlung besitzt atmosphärisches CO_2 δ^{13}C-Werte zwischen -6,4 und -7,0 ‰, während dieser Wert in Gebieten mit hoher industrieller Ansiedlung aufgrund der Verbrennung von Kohle und Erdöl negativer ist (s. Abb. 14).[85,190,196,294]

Das vorherrschende Klima (Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Niederschlag) an einem Ort ist ein weiterer exogener Faktor, der zusätzlich auf das Isotopenverhältnis (2-3 ‰) einwirken kann, und somit eine standortspezifische Größe darstellt. Die theoretische Basis, die den Umwelteinfluss auf das $\delta^{13}C$-Verhältnis von C_3-Pflanzen beschreibt, wurde bereits in den 80er Jahren von mehreren Autoren[80,83,190,191] untersucht und sogar in Form einer Gleichung ausgedrückt. Danach erniedrigt sich der $\delta^{13}C$-Wert der Pflanze, wenn der partielle Druck des interzellulären CO_2's erhöht wird, wie z.B. durch Umwelteinflüsse, die die Leitfähigkeit der Spaltöffnungen erhöhen und/oder die Carboxylierungsrate senken. Eine derartige Beeinflussung der Spaltöffnungen und der Carboxylierungsrate kann durch all diejenigen Faktoren ausgelöst werden, die mit der Photosynthese assoziiert sind: Lichtintensität, Nährstoffe, Temperatur und Wasserverfügbarkeit.
Die Temperatur beeinflusst z.B. alle thermodynamisch bedingten Isotopeneffekte, jedoch konnte hier bisher kein einheitliches Bild in der Diskriminierungsrichtung festgestellt werden. Neuere Untersuchungen (vor allem an Baumringen) zeigen häufig eine positive Korrelation zwischen dem $\delta^{13}C$-Wert und der Temperatur.[124,131,175,247,266]
Eine dagegen klare Diskriminierungsrichtung kann beobachtet werden, wenn Pflanzen verminderter Wasserverfügbarkeit (im Extremfall Dürrestress) ausgesetzt sind. In diesem Fall schließen Pflanzen ihre Spaltöffnungen und die CO_2-Konzentration in Blatt und somit auch die Diskriminierungsrate nehmen ab, so dass wesentlich höhere $\delta^{13}C$-Werte (weniger negativ) in solchen Pflanzen zu finden sind. Einen gleichen Effekt löst ein erhöhter Salzgehalt oder Umweltverschmutzung (Ozon, SO_2) aus.[10,80,83,124,213] Im Umkehrschluss konnte auch von mehreren Autoren[175,184,207] nachgewiesen werden, dass das $^{13}C/^{12}C$-Verhältnis signifikant vom regionalen Niederschlag abhängt: vermehrter Regen bewirkt ein Absinken des $\delta^{13}C$-Werts in Pflanzen.

Desgleichen wurde auch eine starke Korrelation zwischen dem $\delta^{13}C$-Wert von C_3-Pflanzen und der Höhe über dem Meeresspiegel nachgewiesen. Messungen von mehreren Wissenschaftsgruppen[158,175] ergaben, dass sich mit zunehmender Höhe die Carboxylierungseffizienz der Pflanzen erhöht (Blätter von Bergpflanzen müssen die Photosynthese bei niedrigeren Partialdrücken betreiben), was wiederum in erhöhten $\delta^{13}C$-Werten resultiert. Außerdem nehmen die Blattdicke und der Stickstoffgehalt mit steigender Höhe zu, was außerdem zu einer Erhöhung der Photosynthesekapazität beiträgt. Zudem konnte durch groß angelegte Versuche gezeigt werden, dass das $^{13}C/^{12}C$-Verhältnis auch vom Breitengrad abhängt. Vom Äquator zu den Polen nimmt die Diskriminierung gegenüber ^{13}C ab, d.h. der δ-Wert wird positiver.[158,175]
Durch die Vielzahl der auf das $^{13}C/^{12}C$-Verhältnis einwirkenden exogenen Faktoren kann die resultierende Diskriminierungsrichtung nicht vorhergesagt werden, daher sind gegensätzliche Messergebnisse nicht überraschend. Das Ausmaß eines umweltbedingten Faktors hängt davon ab, inwieweit dieser die Photosynthese beeinflusst. Wirkt er sowohl auf die Spaltöffnungen als auch auf die Carboxylierung, kann dies einen gegensätzlichen Effekt auf $\delta^{13}C$ ausüben.

Die Schwankungsbreiten der einzelnen hier beschriebenen endogenen und exogenen Faktoren, die auf das $\delta^{13}C$-Verhältnis von C_3-Pflanzen wirken, sind von T.H.E. Heaton (1999)[124] in seinem Artikel zusammengefasst worden (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Ausmaß und Faktoren der Unterschiede im $\delta^{13}C$-Wert von C3-Pflanzen

Grund für die Schwankungsbreite	Ausmaß der Schwankungsbreite
Innerhalb eines Gebietes:	
Unterschiede innerhalb einer Pflanze	1-2 ‰
Unterschiede innerhalb einer Art	± 1,5 ‰
Unterschiede zwischen Genotypen	≤ 4 ‰
Unterschiede zwischen verschiedenen Arten	≤ 4 ‰
Zwischen verschiedenen Gebieten:	
Temperatureinfluss	+ 0,3 ‰ / °C
Unterschiede in der relativen Luftfeuchtigkeit	- 0,1 ‰ / % r.F.
Höheneinfluss	+ 1 ‰ / 1000 m
Bodenunterschiede	≤ 0,5 ‰

Daten stammen aus der Veröffentlichung von T.H.E. Heaton[124]

Der $\delta^{13}C$-Wert eignet sich somit hervorragend zur Feststellung von Verschnitten zwischen C_3- und C_4-Pflanzen sowie zur Erkennung synthetischer Austauschstoffe. Er kann auch zur Feststellung der Herkunft von Lebensmitteln beitragen, da die umweltbedingten δ-Wert-Unterschiede zwar klein aber signifikant sind. Das $^{13}C/^{12}C$-Verhältnis hat sich in Kombination mit den δ-Werten anderer Elemente oder in der multivariaten Datenauswertung schon als durchaus aussagekräftig bewährt.

3.2.2 Stickstoff

Obwohl die Atmosphäre die größte Stickstoffquelle der Erde ist (78 %), nutzen Pflanzen vorwiegend den Stickstoff des Bodens (NO_3^-, NH_4^+) und spiegeln dessen $\delta^{15}N$-Wert wieder.[199,242,268] Ausnahmen bilden hier Pflanzen, die in Symbiose mit N_2-fixierenden Bakterien leben (Leguminosen) und daher auch einen $\delta^{15}N$-Wert zwischen -2 und +2 ‰, nahe dem des atmosphärischen N_2 von 0 ‰ haben.[85]

Abbildung 15 zeigt die $\delta^{15}N$- Streubreiten verschiedener Stickstoffpools. Daraus ist zu ersehen, dass in der Literatur für Pflanzenmaterial im Allgemeinen $\delta^{15}N$-Werte zwischen -5 und +10 ‰ beschrieben werden.[133,199,242]

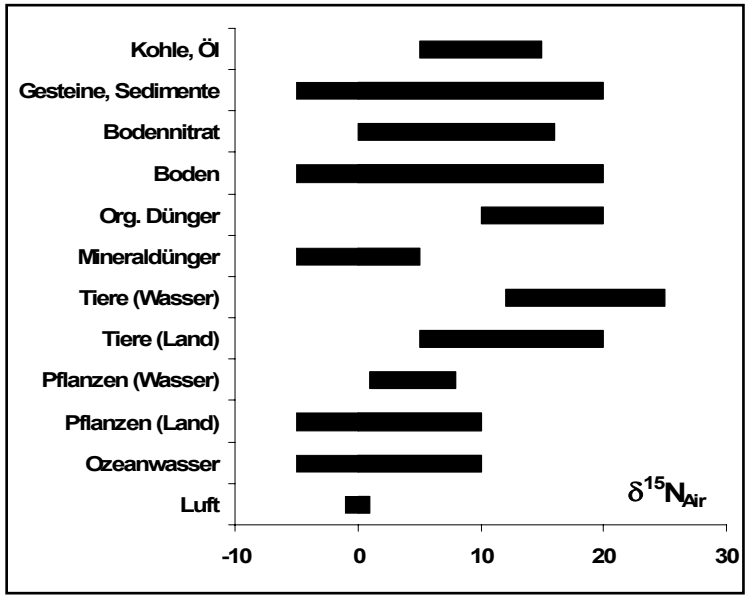


Abbildung 15: $\delta^{15}N_{Air}$-Werte verschiedener Stickstoffpools

Diagrammdaten stammen aus den Veröffentlichungen von B. Wagner[273] und F.J. Winkler[293]

Der organisch gebundene Stickstoff des Bodens wird von außen durch mehrere Quellen in den Stickstoffkreislauf eingetragen:

1. gasförmige Verbindungen (Stickstofffixierung, Niederschlag, Industrieemissionen),
2. Pflanzen (Ernterückstände, Laub, Gründüngung) und
3. Dünger.

Durch die metabolische Umsetzung von standort- und bodenabhängigen Mikroorganismen werden diese Stickstoffeinträge (Proteine, Nukleinsäuren, Aminozucker) den Pflanzen im Boden wieder als Nitrat oder Ammonium zugänglich gemacht und zusätzlich durch topografische, geografische und klimatische Gegebenheiten beeinflusst.[159,273]

Mikroorganismen wandeln dazu den organischen Stickstoff zu Ammoniak um (Ammonifikation), der sich wiederum mit Wasser zu Ammonium umsetzt. Im zweiten Schritt wird daraus Nitrit gebildet (Nitrifikation) und dieses weiter zu Nitrat oxidiert. Durch Denitrifikation können fakultativ anaerobe Bakterien das Nitrat auch wieder vollständig in molekularen Stickstoff umsetzen.[273] In Abbildung 16 sind die hier wichtigsten Vorgänge im biologischen Stickstoffkreislauf schematisch dargestellt.

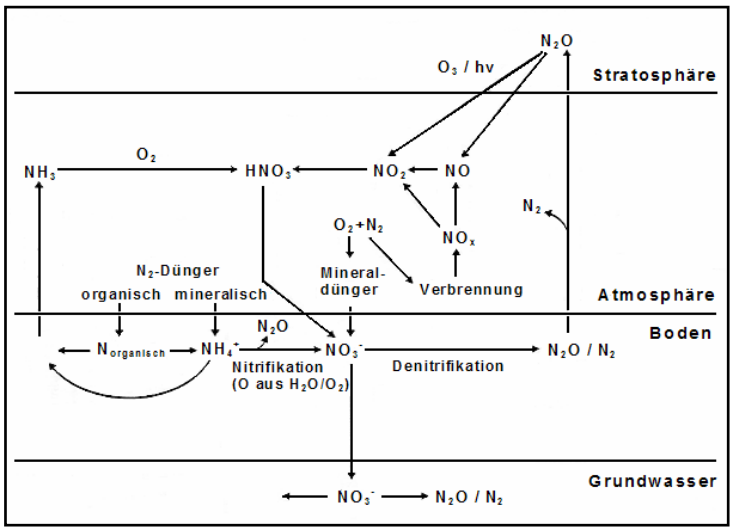


Abbildung 16:
Stickstoffkreislauf der wichtigsten N-Verbindungen zwischen Atmosphäre, Boden und Grundwasser

Originalgrafik verändert nach Schmidt et al.[234]

Ammonifikation, Nitrifikation und Denitrifikation sind Reaktionen, die vom Boden und klimatischen Faktoren abhängen und bei denen erhebliche Isotopeneffekte und damit Fraktionierungen auftreten. Während die Denitrifikation zur Anreicherung des schweren Isotops im verbleibenden Bodennitrat führt, ergeben sich bei der Nitrifikation aufgrund der bevorzugten Oxidation leichter N-Verbindungen ein ^{15}N-abgereichertes Nitrat und ein ^{15}N-angereichertes Ammonium im Boden.[4,21,57,85,138,159]

Lange und intensiv landwirtschaftlich genutzter Boden zeigt im Allgemeinen eine Anreicherung von ^{15}N, weil durch die Bodenbearbeitung die biologische Aktivität gefördert und somit die Umsatzrate der isotopenrelevanten Prozesse erhöht wird.[174,273] Dürre, Salzgehalt oder Stickstoffmangel können den δ^{15}N-Wert von Pflanzen dagegen bis zu 2 ‰ erniedrigen.[120,213]
Eine signifikante Abnahme des δ^{15}N-Werts in den Pflanzen wurde außerdem mit fallender Jahresdurchschnittstemperatur und steigendem jahresdurchschnittlichen Niederschlag festgestellt.[5] Eine eindeutige Erklärung für diese empirischen Beobachtungen konnte jedoch noch nicht gegeben werden, da noch zu wenig Forschung auf diesem Gebiet betrieben wurde. Es scheint, dass Pflanzen mit steigender Feuchtigkeit effizienter am mineralischen Stickstoffzyklus teilhaben. In dem Artikel von Amundson et al.[5] wurden außerdem Einflussfaktoren wie Höhe, Alter und Art der Böden diskutiert. Zusammenfassend ist aus diesen Ergebnissen festzustellen, dass es zu globalen Unterschieden aufgrund des Klimas im ^{15}N/^{14}N-Verhältnis kommen kann.

Einen relativ hohes ^{15}N/^{14}N-Verhältnis ist auch in küstennah wachsenden Pflanzen zu beobachten, weil diese durch Windeinfluss mit dem relativ stark an ^{15}N angereicherten Ozeanwasser in Berührung kommen (s. Abbildung 15).[268] Außerdem sind auch innerhalb einer Pflanzenart, die auf der gleichen Stickstoffquelle gezüchtet wurden, signifikante δ^{15}N-Variationen von bis zu 1,3 ‰ zwischen verschiedenen Genotypen beobachtet worden. Da die Stickstoffaufnahme keine Isotopendiskriminierungen verursacht[285], wurde von den Autoren der Verlust löslicher N-Verbindungen durch die Wurzeln als Erklärung genannt.[213]

Desgleichen diskriminieren wie beim Kohlenstoff nahezu alle Enzyme gegenüber ^{15}N und es kommt dadurch zu $\delta^{15}N$-Wert-Unterschieden zwischen einzelnen Substanzklassen und Pflanzenteilen.[119] Hier sind die Nitratreduktase[156,173,180,232], Glutaminsynthetase und vor allem die Transaminase[176] als Fraktionierungsfaktoren zu nennen.[176,297,298] Werner und Schmidt[285] haben 2002 diesbezüglich einen sehr detaillierten Übersichtsartikel herausgebracht, in dem die ^{15}N An- und Abreicherungen in den einzelnen Molekülgruppen im Stickstoffkreislauf der Pflanzen eingehend beschrieben werden.

Den zweiten großen Einfluss auf den $\delta^{15}N$-Wert des Bodens und damit auch auf den der Pflanzen bewirken neben den Mikroorganismen Dünger. In der Landwirtschaft werden vorwiegend Mineraldünger, aber auch organische Dünger, eingesetzt. Die $\delta^{15}N$-Werte von Mineraldüngern liegen aufgrund der Einbindung atmosphärischen Stickstoffs während ihrer Synthese mit -5 bis +5 ‰ (s. Abbildung 15) recht niedrig.[49,97,244] Dabei haben Ammoniumdünger im Allgemeinen niedrigere (negative) δ-Werte (^{14}N wird kinetisch bei der Ammoniumsynthese bevorzugt), während Nitratdünger positive δ-Werte zeigen.[4,98,138,269]
Organische Stickstoffdünger wie Gülle oder Stallmist unterscheiden sich dagegen signifikant von den synthetisch-anorganischen Mineraldüngern. Sie zeigen mit $\delta^{15}N$-Werten von 10-20 ‰ eine deutlich höhere Anreicherung mit ^{15}N (s. Abb. 15), das vor allem aus einer Isotopenfraktionierung bei der Ammoniak-Verdampfung aus tierischen Exkrementen resultiert.[49,231,244] Daher wird beim Einsatz von organischen Düngern fast immer ein Anstieg des ^{15}N-Gehalts im Boden und damit auch im Pflanzenstickstoff beobachtet.[234,299] Bei steigender mineralischer Düngung kann ein signifikanter Rückgang[15,149,157,243,299] des $\delta^{15}N$-Werts im Pflanzenstickstoff festgestellt werden.[85,242,273] Konventionelle Farmer verwenden größtenteils synthetische Mineraldünger, jedoch mischen sie teilweise auch organischen unter. Dagegen dürfen (Bio-) Bauern, die „ökologisch“ produzieren wollen, nach der Öko-Verordnung (VO (EWG) Nr. 2092/91)[270] nur ausschließlich zugelassene organische Dünger verwenden. Ähnlich werden in den USA Farmen und deren Produkte, die das Label „organic“ tragen wollen, durch das „United States Department of Agriculture“ reguliert und zertifiziert.[15]

Durch die vielen äußeren Einflussfaktoren kann die Schwankungsbreite der Stickstoff-Isotopenverteilung des Bodens und damit der Pflanzen beträchtlich sein. Vor allem der menschliche Einfluss durch die die Art der Düngung kann zu erheblichen saisonalen und lokalen Unterschieden führen. Daher können keine generellen Aussagen über bestimmte Gebiete gemacht werden. Trotzdem kann der $\delta^{15}N$-Wert des Gesamtstickstoffs einer Pflanze Informationen über ihre primäre Stickstoffquelle widerspiegeln und in Kombination mit anderen Elementen zur Herkunftsbestimmung herangezogen werden, um die Authentizität von z.B. Alkaloiden[52,278], Milch[163], Käse[177], Fleisch[238] oder Fruchtsäften[161] zu kontrollieren.

3.2.3 Sauerstoff

Es gibt drei mögliche Quellen für den Sauerstoff in organischem Pflanzenmaterial: Wasser, CO_2 und molekularen Sauerstoff. Diese Quellen weisen stark unterschiedliche ^{18}O-Gehalte auf, wobei Luftsauerstoff und CO_2 mit standortunabhängigen $\delta^{18}O$-Werten von ca. +23,5 ‰ bzw. +41 ‰ relativ „schwer" sind,[24,65,167] während (Grund-) Wasser variable, aber meist deutlich niedrigere $\delta^{18}O$-Werte zeigt (ca. -5 bis +5 ‰).[159,235] Abbildung 17 veranschaulicht diese verschiedenen Einflüsse auf organisches Material in einem Schema.

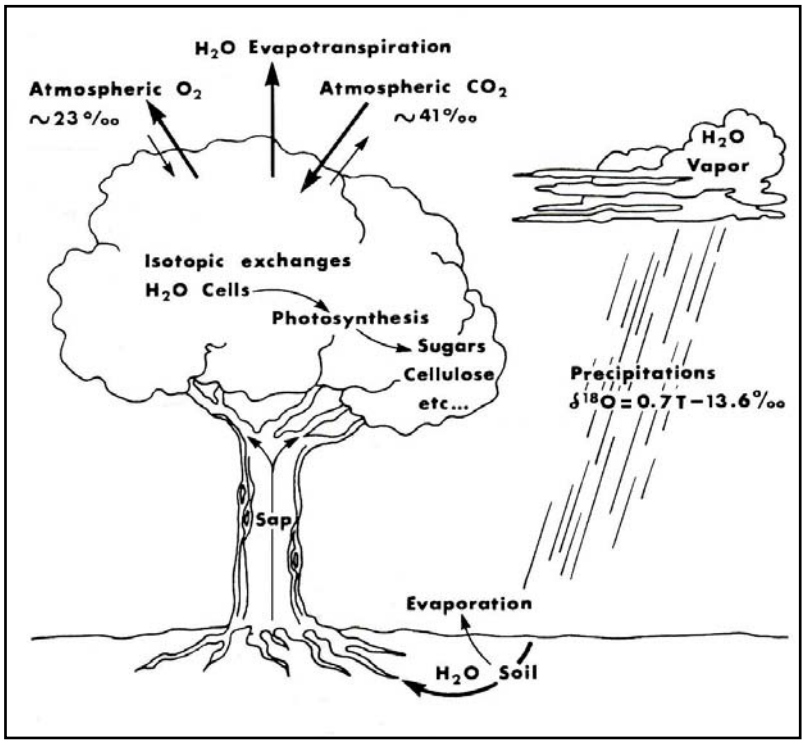


Abbildung 17:
Schematische Darstellung der verschiedenen, natürlichen Faktoren, die auf das Sauerstoffisotopenverhältnis der Pflanzen Einfluss nehmen

Originalgrafik aus der Veröffentlichung von Hillaire-Marcel[131]

3.2.3.1 Wasserkreislauf

Das größte Wasserreservoir der Erde bilden mit 98 % die Ozeane, deren Isotopenverhältnis konstant ist (0 ‰).[77] Der überwiegende Rest ist in den Polkappen als Eis gebunden und nur eine im Verhältnis dazu sehr geringe Wassermenge wird durch Wetteraktivitäten als Wasserdampf in Umlauf gebracht und innerhalb des Wasserkreislaufs stark diskriminiert.
Ausgangsort der großräumigen Bewegung der Luftmassen im weltweiten Maßstab ist der tropische Bereich um den Äquator, von dem aus der Wasserdampf jeweils nach Norden und Süden zu den Polen transportiert wird. Aufgrund der Fraktionierungen im weltweiten Wasserkreislauf hat die isotopogene Zusammensetzung der Niederschläge ein bestimmtes geografisches Muster und ist auch sehr eng mit der mittleren Lufttemperatur an einem Ort korreliert.[53,92,94] Eine schematische Darstellung des Wasserkreislaufs ist in der nachfolgenden Abbildung 18 dargestellt.

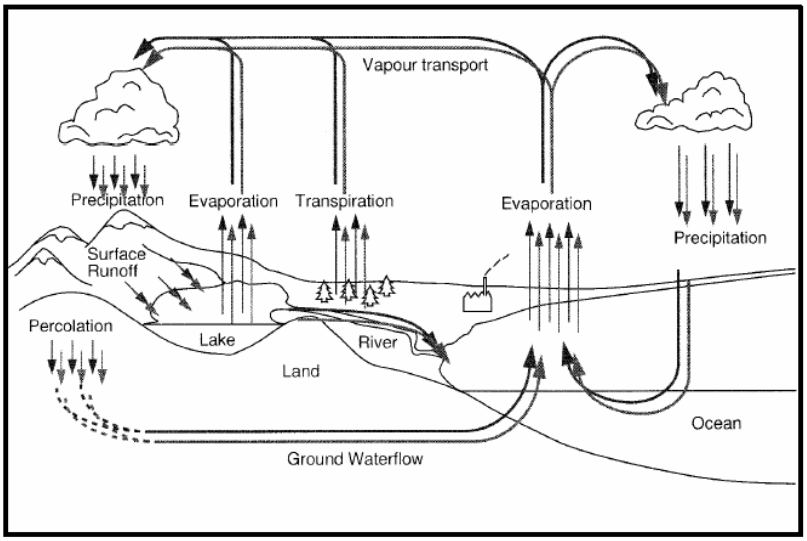


Abbildung 18:
Schema des globalen Wasserkreislaufs

Originalgrafik aus der Veröffentlichung von Hoffman et al.[134]

Bei der Verdunstung werden Wassermoleküle mit dem leichteren Isotop ^{16}O bevorzugt, daher sind Wolken und Niederschläge gegenüber der Verdunstungsquelle an ^{18}O abgereichert. Durch die Bewegung der Luftmassen vom Meer aus über das Land verarmt der Niederschlag immer mehr an ^{18}O (δ-Wert nimmt ab) und es können zwei damit einhergehende Effekte unterschieden werden:[92]

1. die Abnahme des ^{18}O-Gehalts im Niederschlag von der Küste zum Landesinneren mit zunehmender Entfernung vom Meer („Kontinental-Effekt"),
2. die Abnahme des ^{18}O-Gehalts im Niederschlag mit der Erhebung über das Meeresniveau („Höhen-Effekt"), der auf dem Abregnen an Hindernissen beruht.[94]

Die ^{18}O-Gehalte von Niederschlägen werden seit Jahren von dem **G**lobal **N**etwork of **I**sotopes in **P**recipitation (GNIP) durch weltweit verteilte Messstationen aufgezeichnet.[142] Der jahresdurchschnittliche $\delta^{18}O$-Wert der Niederschläge in den drei Pistazienhauptanbaugebieten Iran, USA und Türkei sind in den nachfolgenden Abbildungen 19 und 20 herauszulesen[142] und in Tabelle 5 zusammengefasst.

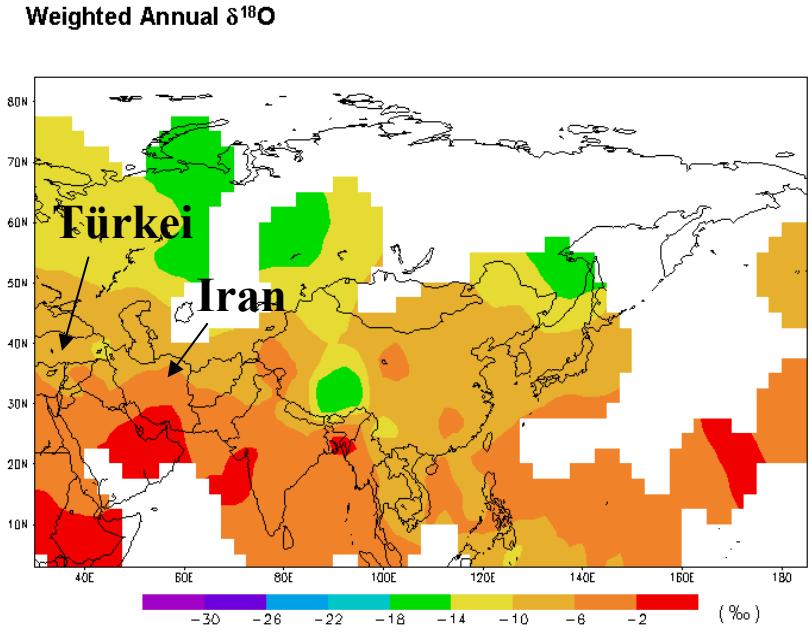


Abbildung 19:
Durchschnittliche $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Zusammensetzung des Niederschlags in Asien 2001

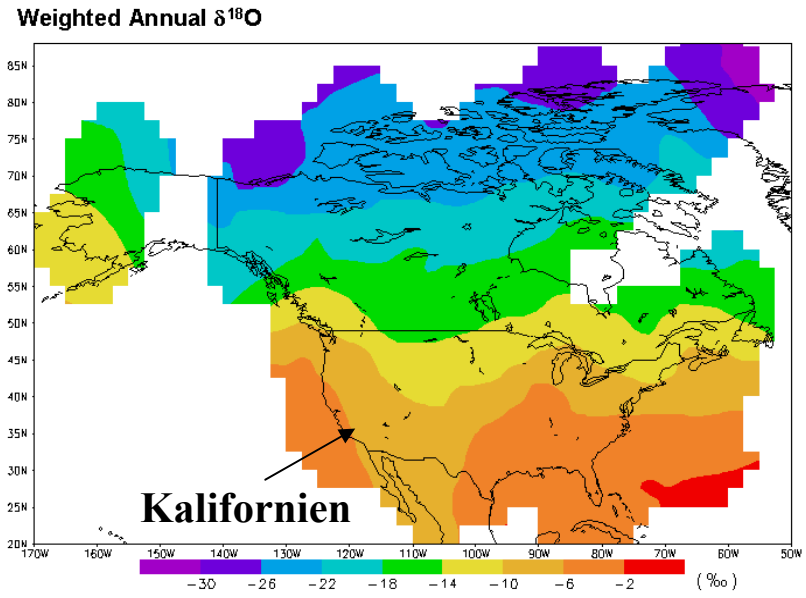


Abbildung 20: Durchschnittliche $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Zusammensetzung des Niederschlags in Nord-Amerika 2001

Tabelle 5: Jahresdurchschnittliche $\delta^{18}O$-Werte des Niederschlags in den Hauptanbaugebieten der Pistazien

Pistazienanbaugebiet	$\delta^{18}O_{VSMOW}$-Bereich des Niederschlags im Jahr 2001 [‰]
Iran (Zentraliran, Südwesten)	0 bis -6
Türkei (syrische Grenze)	-6 bis -10
USA (Kalifornien)	-2 bis -10

Der nachstehenden Tabelle 6 ist zu entnehmen, dass die drei Pistazienhauptanbauländer Iran, USA und Türkei fast auf demselben Breitengrad liegen (Iran etwas näher am Äquator als die beiden anderen Länder), sie sich jedoch stark in Längegrad und Höhe voneinander unterscheiden. (In den Abbildungen 3 und 4 in Kapitel 3.1.2 sind die dazugehörigen Klimadaten schon aufgeführt worden.) In Tabelle 5 ist dagegen zu sehen, dass trotz der unterschiedlichen Lage auf zwei Kontinenten die $\delta^{18}O$-Wertbereiche des Niederschlags in der Türkei und Kalifornien (Hauptanbaugebiet der USA) fast identisch sind. Der Regen im Iran zeigt im Durchschnitt die höchsten $\delta^{18}O$-Werte von den drei betrachteten Ländern (s. Tabelle 5), obwohl die Entfernung zur Türkei nur vergleichsweise gering ist. Hier scheint nicht die extreme Höhenlage der iranischen Pistazienanbaugebiete bzw. der o.g. „Höhen-Effekt“ Einfluss zu nehmen (der niedrige $\delta^{18}O$-Werte gegenüber den beiden anderen Ländern erzeugen würde), sondern die weltweite Bewegung der Luftmassen, durch die der Wasserdampf vom tropischen Bereich um den Äquator herum jeweils nach Norden und Süden zu den Polen transportiert wird und dabei an ^{18}O verarmt. Da der Iran etwas näher am Äquator liegt als die Türkei und Kalifornien, sind hier höhere $\delta^{18}O$-Werte im Niederschlag zu erwarten, was die Abbildungen 19 und 20 auch zeigen.

Tabelle 6: Geografische Lage zentraler Städte in den Pistazienanbaugebieten der drei Hauptproduzenten Iran, Türkei und USA

Land	Stadt	Längengrad	Breitengrad	Höhe [m ü. M.]
Iran	Shiraz	52° östl.	29° nördl.	1486
	Yazd	54° östl.	32° nördl.	1238
	Kerman	57° östl.	30° nördl.	1748
Türkei	Gaziantep	37° östl.	37° nördl.	701
	Urfa	39° östl.	37° nördl.	547
USA (Kalifornien)	Stockton	121° westl.	38° nördl.	9
	Fresno	119° westl.	37° nördl.	101

Daten stammen von der Website www.wetteronline.de[286]

Das Boden- und Grundwasser spiegelt letztendlich das längerfristige Mittel der örtlichen Niederschläge wider, weil das Wasser in den unteren Bodenschichten nicht mehr umgesetzt wird. Dieses nimmt die Pflanze mit ihren Wurzeln auf und leitet es durch den Stamm bis in die Blätter. Dabei findet weder bei der Aufnahme durch die Wurzeln noch während des Transports durch die pflanzlichen Leitsysteme eine Isotopenfraktionierung des Wassers statt. Erst wenn der Wasserdampf aus Blättern und Früchten an die umgebene Luft abgegeben wird kommt es durch (Evapo-) Transpiration zu einer Anreicherung von ^{18}O im verbleibenden Blattwasser.[82,86] Das Ausmaß dieser Anreicherung wird vom lokalen Klima (Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Niederschlag) beeinflusst. So transpirieren Pflanzen bei höheren Temperaturen mehr und es kommt zu einer erhöhten Anreicherung von ^{18}O im Blattwasser. In niederschlagsreichen Gebieten nimmt die dort im Allgemeinen herrschende hohe Luftfeuchte (stark an ^{18}O abgereichert) Einfluss auf den Isotopenwert im Blattwasser, da sie sich mit diesem austauscht. Es herrscht hier ein signifikanter, positiver Zusammenhang zwischen dem $\delta^{18}O$-Wert und der maximalen Temperatur und relativen Luftfeuchtigkeit an einem Ort. Außerdem unterliegt die ^{18}O-Anreicherung im Blattwasser zeitlichen Variationen, sowohl im Vegetationsverlauf (höhere Werte im Sommer) als auch im Tagesverlauf (höchste Werte am frühen Abend).[92,94,159,207]

Die Anreicherung von ^{18}O im Blattwasser hängt daher von drei generellen Parametern ab:

1. dem δ-Wert des Bodenwassers,
2. der Anreicherung während der Transpiration,
3. dem Austausch mit dem Wasserdampf der Luft.[14,86,91]

3.2.3.2 Sauerstoffkreislauf in Pflanzen

Der Sauerstoffkreislauf in Pflanzen ist im Gegensatz zum Kohlenstoffkreislauf sehr komplex. Die Pflanzen nutzen für den Aufbau ihrer Primärprodukte (Kohlenhydrate) den Sauerstoff aus dem CO_2 der Luft (CO_2-Fixierung durch die Photosynthese), jedoch spiegelt sich dessen hoher $\delta^{18}O$-Wert (~ +41 ‰) nicht in dem Sauerstoff-Isotopenverhältnis des Pflanzenmaterials wieder. Es konnte vielmehr in mehreren Studien gezeigt werden,[78,255] dass das ^{18}O-Verhältnis der Pflanzenprimärprodukte (erstmalig entdeckt bei Cellulose aus Bäumen) mit dem des (Blatt-) Wassers am Standort korreliert.[59,235] Für verschiedene Pflanzen mit unterschiedlichen Photosynthesewegen wurde hier immer eine ^{18}O-Anreicherung in den Kohlenhydraten von ca. +27±4 ‰ gegenüber dem Blattwasser gefunden.[78,235,253-255] Diese generelle Sauerstoffisotopen-Anreicherung wurde lange auf eine Äquilibrierungsreaktion zwischen dem Blattwasser und hydratisierten Carbonylgruppen während der Kohlenhydrat-Biosynthese zurückgeführt.[51] Alle Sauerstoffmoleküle, die in den Calvinzyklus gelangen, durchlaufen zwar ein Carbonylstadium auf der Stufe der Triosen mit Phosphoglycerinaldehyd, jedoch ist zweifelhaft, ob eine vollständige Äquilibrierung mit Wasser in der Kürze der Reaktionszeit stattfinden kann.[159,216,255]
Neueren Theorien zufolge ist der generell gefundene Wert von ca. +27 ‰ in Cellulose eher zufällig, denn Messungen an verschiedenen pflanzlichen Kohlenhydraten zeigten eine Spanne zwischen +20,6 und +30,4 ‰. Es wird daher angenommen, dass der hohe δ-Wert des CO_2-Sauerstoffs der Luft in die Kohlenhydrate eingeführt wird, dieser jedoch durch nachfolgende kinetische Isotopeneffekte und Äquilibrierungsreaktionen mit Wasser innerhalb der Pflanze verloren geht. Der Isotopenwert der Primärprodukte (Kohlenhydrate) nähert sich dadurch dem des Blattwassers an und liegt deshalb im Allgemeinen ca. +25 ‰ über dessen $\delta^{18}O$-Wert. Es wird außerdem vermutet, dass das Sauerstoffatom des Wassers auch direkt auf organische Zwischenprodukte übertragen wird und dass in Kohlenhydratmolekülen dadurch eine nicht-statistische ^{18}O-Verteilung vorliegen muss (^{18}O-An- und Abreicherungen in bestimmten Molekülpositionen). Produkte aus dem Sekundärmetabolismus der Pflanzen weisen immer niedrigere ^{18}O-Gehalte gegenüber den Primärprodukten auf, da hier die Beteiligung des Wassers in den betreffenden Biosynthesen zunimmt und die Reaktionen mit Isotopeneffekten einhergehen (z.B. enzymkatalysierte Hydrolysen, Wasseraddition an Doppelbindungen, weitere Sauerstoffaustauschreaktionen von Carbonyl- und Carboxylgruppen mit Wasser).[216,228,235] So sind im Allgemeinen Proteine um ca. 8 ‰ und Lipide um 12 ‰ gegenüber den primären Kohlenhydraten abgereichert.[293] Beide korrelieren jedoch auch mit dem ^{18}O-Gehalt des Niederschlagswassers. Abbildung 21 zeigt schematisch die Zusammenhänge zwischen den drei Primärquellen des pflanzlichen Sauerstoffs (CO_2, H_2O, O_2) und die daraus zu erwartenden $\delta^{18}O$-Werte der verschieden Stoffklassen in der Pflanze.[47,235,282]

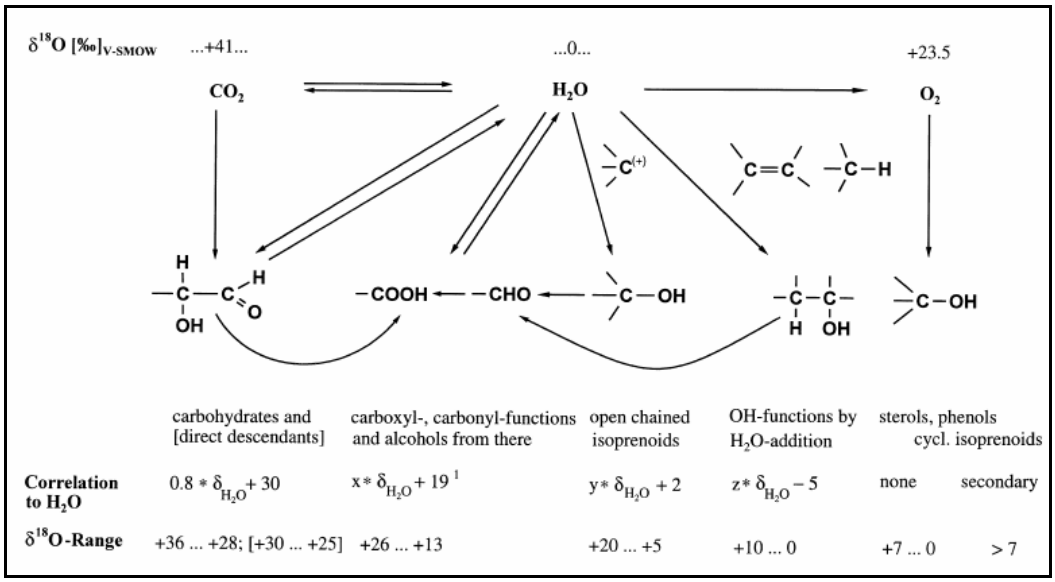


Abbildung 21: Zusammenhang zwischen den primären Sauerstoffquellen und den $\delta^{18}O$-Werten organischer Komponenten und funktionellen Gruppen

Originalgrafik aus der Veröffentlichung von Schmidt et al.[235]

Luftsauerstoff kann von Pflanzen auch direkt in Moleküle durch enzymatische Hydroxylierung eingebaut werden, jedoch tritt hier wiederum durch die bevorzugte Aufnahme und Abgabe des leichteren Sauerstoffisotops durch die Enzyme Oxygenase und Oxidase ein kinetischer Isotopeneffekt auf. Der Luftsauerstoff wird dadurch gegenüber seinem $\delta^{18}O$-Ausgangswert von ca. 23 ‰ auf Werte zwischen 0 und 10 ‰ abgereichert (aromatische Verbindungen wie z.B. Lignin, Anethol, Estragol).[113,216,282] In Abbildung 22 sind die $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte verschiedener pflanzlicher Stoffklassen und deren Herkunftsquellen dargestellt.

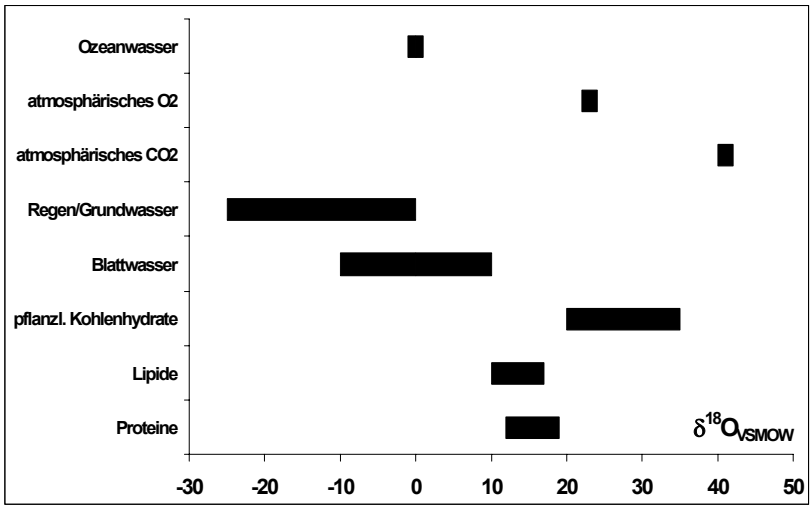


Abbildung 22: $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte verschiedener Sauerstoffpools

Diagrammdaten stammen aus den Veröffentlichungen von A. Roßmann[216] und F.J. Winkler[293]

Eine vollständige Klärung des Sauerstoffkreislaufs in den Pflanzen ist bislang noch nicht gelungen. Aufgrund der unterschiedlichen Quellen des Sauerstoffs und der Isotopeneffekte innerhalb der Pflanzen sind jedoch für die verschiedenen Stoffklassen deutlich unterscheidbare ^{18}O-Gehalte zu erwarten und z.T. auch nachgewiesen worden (s. Abbildung 21 und 22).

3.2.3.3 Weitere Einflussfaktoren auf das $^{18}O/^{16}O$-Verhältnis von Pflanzen

Eine weitere, weniger bedeutsame Sauerstoffquelle für Pflanzen ist das Nitrat (und Nitrit) aus dem Boden. Hierbei stammt ein O-Atom im biologisch gebildeten NO_3^--Ion aus O_2, die beiden anderen aus H_2O, da Stickstoff-Verbindungen niedrigerer Oxidationsstufen ihr O-Atom z.T. schon mit Wasser ausgetauscht haben. Das durch Nitrifikation im Boden entstehende NO_3^- hat daher einen $\delta^{18}O$-Wert, der weitgehend durch das umgebende Wasser bestimmt wird. Die Denitrifikation führt infolge kinetischer Isotopenfraktionierung wie beim Stickstoff zu einem ^{18}O angereichertem NO_3^-. Bei technisch hergestelltem Nitrat, wie es in Mineraldüngern vorkommt, stammen die Sauerstoffatome vornehmlich aus dem O_2 der Luft. Aus diesem Grund weisen Nitrate aus industrieller Produktion alle stark positive $\delta^{18}O$-Werte auf und liegen nahe dem des Luftsauerstoffs (+23,5 ‰). Die Aufbringung von Mineraldüngern durch den Menschen kann daher den Sauerstoffisotopengehalt der Pflanzen beeinflussen.[4,234,269] Die δ-Wert-Unterschiede in den verschiedenen Düngerarten sind in Abbildung 23 grafisch dargestellt.

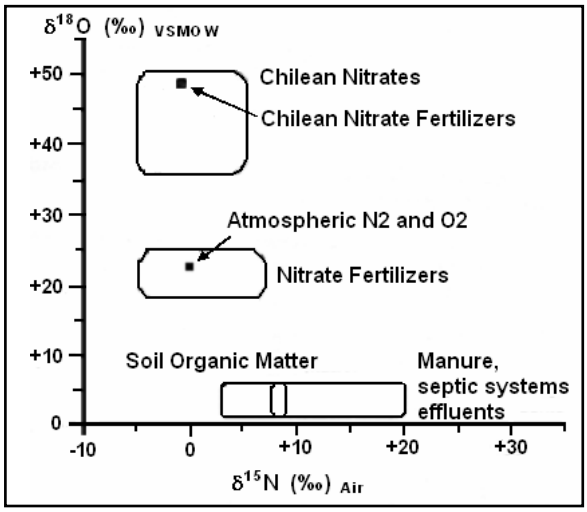


Abbildung 23:
$\delta^{15}N$- und $\delta^{18}O$-Werte verschiedener Düngernitrate

Originalgrafik verändert nach Vitòria et al.[269]

Während der molekulare Sauerstoff und das Kohlendioxid der Luft im Wesentlichen unabhängig vom Standort sind, bildet das in der Pflanze enthaltene Wasser eine standortspezifische Größe, da sein $\delta^{18}O$-Wert vom Grund- bzw. Niederschlagswasser und geografischen und klimatischen Faktoren abhängt. Das standortspezifische Isotopenmuster des Wassers wird wiederum auf das Pflanzenmaterial übertragen (starke Korrelationen), daher ist der $\delta^{18}O$-Wert sehr gut dazu geeignet, die Herkunft von Lebensmitteln zu bestimmen.[118] Vor allem zur Kontrolle der Herkunft und Verfälschung von Fruchtsaft,[32,69,137,146,223,245] Wein[91,94,117,136] und alkoholhaltigen Getränken,[3,127,128] sowie für Aromen wie Koffein[72,211,276,277] und Vanille[19,125] hat sich das $^{18}O/^{16}O$-Verhältnis bereits als sehr aussagekräftig erwiesen, häufig auch in Kombination mit ^{2}H- und ^{13}C-Messungen.[30,68,205,300]

3.3 Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS)

Die instrumentelle Entwicklung von speziellen Isotopenverhältnis-Massenspektrometern (IRMS – **I**sotope **R**atio **M**ass **S**pectrometer) zur Isotopenverhältnisbestimmung bei Bioelementen begann im Bereich der Geowissenschaften Mitte des 20. Jahrhunderts. IRMS-Geräte unterscheiden sich deutlich von gewöhnlichen Massenspektrometern bezüglich des aufzulösenden Massenbereichs, der Stabilität der Ionenproduktion und auch in der Probenzufuhr. Ihre Entwicklung wurde durch die Einführung multipler Kollektoren für die simultane Detektion der isotopomeren Ionen und des Doppeleinlasssystems (Dual Inlet) bzw. des Changeover-Ventils ermöglicht, durch dessen abwechselnden Einlass von Standard- und Probengas die Notwendigkeit langwieriger Absolutmessungen von Isotopengehalten oder der statischen Messung von Standard- und Probengas entfiel. Zur Bestimmung des Stabilisotopenverhältnisses der Bioelemente müssen die organische Proben in einfache, reine Messgase (CO_2, N_2, H_2, SO_2, CO) überführt werden, und zwar quantitativ oder zumindest frei von Isotopeneffekten.[179,186,281,283]
Für die vorliegende Arbeit zur Authentizitätsprüfung von Pistazien stand ein Delta^{plus}-IRMS der Firma Finnigan als Basisgerät zur Verfügung. An dieses konnten wahlweise über das ConFlo II^{TM}-Interface die Peripheriegeräte EA (**E**lemental **A**nalyzer = Elementaranalysator) zur gleichzeitigen Kohlenstoff- und Stickstoff-Isotopenverhältnisbestimmung[108,201,203,204] oder TC/EA (High **T**emperatur **C**onversion / **E**lemental **A**nalyzer = Pyrolyseeinheit) zur Sauerstoff-Isotopenverhältnisbestimmung[17,81,165,284] angeschlossen werden. Die Funktionsweise und der Aufbau des Basisgeräts und der beiden Peripheriegeräte werden in den folgenden Kapiteln erläutert.

3.3.1 IRMS-Basisgeräte

Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (IRMS) sind hoch spezialisierte Sektorfeld-Massenspektrometer, die nur für die Isotopenverhältnismessung einfacher Gasmoleküle wie CO_2, CO, N_2, H_2, SO_2 einsetzbar sind. Die hohe Präzision und Genauigkeit der IRMS wird u.a. durch die abwechselnde Messung des Analytengases und eines Standard- oder Referenzgases erreicht. Diese Relativmethode bietet die größte Genauigkeit bei der Bestimmung und dem Vergleich der Variation, denn Diskriminierungseffekte, wie sie z.B. über die Zeit oder zwischen zwei Geräten auftreten können, werden kompensiert.[70,76,181,281,293]
Die Ionisation der Gasmoleküle erfolgt über Elektronenstoß, weil hiermit eine hohe Ionisationsrate und gute Stabilität erreicht wird. Die entstehenden Kationen werden aufgrund ihres Masse/Ladungsverhältnisses (m/z) in einem Magnetfeld (Permanent- bzw. Elektromagnet) getrennt

und die Isotopomere in parallelen Faraday-Kollektoren (im Falle des in dieser Arbeit verwendeten Finnigan Delta^{plus} ein Dreifach-Auffänger) quantifiziert. Ein Schema der Ionenoptik eines Finnigan Delta^{plus}-IRMS ist in Abbildung 24 dargestellt.

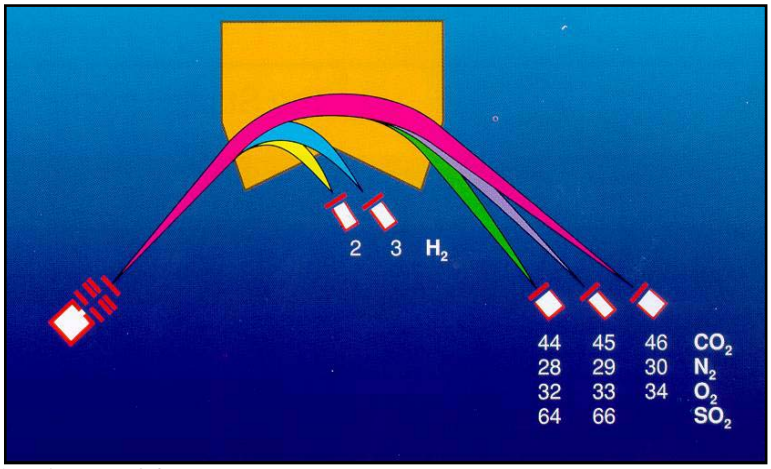


Abbildung 24:
Schema der Ionenoptik eines Finnigan Delta^{plus}-IRMS

Originalgrafik aus der Finnigan Delta^{plus}-Manual[88]

Die hohe Präzision und Genauigkeit der IRMS, die kleinen Massenunterschiede bei zugleich großen Konzentrationsunterschieden zwischen den Isotopomeren empfindlich und präzise zu messen, wurde u.a. erst durch Faraday-Cups möglich. In diesen werden die durch den Magneten aufgetrennten Isotopomere aufgefangen und durch einen VFC (**v**oltage to **f**requency **c**onverter = Spannungs-Frequenzwandler) verschieden hoch verstärkt. Im Falle der Kohlenstoff-Isotopenverhältnismessung müssen z.B. die drei Massen m/z = 44, 45 und 46 des Kohlendioxids, die aus den Isotopen-Kombination $^{12}C^{16}O_2$, $^{13}C^{16}O_2$ und $^{12}C^{16}O^{18}O$ herrühren, voneinander getrennt werden, wobei das leichtere Isotopomer $^{12}C^{16}O_2$ mit 99 % natürlichen Anteils im absoluten Überschuss vorliegt (s. Tabelle 2 in Kapitel 3.2).[26,31,88,181,281]

Im Falle der Kohlenstoffmessung muss auch beachtet werden, dass der $\delta^{13}C$-Wert nicht unabhängig vom Sauerstoff bestimmt werden kann, da $^{13}C^{16}O_2$ die gleiche Masse hat wie das Molekül aus der Isotopomerenkombination $^{12}C^{17}O^{16}O$ (m/z = 45). Somit fallen beide Moleküle in den gleichen Cup und die Berechnung der ^{13}C-Konzentration würde durch das ^{17}O verfälscht werden, das einen Beitrag von ca. 7 % zur Masse m/z = 45 leistet. Daher muss der $\delta^{13}C$-Wert bzw. das 45/44-Verhältnis immer korrigiert werden, was meist nach der sog. ^{17}O-Korrektur nach Craig[48] erfolgt.[283]

3.3.2 Elementaranalysator (EA)

Der Elementaranalysator (EA) dient zur Überführung von festen oder flüssigen organischen Proben in die Messgase CO_2 und N_2 zur simultanen Kohlenstoff- und Stickstoffbestimmung („Dumas Combustion“). Ein Schema des in dieser Arbeit verwendeten EA 1110 CHN von Carlo Erba / Finnigan ist in Abbildung 25 dargestellt.

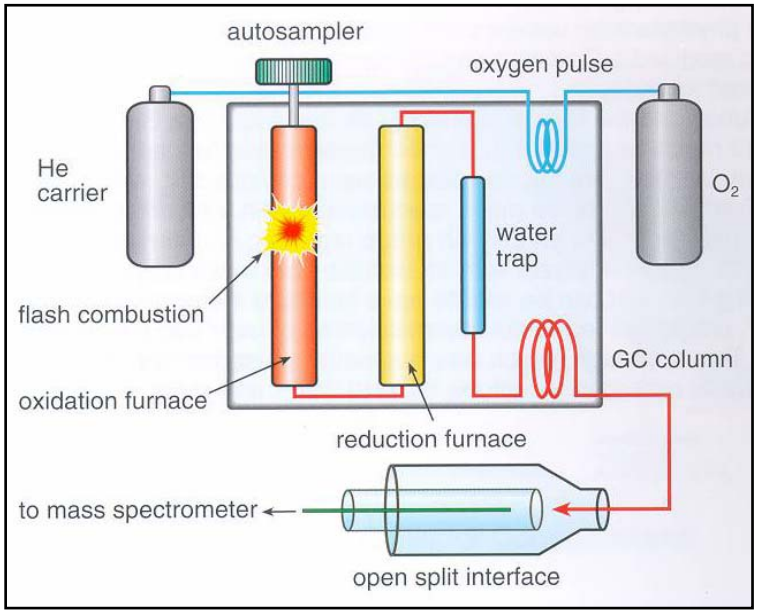


Abbildung 25:
Schema des Aufbaus und der Funktionsweise des EA

Originalgrafik aus Präsentation von Oeßelmann et al.[187]

Die Probe wird für die Analyse in Zinnkapseln eingewogen und in den kontinuierlich mit Sauerstoff gespülten Autosampler platziert. Beim Öffnen des Autosamplers fällt die Probe in die heißeste Zone (1040 °C) des Oxidationsofens (Quarzrohr) und der Spül-Sauerstoff verhindert den Eintritt von Luft in den Reaktor. Durch den mit gekörntem Chromoxid gefüllten Reaktor fließt Helium als Trägergas, dem gleichzeitig mit dem Einwurf der Probe Sauerstoff zugesetzt wird, um die Probe katalytisch in die Messgase CO_2, N_2 und H_2O umzusetzen. Das gleichzeitig verbrennende Zinn unterstützt dabei die quantitative Verbrennung, indem es die Temperatur durch einen sog. „Flash“ kurzzeitig auf über 1800 °C erhöht. Störende Gase werden mit silberhaltigem Kobaltoxid entfernt. Die gasförmigen Analyten werden durch das Trägergas aus dem Oxidationsofen in den etwas kühleren Reduktionsofen (650 °C) gespült. Dieser ist mit Kupfer gefüllt und reduziert entstandene Stickstoffoxide (NO_x) zu elementarem Stickstoff und bindet den überschüssigen Sauerstoff. Das bei der Verbrennung entstandene Wasser wird an einer einfachen Magnesiumperchlorat-Falle gebunden und an einer GC-Säule (Porapak) werden die Messgase N_2 und CO_2 isotherm (50 °C) voneinander getrennt. Ein Open-Split-Interface (ConFlo II^{TM}) führt die Analytengase und die Referenzgaspulse dem IRMS zu und reduziert den Trägergasstrom von ca. 90 ml/min. auf eine für das IRMS verträgliche Flussrate von ca. 0,3 ml/min. Dadurch erreichen nur noch ca. 0,3 % des Gases das IRMS.[25,31,197,262]

3.3.3 ConFlo II™-Interface

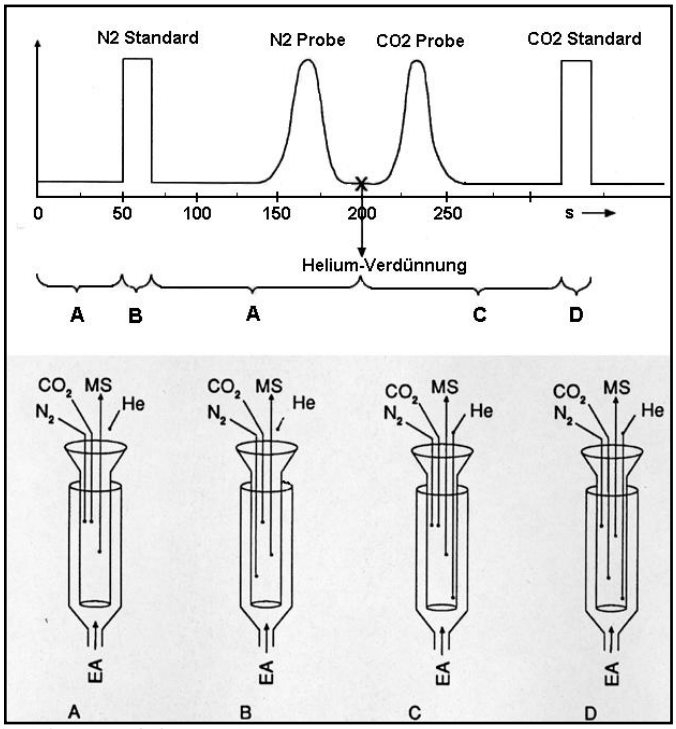


Abbildung 26:
Schema der Funktionsweise eines ConFlo II™-Interfaces im Dualgasmode

Originalgrafik aus dem ConFlo II-Interface Benutzerhandbuch[262]

Das ConFlo II™-Interface hat ein besonderes Open-Split-System, dass den großen Trägergasstrom aus dem EA permanent teilt. Es besteht aus zwei ineinander gesteckten Glasröhrchen, zwischen denen 90 % des EA-Trägergasstroms als „Waste“ vorbeifließen und nur ca. 10 % in das innere Röhrchen gelangen. An dessen Ende befindet sich die sog. „Schnüffel“-Kapillare, die den reduzierten EA-Trägergasstrom zum IRMS leitet. Das Open-Split-System des ConFlo II™ ist weiterhin so konzipiert, dass der EA-Trägergasstrom mit Helium über eine bewegliche Kapillare noch weiter verdünnt werden kann. Dies ist z.B. bei organischen Proben nötig, um das in hohen Konzentrationen entstehende Kohlendioxid gegenüber dem zumeist kleinen Stickstoffsignal angleichen zu können. Dazu wird kurz vor dem Durchlauf des CO_2-Peaks die bewegliche Heliumkapillare unter das Niveau der MS-Schnüffelkapillare in das innere Röhrchen abgesenkt und durch Gegenstromprinzip der ankommende EA-Trägergasstrom weiter verdünnt (Dilution). Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Zumischung des Heliums eine Isotopenfraktionierung hervorruft, so dass Probe und Standard immer unter gleichen Bedingungen gemessen werden müssen. Eine schematische Darstellung der Funktionsweise des ConFlo II™ während einer N_2-CO_2-Dualgasmessung ist in Abbildung 26 wiedergegeben.

Außerdem können über die beweglichen Kapillaren dieses Open-Split-Systems auch die für die interne Standardisierung benötigten Referenzgaspulse in den Helium-Trägergasstrom aus dem EA zugegeben werden. Dadurch kann auch die externe Kalibrierung durch Messung von Arbeitsstandards entfallen, da die Steuerungssoftware (ISODAT NT) die Eingabe des δ-Werts der Referenzgase erlaubt und somit der δ-Wert der Probe bezogen auf den internationalen Bezugstandard ausgegeben wird. Nach Herstellerangaben liegt die Präzision einer N_2-CO_2-Dualgasmessung für $\delta^{15}N$ bei ±0,13 ‰ (5 µg N) und für $\delta^{13}C$ bei ±0,11 ‰ (4 µg C).[12,262]

3.3.4 High Temperature Conversion / Elemental Analyzer (TC/EA)

Ausgangspunkt vieler Entwicklungsversuche für eine Sauerstoffbestimmung waren die Methoden nach Unterzaucher (1952)[267] und Schütze (1939)[240] sowie Rittenberg und Ponticorvo (1956)[212], bei denen der in der Probe enthaltene Sauerstoff quantitativ zu Kohlenmonoxid umgesetzt und dieses weiter zu Kohlendioxid zur Quantifizierung oxidiert wird.[18,206,259] Diese Techniken sind jedoch mit hohen Zeitaufwand, Blindwerten, Memoryeffekten (Reaktionen mit Reaktorwänden) und Einschränkungen bezüglich der zu analysierenden Proben (Fluoride reagieren mit dem Quarzrohr, Sulfate mit Kohlenstoff) verbunden. Der Durchbruch auf dem Gebiet der Sauerstoff-Isotopenverhältnismessung wurde daher durch die Entwicklung von memoryfreien Pyrolyserohren aus glasartigem Kohlenstoff (Glassy Carbon) und die Umstellung auf eine direkte Messung der Kohlenmonoxidmassen m/z = 30 und 28 erreicht. Auch die online-Kopplung der Pyrolyseeinheit an ein IRMS konnte durch die Verwendung von Helium als Trägergas erreicht werden.[160,165,187,263,281,284]

Das in dieser Arbeit verwendete Pyrolysegerät der Firma ThermoQuest / Finnigan MAT ist der sog. TC/EA (High **T**emperature **C**onversion / **E**lemental **A**nalyzer), der für die (simultane) Wasserstoff- und Sauerstoffbestimmung flüssiger oder fester, organischer oder anorganischer Proben konzipiert ist. Im Falle der vorliegenden Arbeit war nur die Sauerstoffanalyse möglich, da das IRMS-Basisgerät nicht mit H_2-Faraday-Auffängern ausgestattet war. Der schematische Aufbau und die Funktionsweise des TC/EA sind in Abbildung 27 dargestellt.

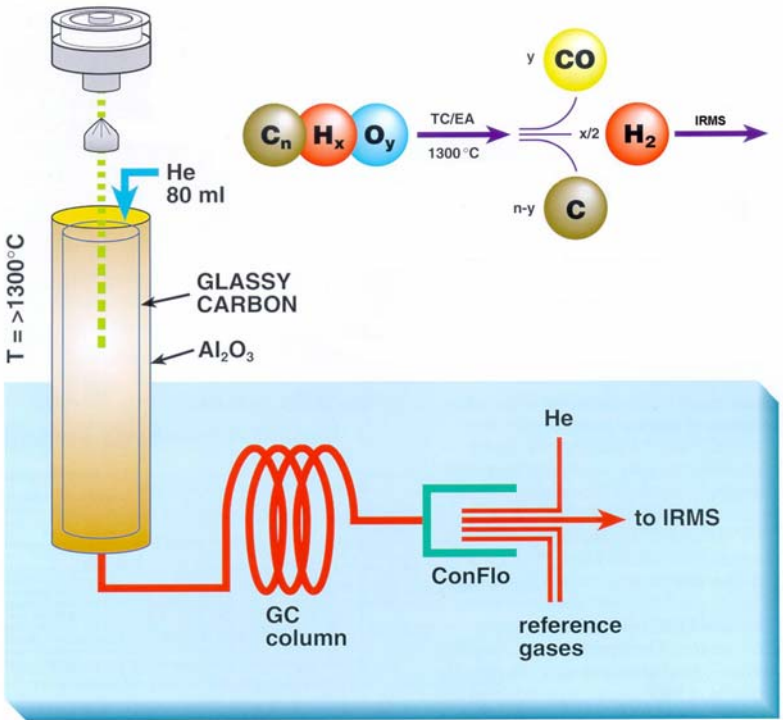


Abbildung 27:
Schema des Aufbaus und der Funktionsweise des TC/EA

Originalgrafik aus der TC/EA-Gerätebeschreibung[89]

Die in Zinn- oder Silberkapseln eingewogenen Proben werden hier anders als beim EA durch einen heliumgespülten Autosampler in das Reaktorrohr eingeworfen und durch Pyrolyse, d.h. einer Verbrennung bei sehr hohen Temperaturen unter Sauerstoffausschluss und mit einem Kohlenstoffdonator (Graphitcrucible), in die Messgase CO und elementaren H_2 überführt (s. Reaktionsgleichung in Abbildung 27). Die Probe fällt dabei in die heißeste Zone des Reaktorrohrs (1350 °C), das aus einem äußeren Keramikmantel (Aluminiumoxidrohr) und einem inneren Glassy Carbon Rohr besteht. Der Zwischenraum zwischen diesen beiden Rohren wird permanent mit Helium gespült, um unerwünschte Oxidationen zu vermeiden. Der Helium-Trägergasstrom transportiert die entstehenden Probengase weiter, wobei Schwefel an Silberwolle gebunden wird, die Bestandteil der Reaktorfüllung ist. Die im Trägergasstrom verbleibenden Analytengase H_2, N_2 und CO werden isotherm (70 °C) an einer GC-Säule (Molsieve) voneinander getrennt und dem IRMS via Open-Split-Interface (ConFlo II^{TM}) zugeführt.[263] Nach Herstellerangaben liegt die Präzision des TC/EA für $\delta^{18}O$-Messung von Feststoffen (Benzoesäure) bei ±0,4 ‰ (52 µg O) und für $\delta^{2}H$ bei ±3 ‰ (25 µg H).[89]

Es ist bei der Sauerstoffanalyse außerdem zu beachten, dass das aus stickstoffhaltigen Proben entstehende Stickstoffgas die Messung stören kann. In der Ionenquelle entsteht aus dem Stickstoff in Verbindung mit Wasser Stickstoffmonooxid (NO), das einerseits schwer abzupumpen ist und andererseits mit einer Masse von m/z = 30 die CO-Messwerte verfälscht. Abhilfe kann hier das Zumischen eines sog. Auxiliary-Gases aus 1-2 % Wasserstoff in Helium zum Helium-Trägergasstrom schaffen, um nach folgender Formel das Wasser in der IRMS-Quelle abzufangen bzw. für eine Reaktion mit N_2 zu inaktivieren: $H_2 + H_2O \rightarrow H_3^+ + OH^-$.

Ein weiteres, praktisches Problem während der Durchführung der vorliegenden Arbeit war das Fehlen kommerziell erhältlicher, fester, organischer Referenzsubstanzen.[162] Kalibrierungen mussten daher mit vorhandenen wässrigen Standards (VSMOW und einem Laborstandard der Gasbench) durchgeführt werden, obwohl sich diese bei der Pyrolyse anders verhalten als ein organischer Feststoff. Des Weiteren decken die kommerziell erhältlichen Referenzwässer nur $\delta^{18}O$-Werte im negativen Bereich ab, jedoch liegen die von Pflanzen bzw. Lebensmitteln im Allgemeinen mehr im Positiven. Seit Mitte 2004 sind bei der Internationalen Atomenergiebehörde (IAEA)[139] zwei Benzoesäuren (+23,06 ‰ und +71,40 ‰) käuflich zu erwerben, die eine sichere 2-Punkt-Kalibrierung des TC/EA für die Messung von organischen Festproben ermöglichen, jedoch kamen sie für diese Arbeit leider zu spät auf den Markt.

3.4 Multivariate Datenanalyse

Der Literatur ist zu entnehmen, dass der Einsatz multivariater statistischer Datenanalysen in der Lebensmittelchemie immer häufiger und notwendiger wird. Der Nachweis der Herkunft oder Verfälschung von hochwertigen und damit teuren Lebensmitteln kann meist nicht nur anhand eines Parameters geführt werden. Die multivariate Statistik stellt jedoch Methoden und Verfahren zur Verfügung, die die gemeinsame, gleichzeitige Analyse mehrerer Merkmale bzw. deren Ausprägungen erlauben und gegenüber einer univariaten Analyse die Abhängigkeiten zwischen den beobachteten Merkmalen berücksichtigen.[121]
In den letzten Jahren wurden vor allem sechs spezielle Lebensmittel (Wein,[55,114,150,164,183,198,221] kaltgepresstes Olivenöl,[84,178,249,250] Käse,[177,202] Fleisch,[22,200] Kaffee und Tee[6,52,87,172,276]) mittels Stabilisotopendaten oder einer Kombination der Messungen von Stabilisotopen, ^{1}H NMR, Metallen oder Spurenelementen sehr intensiv unter Zuhilfenahme der multivariaten Datenanalyse untersucht. Hierbei wurden meistens die Hauptkomponentenanalyse und die Diskriminanzanalyse, häufig auch in Kombination, verwendet.

Ein Datensatz wird im Allgemeinen über zwei Größen definiert: den Objekten (Untersuchungsgegenständen) und den Variablen (Messgrößen, Eigenschaften, Parametern).[129] Bei der vorliegenden Fragestellung nach der Herkunft (Gruppenvariable) der Pistazien werden an mehreren Objekten (gesamte Nuss, Öl, entfetteter Rückstand) drei verschiedene Variablen (Isotopendaten δ^{13}C, δ^{15}N, δ^{18}O) gemessen. Ziel der multivariaten statistischen Untersuchung ist es nun, mit Hilfe eines authentischen Datensatzes (Pistazienproben mit bekannter Herkunft/Gruppenzugehörigkeit) diejenige Variablen-Objekt-Kombination herauszufinden, die eine Herkunfts-/Gruppenzuordnung der Proben nach Ländern zulässt. Mit Hilfe dieses Modells soll dann später die Herkunft unbekannter Pistazienproben bestimmt/überprüft werden.
Es wird daher ein strukturen-prüfendes Verfahren zur Erstellung des statistischen Modells gesucht, denn die abhängige (Gruppen-) Variable „Herkunft“ und die unabhängige Variable „δ-Wert“ sind beim authentischen Datensatz bekannt. Ist wie in diesem Fall die abhängige Variable nominal skaliert und die unabhängige Variable metrisch, so bietet sich die Diskriminanzanalyse zur Auswertung an. Sie ist ein Verfahren zur Analyse von Gruppenunterschieden und zur Klassifizierung neuer Elemente.[13]
Es ist jedoch vorher ratsam, ein strukturen-entdeckendes Verfahren auf den Datensatz anzuwenden, um dessen wesentliche Struktur zu erkennen, d.h. ob sich die Pistaziendaten überhaupt nach Ländern ordnen. Hierfür eignet sich die Hauptkomponentenanalyse, denn sie ermöglicht eine klare grafische Veranschaulichung der wesentlichen Variablenstruktur eines Datensatzes und kann auch zur Datenreduktion eingesetzt werden.[129]

Eine nähere Erklärung zur Einteilung der multivariaten Analysenmethoden in primär strukturen-entdeckende und strukturen-prüfende Verfahren ist in Anhang II gegeben.

3.4.1 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (**P**rincipal **C**omponent **A**nalysis) ist ein Spezialgebiet der Faktorenanalyse und gehört zu den strukturen-entdeckenden Verfahren. Sie soll auf den authentischen Pistaziendatensatz angewendet werden, um zu überprüfen und sicherzustellen, dass ein grundsätzlicher, statistischer Zusammenhang zwischen den δ-Werten und der Herkunft der Pistazien besteht. Außerdem eignet sich die Hauptkomponentenanalyse aufgrund ihrer strukturen-entdeckenden Eigenschaft hervorragend zur Erkennung multivariater Ausreißer, wenn sie auf einen authentischen Datensatz angewendet wird, da hier die kausalen Zusammenhänge der Variablen schon bekannt sind (in diesem Falle die Herkunft der Pistazienproben).

Bei der Hauptkomponentenanalyse wird eine größere Anzahl von Variablen anhand der gegebenen Fälle auf eine kleinere Anzahl unabhängiger Einflussgrößen (Hintergrundvariablen, künstliche Merkmale) zurückgeführt. Diese sog. Faktoren, die als „hinter den Variablen“ stehende Größen angesehen werden, repräsentieren den Zusammenhang zwischen verschiedenen Ausgangsvariablen und machen diese handhabbar und oft auch erst interpretierbar. Der Vorteil dieser künstlichen Größen besteht darin, dass sie mehr Information übertragen als jede einzelne Ausgangsvariable. Dabei werden diejenigen Variablen, die untereinander stark korrelieren, zu einem Faktor zusammengefasst. Ziel der Hauptkomponentenanalyse ist es somit, solche Faktoren zu ermitteln, welche die beobachteten Zusammenhänge zwischen den gegebenen Variablen möglichst vollständig erklären.[36,37,129] Üblicherweise wird diese Analyse in den folgenden vier Schritten durchgeführt:

1. Berechnung der Korrelationsmatrizen,
2. Extraktion der Faktoren,
3. Rotation,
4. Berechnung der Faktorwerte.

Nähere Ausführungen zu den vier Schritten der Hauptkomponentenanalyse finden sich in Anhang II.

3.4.2 Diskriminanzanalyse

Die Diskriminanzanalyse ist eines der klassischen strukturen-prüfenden Verfahren unter der Vielzahl multivariater Datenanalysen. Ihr primäres Ziel besteht in der optimalen, linearen Separation gegebener Gruppen (Lernphase), um später neue Objekte in eine dieser Gruppen mit möglichst großer Sicherheit einzuordnen/zu klassifizieren.[129] Im Mittelpunkt der Diskriminanzanalyse steht die Aufstellung der sog. *Diskriminanzfunktion* d, die auch als *kanonische* Diskriminanzfunktion bezeichnet wird, um die vorgenommene Linearkombination der Variablen zu kennzeichnen:[13]

$$d = b_1x_1 + ... + b_nx_n + a$$

Dabei sind x_1 bis x_n die verschiedenen erklärenden Variablen und b_1 bis b_n sowie die Konstante a die von der Analyse abzuschätzenden Koeffizienten, mit denen die Variablen in die Diskriminanzfunktion einfließen. Bei g Gruppen lassen sich maximal g-1 Diskriminanzfunktionen, die jeweils orthogonal (rechtwinklig bzw. unkorreliert) zueinander sind, bilden. Ziel der Diskriminanzanalyse ist es nun, die Koeffizienten so zu ermitteln, dass die Werte der Diskriminanzfunktionen die untersuchten Gruppen möglichst optimal trennen.

Es existiert jedoch keine definierte Regel bezüglich der minimal benötigen Größe eines Lerndatensatzes zur Ermittlung der Diskriminanzfunktion, aber aus mathematisch-technischer Sicht sollten pro Gruppe (wesentlich) mehr Proben als Variablen vorhanden sein. Ansonsten besteht die Gefahr des sog. „Lasso-Effekts“ oder „overfittings“, d.h. bei Verwendung nur weniger Proben wird eine scheinbar sehr gute Trennung der Gruppen erreicht, aber Testproben danach falsch klassifiziert.[13,150]

Nach der Aufstellung eines Klassifizierungsmodells ist die abschließende Angabe einer Klassifikationsfehlerrate als Gütemaß für die in der Lernphase aufgestellte Zuordnungsregel ein unverzichtbarer Bestandteil der Diskriminanzanalyse. Damit kann abgeschätzt werden, mit welcher Sicherheit bzw. Irrtumswahrscheinlichkeit die Einordnung der Testobjekte in die vorgegebenen Klassen behaftet ist und der schon erwähnte Lasso-Effekt wird ausgeschlossen.

Nähere Erläuterungen zur Durchführung einer Diskriminanzanalyse finden sich in Anhang II.

4.

Ergebnisteil I: Methodenvalidierung

Bevor Proben vermessen und ihre Messwertergebnisse diskutiert und interpretiert werden können, müssen zuerst einige generelle Parameter überprüft werden, um sicherzustellen, dass das Messgerät, die Proben und die Methode sichere, stabile und richtige Ergebnisse liefern und auch die verwendeten Materialien und Aufarbeitungsschritte keine Fehler in die Ergebnisse eintragen.
Das einwandfreie Arbeiten und die Stabilität der Geräte kann am besten über darauf kalibrierte Standards geprüft und verfolgt werden. Zertifizierte Referenzmaterialien sind im Bereich der Stabilisotopenanalytik allerdings nur in geringen Mengen und sehr teuer bei der Internationalen Atomenergiebehörde (IAEA) zu beziehen. Daher eignen sie sich nicht als täglicher Laborstandard, sondern dienen nur zur Kontrolle des Geräts in größeren Abständen und zur Kalibrierung eines Arbeitsstandards. Dieser kann dann aber hervorragend für die täglichen Messungen als Bezugs-, Berechnungs- und Kontrollstandard eingesetzt werden. Außerdem sollte bei IRMS-Geräten immer der lineare Arbeitsbereich kontrolliert werden, damit die Einwaagen richtig gewählt sind. Zu hohe Einwaagen führen nämlich zu einer Überladung der Detektoren und zu niedrige können nicht mehr erfasst werden (Empfindlichkeit). Allerdings ist unter Linearität in der IRMS nicht der klassische Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration zu verstehen (aus dessen Korrelation sich eine Kalibrierfunktion ergibt), sondern der Zusammenhang zwischen Signalhöhe bzw. Probenmenge und Messwert (es werden keine Quantitäten sondern Verhältnisse gemessen). Idealer Weise sollte bei der Auftragung der Signalhöhe gegen den Messwert eine Parallele zur Achse resultieren, denn das Isotopenverhältnis einer Probe sollte immer gleich, also unabhängig von der Einwaage und der Signalhöhe sein.

Im Zuge der Qualitätssicherung und des Qualitätsnachweises in einem analytischen Labor sollte eine neue Messmethode außerdem validiert werden, um die Verwendbarkeit und Gültigkeit der Analysenergebnisse zu gewährleisten. Die wichtigsten Kriterien für den Validierungsumfang sind natürlich die Art der Probe, die Apparatur und das Ziel der Validierung.
Die Validierung eines Analysenverfahrens besteht im Wesentlichen aus der kritischen Untersuchung der einzelnen Analysenschritte auf systematische und statistische Fehler, jedoch erlaubt die IRMS-Technik in diesem Zusammenhang nur die Prüfung von sehr wenigen der üblichen Validierungsparameter, da hier Verhältnismessungen an einer bestimmten, charakteristischen Eigenschaft der Probe durchgeführt werden. Die Auswahl an zertifizierten Referenzmaterialien ist begrenzt und Standardmatrizes sind käuflich nicht zu erwerben, so dass sich die Validierung in diesem Fall nur auf die Feststellung der Richtigkeit, Präzision und Stabilität beschränkt.[107,166]

Des Weiteren müssen neben der Messmethode auch die Probe an sich und ihre Aufarbeitung auf Quellen von Fehlereinträgen und Diskriminierungen untersucht werden. Pistazien kommen z.B. in unterschiedlichen Darreichungsformen in den Handel und werden als Snack-Artikel zumeist geröstet und gesalzen angeboten (selten ohne Schale). Vor allem auf dem amerikanischen Markt

gibt es häufig auch ungesalzene oder rohe (nur getrocknete) Pistazien zu kaufen und im grünen (frischen) Zustand sind sie zumeist bei den Backzutaten zu finden. Da die Methode daraufhin abzielt, die geografische Herkunft in allgemeiner Handelsware zu erkennen, müssen die unterschiedlichen Darreichungsformen von Pistazien auf Unterschiedlichkeit in den Isotopenverhältnissen hin untersucht werden, um eine Vorstellung über ihre biologische Streubreite zu bekommen. Außerdem muss sichergestellt werden, dass die Stabilisotopenverhältnisse der Pistazienproben über den Untersuchungszeitraum hinweg stabil bleiben und nicht durch Alterung oder Nebenreaktionen fraktionieren. Mögliche Reaktionen, die das Stabilisotopenverhältnis verändern könnten, sind der Austausch oder die Reaktion mit der Umgebung (Luft, Lagerbehältnis) und Bakterien- oder Schimmelpilzbefall (Mikroorganismen selber, Ausscheidungsprodukte).
Desgleichen müssen die Stabilität der Chemikalien und die Alterung von Materialien bei einem Verfahren überprüft werden, sowie Faktoren wie Außentemperatur, -druck, Chargenwechsel von Chemikalien, Austausch von Bauteilen etc. beachtet werden. Zur Prüfung der (Verfahrens-) Stabilität eines Analysenverfahrens eignen sich sehr gut (Shewhart-) Mittelwert-Regelkarten, die die zeitlichen Veränderungen der Qualitätsmerkmale realisieren. Eine gute Stabilität eines Verfahrens liegt vor, wenn die Gesamtstandardabweichung der zulässigen Präzision genügt und die Standardabweichung zwischen den Serien maximal das Doppelte der Standardabweichung in der Serie beträgt.[102,107]

Daher werden in diesem Kapitel Geräte, Methoden, Materialien und Aufarbeitungsverfahren auf nachfolgende Punkte untersucht:

1. Kalibrierung der Arbeitsstandards,
2. Stabilitätsprüfung der Referenzgase,
3. Linearer Arbeitsbereich,
4. Voruntersuchungen von Pistazien,
5. In-House-Validierung der IRMS-Methode,
6. Prüfung der Öl-Extraktionsmethode,
7. Einfluss von Röstung und Salzung auf den δ-Wert.

Alle statistischen Auswertungen und Tests werden mit Hilfe der Software SPSS 12.0 auf dem 95 %-Wahrscheinlichkeitsniveau durchgeführt.

4.1 Kalibrierung der Arbeitsstandards

Die Grundvoraussetzungen eines Stoffes, der als Arbeitsstandard dienen soll, sind Homogenität und Stabilität, zudem sollte er preisgünstig, in genügend großen Mengen verfügbar und nicht giftig sein. Den praktischsten Arbeitsstandard stellen daher die Referenzgase dar. Außerdem bietet die ISODAT-Software zur Steuerung der IRMS-Geräte der Firma Finnigan die Möglichkeit, den δ-Wert für das Referenzgas vorzugeben, so dass bei jeder Messung gleich der δ-Wert der Probe bezogen auf den internationalen Standard bestimmt wird. Da die Einsatzfähigkeit und Stabilität der Referenzgase als Arbeitsstandards erst während dieser Arbeit geprüft wurde, wurden zur Sicherheit zusätzlich Feststoff-Arbeitsstandards (Acetanilid für die ^{13}C- und ^{15}N-Analytik im Dualgasmodus, Cellulose für die ^{18}O-Messungen) kalibriert und diese zusammen mit Gerätekontrollproben (GKP) in jeder Sequenz mitgeführt.

Durchführung:
Die zu kalibrierenden organischen Feststoffe und die entsprechenden Referenzgase wurden gegen zertifizierte Referenzmaterialen mehrfach in einer Sequenz vermessen und dies an verschiedenen Tagen wiederholt. Die Vergleichbarkeit der an den verschiedenen Tagen gemessenen Mittelwerte wurde anhand der ANOVA überprüft, ebenso die Normalverteilung und die Homogenität der Messwerte. Am Elementaranalysator wurden diese Messungen sowohl im Single- als auch im Dualgasmodus durchgeführt, um eventuelle Unterschiede zwischen diesen Einstellungen feststellen zu können. Die Kalibrierung wurde am Anfang jeder Messperiode (nach Umbau der Peripherien) erneut durchgeführt.

Die Kalibrierung der festen und gasförmigen Arbeitsstandards am Elementaranalysator erfolgte über eine Ein-Punkt-Kalibrierung mittels der IAEA-Referenzmaterialien. Das CO-Referenzgas des TC/EA's wurde über den Arbeitsstandard Cellulose kalibriert, da dessen δ-Wert den Proben am nächsten lag. Die Kalibrierung der Cellulose am TC/EA musste allerdings über eine Normierung erfolgen, da dieses Gerät nicht über weite δ-Wertbereiche linear misst (s. Anhang I: Berechnung des δ-Werts). Dazu wurden zwei Standards benötigt, jedoch existierten zu diesem Zeitpunkt für die Sauerstoffanalyse noch keine zertifizierten organischen Feststoffe. Daher wurde die Cellulose über die zwei vom δ-Wert am nahe liegensten, verfügbaren Wasser-Standards des Labors kalibriert, dem IAEA-Referenzmaterial VSMOW und einem Wasser-Arbeitsstandard der Gasbench.

Eine Richtigkeitsprüfung erfolgte anschließend für die Kalibrierungsergebnisse der Feststoff-Arbeitstandards mittels Proben bekannten δ-Werts (s. Kapitel 4.5.1).

Ergebnis:

Tabelle 7: Ergebnisse der Kalibrierung der Feststoff-Arbeitsstandards mittels IAEA-Referenzmaterialien

	$\delta^{13}C_{PDB}$ Acetanilid	$\delta^{15}N_{Air}$ Acetanilid	$\delta^{18}O_{SMOW}$ Cellulose
IAEA-Referenzmaterial	Polyethylenfolie	Kaliumnitrat	SMOW-Wasser Arbeitsstd.-Wasser
Kalibrierverfahren	Ein-Punkt-Kalibrierung	Ein-Punkt-Kalibrierung	Normierung
ermittelter δ-Wert	**-25,0 ‰**	**-8,6 ‰**	**31,3 ‰**
Standardabweichung s	0,10 ‰	0,07 ‰	0,43 ‰
Anzahl der Sequenzen	5	4	13
Anzahl der Messwerte n	49	39	63
Normalverteilungstest*	0,200	0,200	0,200
Varianzhomogenität*	0,330	0,567	0,934
ANOVA	0,994	0,051	0,101

* Test auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov, Test auf Homogeniät der Varianzen nach Levene

Tabelle 8: Ergebnisse der Referenzgas-Kalibrierung (Mittelwerte aus verschiedenen Standards und Sequenzen)

Gas	**Mode**	**Kalibrier-standards**	**1. Messperiode** δ-Wert ± s [‰]	**2. Messperiode** δ-Wert ± s [‰]	**3. Messperiode*** δ-Wert ± s [‰]
CO_2	Single	Polyethylenfolie NBS 22	**-28,4** ± 0,06		**-33,1** ± 0,07
CO_2	Dual	Polyethylenfolie NBS 22	**-28,3** ± 0,05	**-28,5** ± 0,10	**-33,0** ± 0,09
N_2	Dual	Kaliumnitrat Ammoniumsulfat	**-5,7** ± 0,14	**-5,7** ± 0,08	**-13,7** ± 0,09
CO	Single	Cellulose	**-2,6** ± 0,40	**-2,9** ± 0,29	

* Gasflaschenwechsel bei den Referenzgasen CO_2 und N_2

Es konnte gezeigt werden, dass die zwei Feststoffe Acetanilid und Cellulose dazu geeignet sind, als Arbeitsstandards für die $\delta^{13}C$-, $\delta^{15}N$- bzw. $\delta^{18}O$-Messung zu fungieren. Die Kalibrierung dieser Stoffe über mehrere Sequenzen an verschiedenen Tagen führt zu normalverteilten Werten und der Vergleich der Varianzhomogenitäten und Mittelwerte zwischen den Sequenzen liefert keine signifikanten Unterschiede auf dem 95 %-Signifikanzniveau (s. Tabelle 7). Zwischen den Einstellungen „Single-“ und „Dualgasmode“ am Elementaranalysator konnten keine Unterschiede in den erhaltenen Messwerten festgestellt werden.

Auch die Ermittlung der δ-Werte der Referenzgase führt zu Mittelwerten mit befriedigenden Standardabweichungen (s. Tabelle 8). Da die Eignung der Referenzgase als Arbeitsstandards über den Zeitraum dieser Arbeit erst getestet wurde (siehe dazu die Stabilitätsprüfung in Kapitel 4.2), kann an dieser Stelle keine statistische Beurteilung erfolgen.
In Tabelle 8 ist auch abzulesen, dass zu Beginn jeder neuen Messperiode die Referenzgase geringfügig nachkalibriert werden mussten, was an den unterschiedlichen δ-Werten zwischen der ersten und zweiten Messperiode zu erkennen ist. Dies kann nur durch eine Isotopendiskriminierung aufgrund des Referenzgas-Druckventils am ConFlo-Interface erklärt werden, denn nur diese Gasdruckventile wurden aufgrund des Peripheriegeräte- und damit Referenzgaswechsels verstellt. Außerdem ist bei der Verwendung der Referenzgase als Standard darauf zu achten, dass der ermittelte δ-Wert nur für die jeweilige Gasflasche gilt.

Anmerkung:
Die Richtigkeit des ermittelten δ-Werts der Cellulose muss mit Vorbehalt angesehen werden. Um die Nicht-Linearität des Messsystems durch einen Korrekturfaktor auszugleichen, wurde über eine Normierung kalibriert. Da jedoch zum Zeitpunkt der Kalibrierung noch keine zertifizierten Standards in den δ-Wertbereichen der Cellulose und der Proben (20-40 ‰) existierten, musste auf vorhandene Standards zurückgegriffen werden. Diese deckten aber nur einen Messbereich ab, der ca. 20 ‰ unter dem Probenmessbereich lag, so dass hierdurch möglicherweise ein Fehler eingetragen wurde. Eine weitere Fehlerquelle liegt wahrscheinlich auch in der Tatsache, dass der Feststoff Cellulose gegen flüssige (Wasser-) Standards kalibriert werden musste. Trotz dieser Unsicherheiten wurde der ermittelte $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Wert der Cellulose für die Probenvermessung verwendet, da dies die einzige Möglichkeit war, überhaupt zu kalibrieren und zu messen.

4.2 Stabilitätsprüfung der Referenzgas-Kalibrierung

Die Prüfung der Richtigkeit und der Stabilität der Referenzgas-Kalibrierung erfolgte über Qualitätsregelkarten mit Hilfe der Arbeitsstandards, die zur Sicherheit in jeder Sequenz mitgeführt wurden. Die Daten für den Sollwert und die Standardabweichung zur Berechnung der Kontroll- und Warngrenzen (±2s, ±3s) stammen aus der Kalibrierung der Arbeitsstandards gegen die IAEA-Referenzmaterialen (s. vorheriges Kapitel 4.1).

Ergebnis:

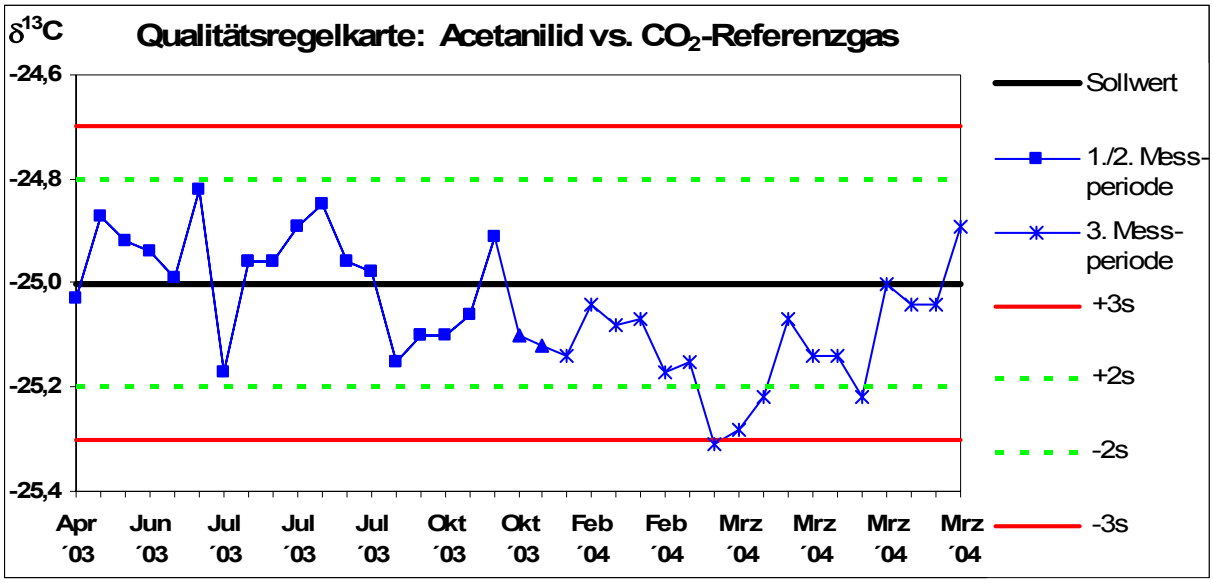


Abbildung 28: Qualitätsregelkarte Acetanilid zur Überprüfung der CO_2-Referenzgaskalibrierung

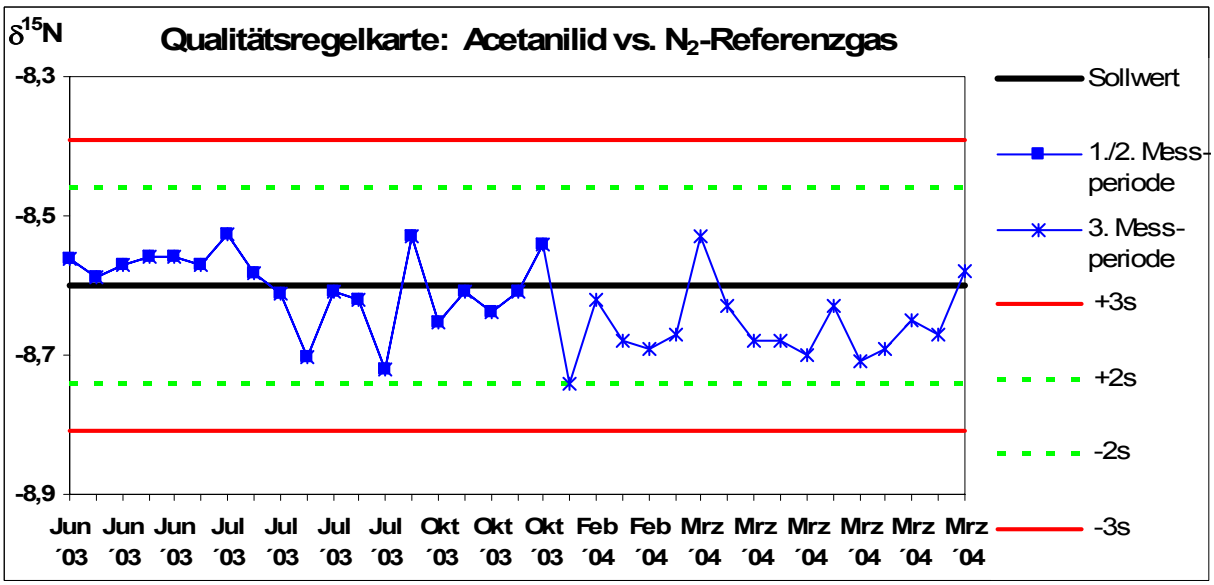


Abbildung 29: Qualitätsregelkarte Acetanilid zur Überprüfung der N_2-Referenzgaskalibrierung

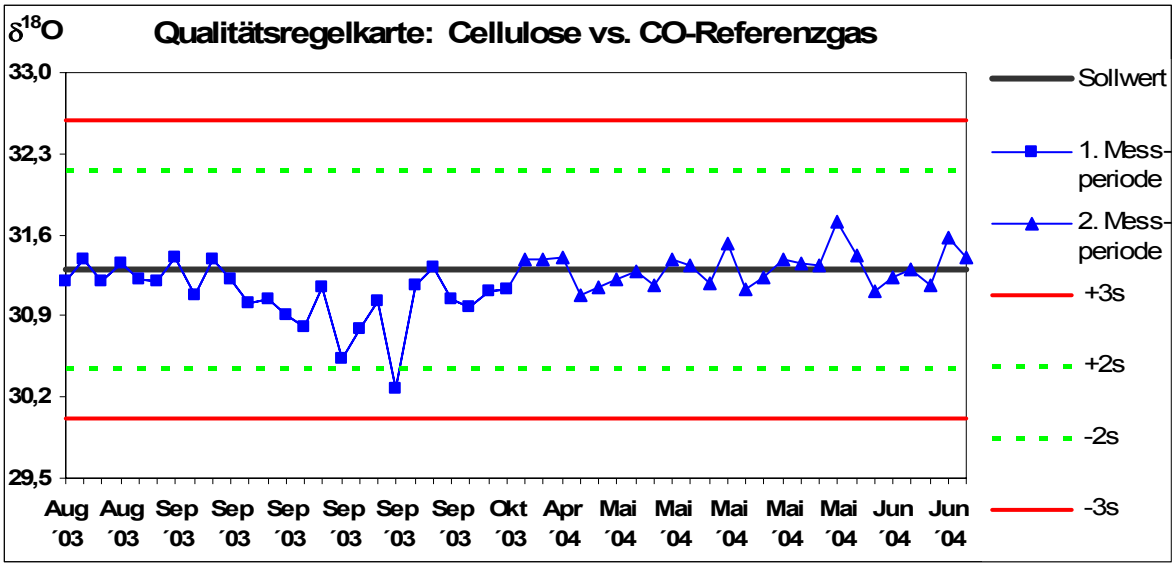


Abbildung 30: Qualitätsregelkarte Cellulose zur Überprüfung der CO-Referenzgaskalibrierung

Die erwünschte Stabilität der Referenzgase ist an den Qualitätsregelkarten (s. Abbildung 28-30) gut abzulesen: Die Messwerte der bei jeder Sequenz mitgeführten Arbeitsstandards streuen um den Mittelwert (Sollwert), es sind keine Trends erkennbar und die Messwerte liegen meistens innerhalb der Warngrenzen (±2s). Die Referenzgase eignen sich daher genauso gut als Bezugsstandards wie die Feststoff-Arbeitsstandards. Dadurch wird die aufwändige nachträgliche δ-Wertberechnung der Proben überflüssig, denn die IRMS-Gerätesoftware ISODAT kann die δ-Werte direkt bezogen auf den internationalen Standard ausgegeben.

4.3 Linearer Arbeitsbereich

Der lineare Arbeitsbereich eines IRMS-Geräts soll sich über einen Bereich von 2-7 V erstrecken und wird von der Firma Finnigan derart definiert, dass die bei steigender Konzentration resultierende Signal-Messwert-Gerade um nicht mehr als 0,06 ‰/V steigen darf.[11]

Durchführung:
Der lineare Arbeitsbereich des EA's und TC/EA's wurde jeweils mit Pistazie, entfetteten Rückstand und Pistazienöl bestimmt, um eventuelle Matrix-Unterschiede zu erkennen. Dazu wurden die Proben auf vier verschiedenen Konzentrationsniveaus jeweils fünffach vermessen.

Ergebnis:

Tabelle 9: Ermittelte lineare Arbeitsbereiche für die ^{13}C-, ^{15}N- und ^{18}O-Methode

		Pistazie	Rückstand	Öl
^{13}C	linearer Arbeitsbereich	5 – 8 V	2 – 6 V	3 – 8 V
	Steigung	0,07 ‰/V	0,02 ‰/V	0,07 ‰/V
^{15}N	linearer Arbeitsbereich	3 – 4 V	3 – 8 V	--
	Steigung	-0,06 ‰/V	0,00 ‰/V	--
^{18}O	linearer Arbeitsbereich	3 – 6 V	3 – 5 V	2 – 8 V
	Steigung	-0,01 ‰/V	0,04 ‰/V	0,13 ‰/V

Die Ergebnistabelle 9 zeigt für den EA (^{13}C- und ^{15}N-Methode), dass in den angegebenen Signalhöhen- bzw. Arbeitsbereichen in allen drei untersuchten Pistazienfraktionen die Messungen als linear zu bezeichnen sind. Die Spannweiten der Volt-Bereiche sind allerdings unterschiedlich, weil mit einer Probeneinwaage gleichzeitig sowohl das ^{13}C- als auch das ^{15}N-Ergebnis erzeugt wurde (die Dualgasmessung ist zeit- und kostengünstiger).
Der TC/EA (^{18}O-Methode) zeigt wesentlich engere lineare Arbeitsbereiche, weil es hier aufgrund von Nebenreaktionen in der IRMS-Quelle zu starken Linearitätseinbußen kommt, die auch das zugeführte Auxiliarygas (2 % H_2 in He) nicht ausgleichen konnte (s. Kapitel 3.3.4). Beim Pistazienöl zeigt sogar nur die nähere Umgebung einer Konzentration gleichartige δ-Werte. Hier könnten die veränderten Bedingungen bei der Verbrennung aufgrund der flüssigen Konsistenz des Öls und der stärkeren Zinnkapseln (Becher statt Folien) eine Rolle spielen. Da die Öle jedoch alle per Mikroliterspritze abgemessen werden und dies sehr gut reproduzierbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass alle Proben auf dem gleichen Konzentrationsniveau und damit unter gleichen Bedingungen vermessen wurden und der δ-Wert dadurch vergleichbar bleibt.

4.4 Voruntersuchungen von Pistazien

4.4.1 Streubreite innerhalb einer Handelsverpackung

Eine Pistazienprobe (z.B. eine Handelsverpackung) muss für die Untersuchung vermahlen werden, um einen Durchschnittswert der Gesamtprobe zu erhalten. Es ist daher wichtig vorher festzustellen, wie hoch die durch das Mischen mehrere Kerne erzeugte Streuung ist und wie viel Kerne gebraucht werden, um eine homogene, repräsentative Probe zu erhalten. Zur Feststellung der „biologischen Streubreite“ einer Pistazienprobe wurden daher einzelne Kerne einer Handelsverpackung vermahlen und auf ihre ^{13}C-, ^{15}N- und ^{18}O-Verhältnisse hin vermessen.

Durchführung:

Jeweils zehn einzelne Pistaziennüsse aus acht verschiedenen Handelsverpackungen unterschiedlicher Händler wurden auf ihr ^{13}C-, ^{15}N- und ^{18}O-Stabilisotopenverhältnis hin vermessen. Die daraus resultierende Gesamtstreuung der zehn Einzelnüsse einer Tüte wird jeweils mit einer vermahlenen 20 g-Probe derselben Tüte verglichen.

Ergebnis:

Tabelle 10: $\delta^{13}C$-Ergebnisse des Vergleichs der Standardabweichung von 10 einzelnen Pistaziennüssen und einer 20 g-Mischprobe derselben Tüte

$\delta^{13}C$		Tüte 1	Tüte 2	Tüte 3	Tüte 4	Tüte 5	Tüte 6	Tüte 7	Tüte 8
Einzelnüsse (n = 10)	x in [‰]	-26,59	-26,74	-27,25	-27,91	-27,20	-27,11	-28,11	-27,37
	s in [‰]	1,17	0,96	0,89	1,03	1,01	0,91	0,74	1,25
	S in [‰]	3,4	3,1	3,1	3,5	3,1	3,1	2,2	4,5
20 g (n = 3)	x in [‰]	-26,48	-27,22	-26,36	-26,54	-26,62	-26,56	-27,41	-26,56
	s in [‰]	0,16	0,03	0,08	0,09	0,04	0,14	0,06	0,12

Tabelle 11: $\delta^{15}N$-Ergebnisse des Vergleichs der Standardabweichung von 10 einzelnen Pistazien-nüssen und einer 20 g-Mischprobe derselben Tüte

$\delta^{15}N$		Tüte 1	Tüte 2	Tüte 3	Tüte 4	Tüte 5	Tüte 6	Tüte 7	Tüte 8
Einzelnüsse (n=10)	x in [‰]	4,55	1,74	9,27	3,64	2,18	1,33	0,84	4,75
	s in [‰]	2,26	2,52	1,75	2,36	1,96	2,17	0,91	1,98
	S in [‰]	6,5	6,4	5,7	7,1	5,7	7,6	2,6	5,3
20 g (n=3)	x in [‰]	3,97	0,41	10,00	3,70	1,53	2,55	1,02	5,11
	s in [‰]	0,13	0,03	0,11	0,26	0,08	0,15	0,13	0,35

Tabelle 12: $\delta^{18}O$-Ergebnisse des Vergleichs der Standardabweichung von 10 einzelnen Pistazien-nüssen und einer 20 g-Mischprobe derselben Tüte

$\delta^{18}O$		Tüte 1	Tüte 2	Tüte 3	Tüte 4	Tüte 5	Tüte 6	Tüte 7	Tüte 8
Einzelnüsse (n = 10)	x in [‰]	37,26	29,77	36,60	36,50	29,24	28,83	27,16	35,23
	s in [‰]	1,84	2,24	0,85	1,12	1,01	0,96	1,61	1,68
	S in [‰]	5,0	6,2	2,5	4,2	3,1	2,9	5,4	5,0
20 g (n = 4)	x in [‰]	36,87	26,95	36,44	35,37	27,51	28,66	27,92	36,01
	s in [‰]	0,72	0,27	0,34	0,63	0,37	0,12	0,57	0,50

Die resultierenden Standardabweichungen s und Spannweiten S aus zehn einzelnen Pistazienüssen einer Tüte sind mit bis zu 2 ‰ (s. Tabelle 10-12) bzw. 6 ‰ (s. Tabelle 12: $\delta^{18}O$-Reihe) recht hoch im Vergleich zu denen der Arbeitsstandards (s. Kapitel 4.1). Diese hohe (biologische) Streubreite ist jedoch nicht verwunderlich, denn bei Pistazien handelt es sich um ein natürlich gewachsenes Produkt, bei dem viele verschiedene äußere Faktoren (z.B. Versorgung, Standort, Reifungsgrad etc.) während des Wachstums auf die einzelnen Nüsse einwirken. Außerdem können Handelsproben Mischungen verschiedenster Chargen sein, d.h. der Einfluss verschiedener Gebiete (innerhalb eines Landes), unterschiedlicher Erntezeitpunkte, Sorten, Behandlungen etc. fließt mit ein. Durch das Vermahlen der einzelnen Nüsse (= 20 g Kerne) wird die resultierende Gesamtprobe so gut gemischt/homogenisiert, dass die Standardabweichungen weit unter 1 ‰ sinken und sich damit in den Größenordnungen der Arbeitsstandards bewegen. 20 g sind somit eine repräsentative Menge für eine Probe, die auch noch aus der kleinsten auf dem Markt erhältlichen Verpackungseinheit (50 g Pistazien mit Schale) gewonnen werden kann und sich mit einer normalen Labormühle zerkleinern lässt.

4.4.2 δ-Wert-Beziehungen zwischen einzelnen Pistazienbestandteilen

Bei Pistazien können drei Hauptbestandteile unterschieden werden: Schale, Haut und Kern. Für die Wahl des für die Untersuchung zu analysierenden Teils ist es daher wichtig zu wissen, ob sich diese drei Bestandteile in ihren Isotopenwerten signifikant voneinander unterscheiden.

Durchführung:

Schale, Haut und Kern einzelner Pistazien (geröstet und gesalzen, Iran und USA) wurden separat auf ihr ^{13}C-, ^{15}N- und ^{18}O-Isotopenverhältnis hin vermessen und die Differenzen zwischen Haut ↔ Kern und Schale ↔ Kern miteinander verglichen. Anschließend wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt.

Ergebnis:

Tabelle 13: Minimale, maximale und mittlere Differenz zwischen den δ-Werten von Haut ↔ Kern und Schale ↔ Kern aus der Untersuchung von einzelnen Pistaziennüssen

	$\delta^{13}C_{PDB}$ n=15	$\delta^{15}N_{Air}$ n=15	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ n=10
Min. Differenz Haut ↔ Kern	|1,19 ‰|	|1,01 ‰|	|2,65 ‰|
Max. Differenz Haut ↔ Kern	|1,61 ‰|	|1,09 ‰|	|7,30 ‰|
Mittelwert der Differenzen Haut ↔ Kern	|0,16 ‰|	|0,17 ‰|	|4,68 ‰|
Min. Differenz Schale ↔ Kern	|0,07 ‰|	*	|0,52 ‰|
Max. Differenz Schale ↔ Kern	|2,68 ‰|	*	|7,30 ‰|
Mittelwert der Differenzen Schale ↔ Kern	|1,34 ‰|	*	|4,25 ‰|

* Es ist kein N_2 in der Schale detektierbar.

Tabelle 14: Pearson-Korrelationsmatrix für $\delta^{13}C$ von Schale, Haut und Kern

^{13}C	Schale	Haut	Kern
Schale	1	0,857	0,628
Haut	0,857	1	**0,775**
Kern	0,628	**0,775**	1

Anzahl der Messungen: n=15

Abbildung 31: Lineare Regression zwischen $\delta^{13}C$ von Haut und Kern

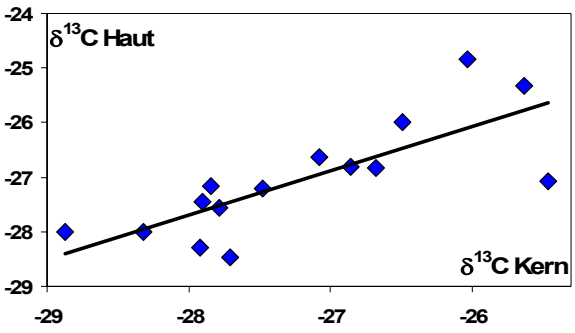


Tabelle 15: Pearson-Korrelationsmatrix für $\delta^{15}N$ von Haut und Kern

^{15}N	Haut	Kern
Haut	1	**0,986**
Kern	**0,986**	1

Anzahl der Messungen: n=15

Abbildung 32: Lineare Regression zwischen $\delta^{15}N$ von Haut und Kern

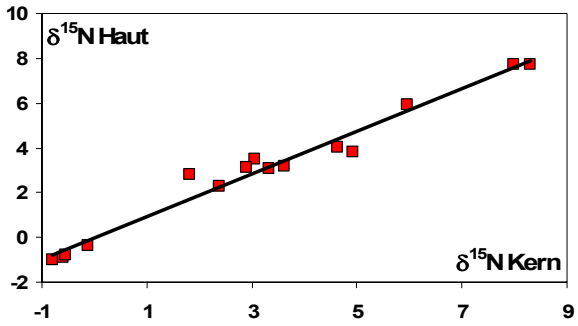
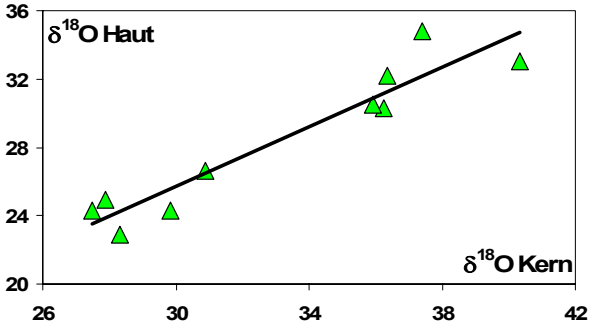


Tabelle 16: Pearson-Korrelationsmatrix für $\delta^{18}O$ von Schale, Haut und Kern

^{18}O	Schale	Haut	Kern
Schale	1	0,925	0,967
Haut	0,925	1	**0,949**
Kern	0,967	**0,949**	1

Anzahl der Messungen: n=15

Abbildung 33: Lineare Regression zwischen $\delta^{18}O$ von Haut und Kern



Die Untersuchung der Stabilisotopenverhältnisse im Kern, der Haut und der Schale von einzelnen Pistazienüssen hat ergeben, dass sich die drei Hauptbestandteile der Pistazie klar voneinander unterschieden. Dies ist an den großen Unterschieden in den Differenzen (>1 ‰) zwischen Haut ↔ Kern und Schale ↔ Kern zu erkennen (s. Tabelle 13) und daher dürften diese Bestandteile bei einer Messung nicht miteinander vermischt werden. Praktisch ist die vollständige Abtrennung der Pistazienhaut vom Kern einer gerösteten Pistazie jedoch nicht möglich und im Handel werden Pistazien ohne Haut (außer in der Form „grün“) auch gar nicht angeboten.

Die Korrelationsanalysen nach Pearson (s. Tabelle 14-16 und Regressionsgraden in Abbildung 31-33) zeigen jedoch, dass Kern und Haut einer Pistaziennuss in allen drei untersuchten Stabilisotopenverhältnissen hoch bis sehr hoch (Korrelationskoeffizient >0,7) miteinander korrelieren, d.h. der Isotopenwert des Kerns wird durch die Mischung mit der Haut nur proportional verschoben. Da außerdem der Anteil der Haut gegenüber dem Kern sehr gering ist, wurde entschieden, die Pistazie mit der Haut zu vermahlen und als Gemisch zur Isotopenanalyse einzusetzen.

Die Verwendung der Schalen entfiel aufgrund des fehlenden Stickstoffvorkommens, großer Probleme bei der Zerkleinerung durch ihre extreme Härte und weil im Handel Pistazien auch ohne Schale dargereicht werden.

4.5 In-House-Validierung der IRMS-Methode

4.5.1 Richtigkeit

Richtigkeit ist das Maß der Übereinstimmung zwischen einem ermittelten und einem als richtig angesehenen Wert. Man bezieht sich dabei auf einen Wert, der konventionell als fehlerfrei und somit als richtig gilt (z.B. zertifiziertes Referenzmaterial), da der wahre Wert prinzipiell nie bekannt sein kann. Hier bieten sich zur Überprüfung der ^{13}C-, ^{15}N- und ^{18}O-Methode die IAEA-Referenzmaterialien NBS22 (Öl), Ammoniumsulfat und der Wasserstandard der Gasbench an. Zur Prüfung auf die Richtigkeit kann ein Soll/Ist-Vergleich (*t*- Test) oder der Doerffel-Test durchgeführt werden.[107,122,166]

Durchführung:
Die Vergleichsmaterialien mit bekanntem δ-Wert werden in einer IRMS-Sequenz mehrmals wie eine unbekannte Probe vermessen, ihr δ-Wert über die allgemeine Formel (s. Anhang I: Berechnung des δ-Werts) mit den zuvor kalibrierten Arbeitsstandards (s. Kapitel 4.1) bestimmt und das Ergebnis mit ihrem Sollwert statistisch verglichen.

Sollwert-*t*-Test: Es wird überprüft, ob der Sollwert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % innerhalb des Vertrauensbereichs des Analysenergebnisses liegt (Formel s. Anhang I: Statistische Tests).[166]

Doerffel-Test: Es wird überprüft, ob zwischen dem Sollwert und dem gefundenen Mittelwert ein signifikanter Unterschied besteht. Ist die zu berechnende Ungleichung erfüllt, besteht kein Grund zur Annahme eines systematischen Fehlers (Formel s. Anhang I: Statistische Tests).[166]

Ergebnis:

Tabelle 17: Überprüfung der Methoden-Richtigkeit mittels der Arbeitsstandards und Proben bekannten δ-Werts

	^{13}C-Methode	^{15}N-Methode	^{18}O-Methode
Arbeitsstandard	Acetanilid	Acetanilid	Cellulose
Vergleichsmaterial	NBS 22	$(NH_4)_2SO_4$	GKP-Wasser
Herkunft der Vergleiche	IAEA	IAEA	Laborstandard
Sollwert μ	-29,7 ‰	0,4 ‰	-8,1 ‰
Mittelwert x	-29,6 ‰	0,4 ‰	-7,9 ‰
Standardabweichung s	0,21 ‰	0,08 ‰	0,50 ‰
Anzahl der Messwerte n	5	7	12
Sollwert-*t*-Test* $t_{Methode} \leq t_{Tabelle}$	**0,95 ≤ 2,78**	**0,95 ≤ 2,45**	**1,06 ≤ 2,20**
Doerffel-Test* $\lvert x-\mu \rvert < 1{,}5 \times s/\sqrt{n}$	**0,09 < 0,14**	**0,03 < 0,05**	**0,15 < 0,22**

* Zur Durchführung des Doerffel- und Sollwert-*t*-Tests siehe Anhang I: Statistische Tests

Die Ergebnistabelle 17 zeigt, dass mit allen drei Stabilisotopen-Messmethoden ein *t*-Wert erreicht wird, der kleiner als der zulässige Tabellenwert ist. Auch beim Doerffel-Test ist die Differenz zwischen dem Soll- und Ist-Wert kleiner als der zulässige Berechnungsterm. Somit wurden bei beiden Tests richtige Ergebnisse erzielt und keine signifikanten Unterschiede auf dem 95 %-Wahrscheinlichkeitsniveau zwischen dem Sollwert und dem gefundenem Mittelwert der Vergleichsmaterialien bekannten δ-Werts festgestellt. Es ist somit bewiesen, dass die δ-Wert-Bestimmung mit der ^{13}C-, ^{15}N- und ^{18}O-Methode zu richtigen Ergebnissen führt.

4.5.2 Präzision

Präzision ist bei einem festgelegten Ermittlungsverfahren das Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse untereinander unter vorgegebenen Bedingungen. Erfolgt die Ermittlung der Präzision unter Wiederholbedingungen (Wiederholbarkeit r / repeatability), so wird dieselbe Probe in kurzen Zeitabständen, in einer statistisch ausreichend großen Zahl ($n \geq 5$), mit demselben Verfahren, in demselben Labor, durch denselben Bearbeiter und derselben Geräteausrüstung vermessen. Werden die Ergebnisse durch dasselbe Verfahren und an identischem Material, aber mit verschiedenen Beobachtern, in verschiedenen Labors, mit verschiedener Geräteausrüstung gewonnen, so ermittelt man die Präzision unter Vergleichsbedingungen (Vergleichbarkeit R / reproducibility).[107,140,141,166]

Aufgrund der Neuheit der IRMS-Technik in der Lebensmittelchemie und der erst allmählichen Verbreitung der Geräte in der Routine sind auf dem Sektor der Isotopenanalytik Wiederhol- und Vergleichbarkeitsdaten von nur wenigen Lebensmitteln vorhanden. Offiziell validierte Methoden mit Ringversuchsabsicherung existieren bisher bei Wein,[271,272] Fruchtsaft,[8,60-63] Honig[9] und Ahornsirup[8].

Durchführung:

Die Wiederhol- und Vergleichbarkeit für die ^{13}C-, ^{15}N- und ^{18}O-Methode wurden jeweils an Pistazie, entfettetem Rückstand und Pistazienöl ermittelt, um eventuelle Unterschiede der Präzision zwischen den Fraktionen erkennen zu können. Dazu wurden die Proben jeweils sieben Mal an drei verschiedenen Tagen vermessen. Da unter den gegebenen Umständen die Ermittlung einer echten Vergleichspräzision nicht möglich war, wurde hier eine laborinterne Vergleichspräzision gemessen, indem die Analyse an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurde. Die Schätzung der Präzisionen erfolgte über die Wiederhol- bzw. Vergleichsstandardabweichungen (s_r, s_R), aus denen dann die Wiederhol- und Vergleichbarkeit (r, R) errechnet wurde (s. Anhang I: Statistische Grundformeln).

Ergebnis:

Tabelle 18: Ergebnisse der Ermittlung der Präzisionsdaten für die ^{13}C-Methode

^{13}C-Methode	**Pistazie**	**Rückstand**	**Öl**
x [‰] (n=3×7)	-27,56	-24,48	-29,59
s_r [‰]	0,126	0,213	0,081
s_R [‰]	0,126	0,213	0,101
r [‰]	0,35	0,60	0,23
$R_{laborintern}$ [‰]	0,35	0,60	0,28
Vergleiche[60,63,271] (direkte Verfahren)	Weinethanol: r = 0,24 R = 0,60	Orangensaftzucker: r = 0,26 R = 0,66	Orangensaftpulpe: r = 0,32 R = 1,03

Tabelle 19: Ergebnisse der Ermittlung der Präzisionsdaten für die ^{15}N-Methode

^{15}N-Methode	**Pistazie**	**Rückstand**	**Öl**
x [‰] (n=3×7)	2,02	2,09	--
s_r [‰]	0,170	0,109	--
s_R [‰]	0,176	0,113	--
r [‰]	0,48	0,31	--
$R_{laborintern}$ [‰]	0,49	0,32	--

Tabelle 20: Ergebnisse der Ermittlung der Präzisionsdaten für die ^{18}O-Methode

18O-Methode	Pistazie	Rückstand	Öl
x [‰] (n=3×7)	27,03	29,86	26,67
s_r [‰]	0,513	0,537	0,397
s_R [‰]	0,517	0,543	0,397
r [‰]	1,44	1,50	1,11
$R_{laborintern}$ [‰]	1,45	1,52	1,11
Vergleiche[61,272] (indirekte Verfahren)	Weinwasser: r = 0,24 R = 0,50	Apfelsaftwasser: r = 0,45 R = 0,58	

Bei allen drei Methoden ist zu erkennen, dass die laborinterne Vergleichsstandardabweichung s_R fast gleich der Wiederholstandardabweichung s_r ist, d.h. die Streuung zwischen den Serien/Tagen ist vernachlässigbar klein gegenüber der Streuung innerhalb einer Serie/eines Tages. Des Weiteren ist die geringere Streuung bei den Ölen gegenüber den Feststoffen auffällig, was sich auf die bessere Homogenität einer Flüssigkeit zurückführen lässt.

Beim Vergleich der Wiederholbarkeiten von Pistazie, Rückstand und Öl mit den angeführten validierten ^{13}C-Vergleichsmethoden (Weinethanol, Fruchtsaftzucker/-pulpe) ist zu erkennen, dass sie alle in vergleichbaren Größenordnungen liegen. Die erreichte Präzision mit der IRMS-^{13}C-Methode ist somit akzeptabel.
Für Stickstoff gibt es noch keine validierten Methoden zum Vergleich, jedoch liegen die erzielten Präzisionswerte in der Größenordnung der ^{13}C-Methode und werden daher ebenfalls als gut beurteilt.

Die ^{18}O-Methode weist sowohl im Vergleich mit der ^{13}C- und ^{15}N-Methode als auch mit den aufgeführten Vergleichsmethoden eine drei- bis fünffach höhere Wiederholbarkeit und laborinterne Vergleichbarkeit auf. Die erhöhte Streuung gegenüber den beiden anderen Methoden wird durch den TC/EA selber verursacht, der aufgrund von Nebenreaktionen eine geringere Messstabilität als der Elementaranalysator hat (s. Kapitel 3.3.4). Außerdem ist beim Vergleich mit den offiziellen Ringversuchsmethoden in Betracht zu ziehen, dass die Verbrennung der Probe zu Kohlenmonoxid mit dem TC/EA ein direktes Onlineverfahren ist, während der Sauerstoff bei den angeführten Wein- und Fruchtsaftwasser-Methoden indirekt über eine Equilibrierung mit Kohlendioxidgas gemessen wurde. Aufgrund des Fehlens einer validierten Vergleichsmethode ist die Beurteilung der erzielten Präzisionsdaten für die ^{18}O-Methode daher schwer. Da die Werte gegenüber den EA-Methoden jedoch nicht übergroß sind, wird hier davon ausgegangen, dass noch eine akzeptable Präzision vorliegt.

4.5.3 Prüfung der Laborpräzision

Für die Überprüfung der Laborpräzision standen weder ein zweites IRMS-Gerät noch ein anderer Anwender zur Verfügung,[166] daher wurde an einer internationalen Laborvergleichsuntersuchung teilgenommen, die von dem „Joint Research Centre" der Europäischen Kommission initiiert wurde. Innerhalb dieses „Proficiency Tests" konnte 2004 anhand eines Proteins die Leistungsfähigkeit der ^{13}C-Methode überprüft werden.

Ergebnis des Laborvergleichstests:

Proficiency Test:	*δ^{13}C-Gehalt eines Proteins*	
„wahrer" Wert:	X	= -23,31 ‰
Labormittelwert:	x_{Labor}	= -23,38 ‰
Zielstandardabweichung:	σ	= 0,25 ‰
Z-Score des Labors:	z_{Labor}	= -0,29

Das mit der laborinternen IRMS-Methode erzielte Ergebnis der internationalen Laborvergleichsuntersuchung liegt mit seinem Z-Score hervorragend am Mittelwert und innerhalb der Warngrenzen, d.h. mit der angewandten Analytik wurde den Anforderungen des Proficiency Tests entsprochen und es konnte auf diesem Wege zumindest für die ^{13}C-Methode eine gute Präzision / Anwendbarkeit nachgewiesen werden.

4.5.4 Stabilität / Alterungsstudie

Die Messstabilität einer Methode / eines Verfahrens und natürlich auch die Stabilität des Analyten selber müssen über den Zeitraum einer Analysenserie hinweg gewährleistet sein und sind daher auch innerhalb einer Validierungsstudie zu überprüfen. Hierfür eignen sich am besten Qualitätsregelkarten.

Durchführung:
Zur Erstellung der Qualitätsregelkarten wurden sog. Gerätekontrollproben in jeder IRMS-Messsequenz über die gesamte Analysenzeit hinweg mitgeführt. Die Stabilität des ^{13}C- und ^{15}N-Verfahrens wurden mit Hilfe von Atropin, die ^{18}O-Messung mit Benzoesäure überprüft. Nach zwanzig Messungen wurde jeweils der Mittelwert gebildet (Vorperiode) und dieser als Sollwert für die weiteren Messungen angesehen. Als obere/untere Warngrenze wurde der $\pm 2s_r$-Bereich (95,5 %), als obere/untere Kontrollgrenze der $\pm 3s_r$-Bereich (99,7 %) gewählt.

Zur Prüfung der Stabilität des Analyten über die Analysenzeit dieser Arbeit wurde eine Pistazienprobe frisch vermahlen auf ihre Stabilisotopenverhältnisse hin vermessen und diese Messungen in verschiedenen Zeitabständen wiederholt. Die Lagerung der Probe erfolgte in einem Plastikbehältnis im Kühlschrank.

Ergebnis „Verfahrensstabilität“:

Tabelle 21: Daten für die Qualitätsregelkarten zur Kontrolle der Verfahrensstabilität aus der Vorperiode

	^{13}C	^{15}N	^{18}O
Gerätekontrollprobe	Atropin	Atropin	Benzoesäure
Sollwert x (n = 20)	-29,05 ‰	-17,97 ‰	24,95 ‰
s_r (GKP)	0,149 ‰	0,119 ‰	0,238 ‰
s_r (Pistazie) aus Kap. 4.5.2	0,126 ‰	0,176 ‰	0,513 ‰

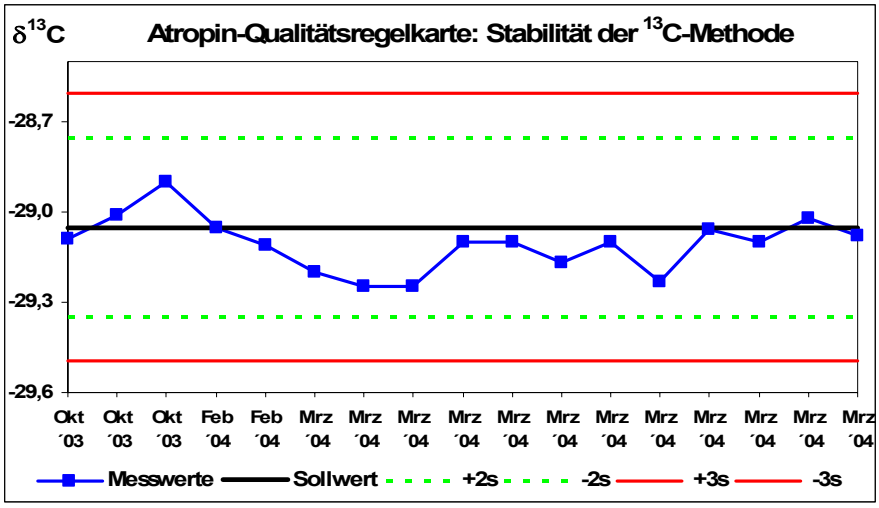


Abbildung 34: Qualitätsregelkarte von Atropin (GKP) zur Prüfung der Verfahrensstabilität der ^{13}C-Methode

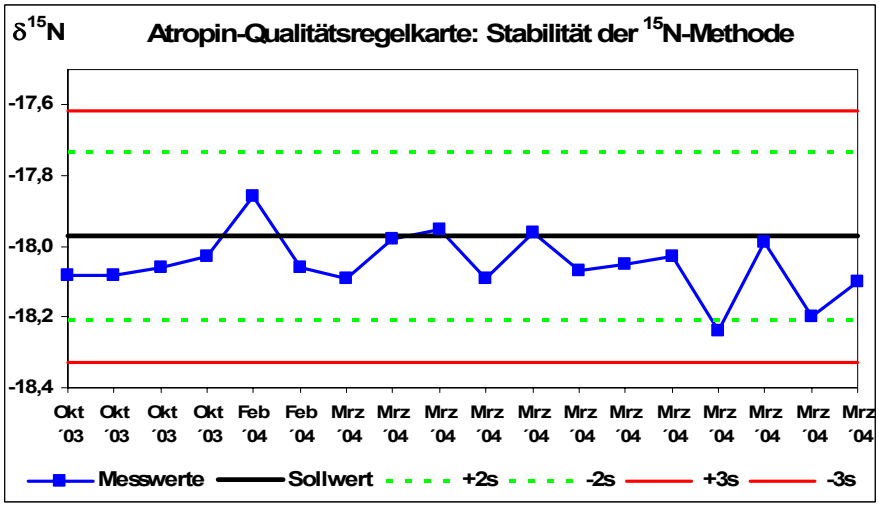


Abbildung 35: Qualitätsregelkarte von Atropin (GKP) zur Prüfung der Verfahrensstabilität der ^{15}N-Methode

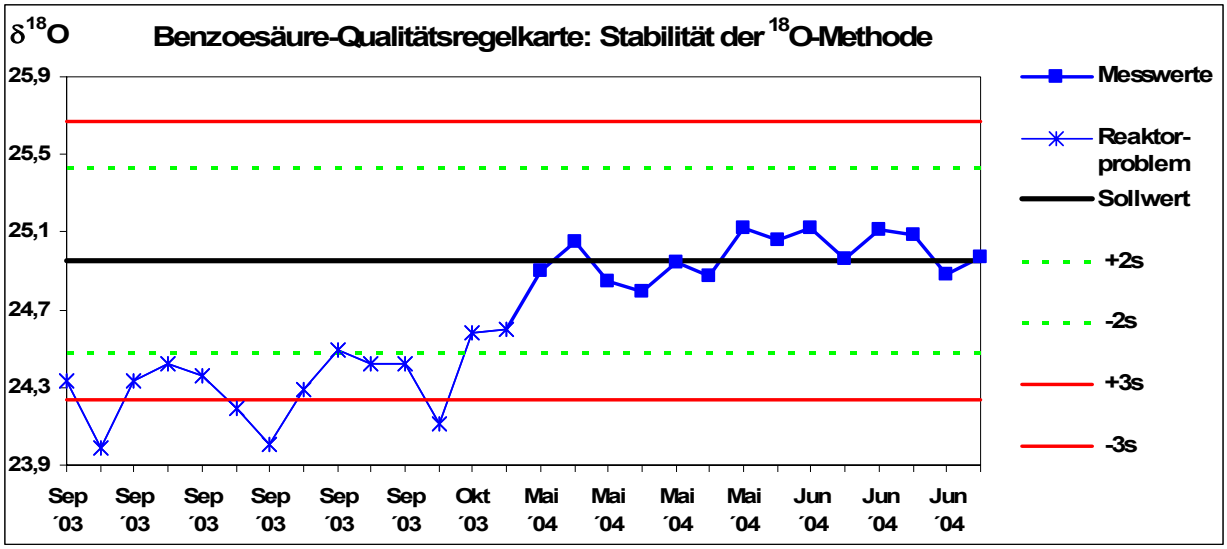


Abbildung 36: Qualitätsregelkarte von Benzoesäure (GKP) zur Prüfung der Verfahrensstabilität der ^{18}O-Methode

Ergebnis „Alterungsstudie“:

Tabelle 22: Ergebnisse der Alterungsstudie mit Pistazien

	$\delta^{13}C_{PDB}$	$\delta^{15}N_{Air}$		$\delta^{18}O_{VSMOW}$
frisch (n=5)	-26,8 ‰	0,4 ‰	**frisch** (n=4)	27,2 ‰
7 Monate alt (n=5)	-26,9 ‰	0,6 ‰	**1 Monat alt** (n=3)	27,2 ‰
18 Monate alt (n=5)	-27,0 ‰	0,7 ‰	**9 Monate alt** (n=5)	27,1 ‰
X aus den 3 Alterungsstadien	-26,88 ‰	0,56 ‰	**X** aus den 3 Alterungsstadien	27,16 ‰
s	0,076 ‰	0,150 ‰	**s**	0,056 ‰
s_r (Pistazie)	0,126 ‰	0,170 ‰	**s_r (Pistazie)**	0,513 ‰
Signifikanzwert ANOVA	**0,943**	**0,882**	**Signifikanzwert ANOVA**	**0,365**

Die Qualitätsregelkarten für die ^{13}C- und ^{15}N-Methode (s. Abbildung 34 und 35) zeigen über einen Zeitraum von ca. 1½ Jahren eine stabile Messung der Gerätekontrollproben an: Die Messwerte schwanken um den aus der Vorperiode errechneten Mittelwert (s. Tabelle 21) und treten nicht über die Kontrollgrenzen hinaus. Die Wiederholstandardabweichungen s_r des Atropins liegen außerdem in der Größenordnung der zulässigen Methodenpräzision der Pistazien (s. Tabelle 21) und bestärken somit die gute Verfahrensstabilität dieser beiden Methoden.

Auch die ^{18}O-Methode zeigt wie die beiden anderen Methoden alle Merkmale einer guten Verfahrensstabilität. Allerdings musste hier eine Periode von Messdaten aus der Präzisionsdatenberechnung herausgenommen werden, da die Werte ganz offensichtlich geringere ^{18}O/^{16}O-

Verhältnisse aufweisen (s. Abbildung 36). Diese Messwerte wurden nach einer Reaktorreinigung aufgenommen. Die δ-Werte verlagern sich wieder zu höheren Werten (Anfangswerte / Sollwerte), als der Reaktor erneut ausgebaut und gereinigt wurde. Daher hängen die niedrigen δ-Werte (Sep. ’03 – Okt. ’03) ganz offensichtlich mit einem Fehler bei der Reaktorreinigung zusammen. Die mit diesem Reaktor vermessenen Proben wurden allerdings nicht korrigiert, da dieses Phänomen nur bei der Benzoesäure zu beobachten war und weder beim Arbeitsstandard Cellulose (s. Kapitel 4.2, Abbildung 30) noch bei den zusätzlich mitgeführten Matrix-Gerätekontrollproben (Pistazie, Rückstand und Öl) auftrat (nicht dargestellt). Offensichtlich hatte der durch die Reinigung des Reaktors eingeführte Fehler nur Auswirkungen auf die Verbrennung der Benzoesäure.

Es zeigt sich außerdem bei allen drei Stabilisotopenverhältnissen, dass zu keinem der untersuchten Lagerzeitpunkte (18 bzw. 9 Monate) der Pistazienprobe ein signifikanter Mittelwertunterschied im δ-Wert auf dem 95 %-Signifikanzniveau auftritt, da p immer >0,05 ist (ANOVA-Signifikanzwert). Außerdem ist die Standardabweichung s zwischen den δ-Werten der drei Lagerzeitpunkte kleiner als die Wiederholstandardabweichung s_r der Methode, d.h. sie genügt der Methodenpräzision. Eine vermahlene Pistazienprobe ist somit über die betrachteten Zeiträume hinweg stabil.

4.6 Prüfung der Öl-Extraktionsmethode

Neben der Untersuchung des Pistazienkerns im Ganzen, wurde auch von allen Proben das Pistazienöl und der nach der Extraktion verbleibende entfettete Rückstand auf die Isotopenverhältnisse hin untersucht. Hierdurch soll in der späteren statistischen Auswertung geklärt werden, ob eine Verschärfung der Trennung der Herkunftsländer aufgrund von Sekundärstoffwechselvorgängen in der Pflanze in den Messwerten auftritt. Bei der Auswahl des Verfahrens zur Gewinnung des Öls und des entfetteten Rückstands wurde in erster Linie darauf geachtet, dass es diskriminierungsfrei arbeitet, denn sonst wird das Stabilisotopenverhältnis stark verfälscht. Da sehr viele Proben aufgearbeitet werden mussten, sollte die Aufarbeitungsmethode außerdem einfach, schnell und automatisierbar sein.

4.6.1 Diskriminierungsstudie anhand der Soxhletmethode

Durchführung:

Zur Sicherstellung einer diskriminierungsfreien Extraktion des Pistazienöls wurden zwei Haushaltsöle einer Soxhlet-Extraktion mit Petrolbenzin[209] unterzogen und die Stabilisotopendaten vor und nach der Extraktion gemessen.

Ergebnis:

Tabelle 23: Vergleich der δ-Werte zweier Öle vor und nach Soxhlet-Extraktion

	$\delta^{13}C_{PDB}$ Öl 1	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Öl 1	$\delta^{13}C_{PDB}$ Öl 2	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Öl 2
$x_{vor\ der\ Extraktion}$	-27,5 ‰	22,4 ‰	-13,3 ‰	20,8 ‰
$x_{nach\ der\ Extraktion}$	-27,5 ‰	22,9 ‰	-13,3 ‰	21,2 ‰
Kritische Grenze CD*	Kein	$n_{vor}=4$, $n_{nach}=6$	Kein	$n_{vor}=5$, $n_{nach}=5$
$\lvert x_{vorher}-x_{nachher}\rvert \leq CD$	Unterschied	**0,5 ≤ 0,5**	Unterschied	**0,4 ≤ 0,5**

* Zur Berechnung der kritischen Grenze CD zwischen zwei Werten s. Anhang I: Statistische Grundformeln

Aus der Ergebnistabelle 23 ist zu entnehmen, dass keine Diskriminierung durch das Extraktionsverfahren nach Soxhlet bei der ^{13}C-Messung zu beobachten ist, denn die Mittelwerte vor und nach der Extraktion beider Öle sind gleich.

Obwohl die Mittelwerte beim Sauerstoffisotop vor und nach der Extraktion differieren, konnte auch hier statistisch keine Diskriminierung durch die Soxhlet-Extraktion festgestellt werden. Hierzu wurde der Vergleich mit der kritischen Grenze herangezogen, der zeigt, dass die Mittel-

werte um einen von der Methodenpräzision her zulässigen Betrag differieren. Die Ölextraktionsmethode nach Soxhlet arbeitet somit diskriminierungsfrei und ist für die Isotopenanalytik geeignet. Dies war auch zu erwarten, da die Wirkungsweise einer Flüssig-Flüssig-Extraktionen auf der Chemie der Moleküle beruht und nicht auf deren physikalischen Eigenschaften, die verantwortlich für kinetische und thermodynamische Isotopeneffekte sind (siehe Kapitel 3.2). Auch andere Autoren haben schon eine Diskriminierungsfreiheit für die Flüssig-Flüssig-Extraktion festgestellt.[11,28,54]

4.6.2 Vergleich der Soxhlet-Methode mit der ASE

Die Extraktionsmethode nach Soxhlet ist eine traditionelle, validierte Methode, um Fett aus verschiedensten Lebensmitteln diskriminierungsfrei (s. vorheriges Kapitel 4.6.1) zu extrahieren.[38] Die Soxhlet-Extraktion war jedoch unter den gegebenen Laborbedingungen nicht automatisierbar, daher sollte die Ölextraktion aus den Pistazien auf die vollautomatische Extraktion mit der ASE-Technik (**A**ccelerated **S**olvent **E**xtraction) umgestellt werden. Da dem Soxhletverfahren schon Diskriminierungsfreiheit nachgewiesen wurde, musste eine ASE-Methode erstellt werden, die quantitativ vollständig extrahiert und gleiche Ergebnisse wie das Soxhletverfahren liefert.

Durchführung:
Eine Pistazienprobe wurde parallel nach Soxhlet und mit einer optimierten ASE-Methode extrahiert und die gewonnenen Öle und entfetteten Rückstände auf ihre Gleichheit in den C-, N- und O-Stabilisotopenverhältnissen hin überprüft.

Ergebnis:

Tabelle 24: Vergleich der δ-Wert-Ergebnisse nach der Extraktion mit der Soxhlet- und der ASE-Methode

	$\delta^{13}C_{PDB}$ Rückstand	$\delta^{15}N_{Air}$ Rückstand	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Rückstand	$\delta^{13}C_{PDB}$ Öl	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Öl
$x_{Soxhletverfahren}$ (n=2)	-24,4 ‰	8,5 ‰	39,3 ‰	-29,0 ‰	38,0 ‰
$x_{ASE\text{-}Methode}$ (n=2)	-24,3 ‰	8,5 ‰	39,2 ‰	-28,9 ‰	37,7 ‰
Kritische Grenze CD* $\lvert x_{Soxhlet}-x_{ASE}\rvert \leq CD$	**0,1 < 0,4**	**0,0 < 0,2**	**0,1 < 1,1**	**0,1 < 0,2**	**0,3 < 0,8**

* Zur Berechnung der kritischen Grenze CD zwischen zwei Werten s. Anhang I: Statistische Grundformeln

Der Vergleich der Mittelwertdifferenzen mit der jeweiligen kritischen Grenze CD zeigt (s. Tabelle 24), dass die Stabilisotopenverhältnisse der extrahierten Öle und entfetteten Rück-

stände nur um einen methodenpräzisionszulässigen Wert schwanken. Damit unterscheiden sich die mit dem ASE-Verfahren ermittelten δ-Werte nicht von denen aus der Soxhletextraktion. Das ASE-Verfahren zur Gewinnung von Pistazienöl und dem entfetteten Rückstand arbeitet somit auch diskriminierungsfrei und ist als Probenaufarbeitungsmethode für die IRMS geeignet.

4.6.3 Wiederholbarkeit der Extraktionsmethode

Die Ölextraktionsmethode mit der ASE muss auf ihre Wiederholbarkeit hin überprüft werden, um den Fehlerbeitrag der Aufarbeitung zur Gesamtmethode abschätzen zu können.

Durchführung:

Eine Pistazienprobe wurde sechsmal mit der ASE extrahiert und die gewonnenen Öle und entfetteten Rückstände auf ihr ^{13}C-, ^{15}N- und ^{18}O-Isotopenverhältnis hin fünffach vermessen.

Ergebnis:

Tabelle 25: Ergebnisse des Vergleichs der Mittelwerte (n = 5) von sechs ASE-Extraktionen einer Pistazienprobe

δ-Werte in [‰]	**$\delta^{13}C_{PDB}$ Rückstand**	**$\delta^{15}N_{Air}$ Rückstand**	**$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Rückstand**	**$\delta^{13}C_{PDB}$ Öl**	**$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Öl**
Extraktion 1	-24,8 ± 0,13	2,1 ± 0,18	30,0 ± 0,38	-29,6 ± 0,06	26,4 ± 0,27
Extraktion 2	-24,7 ± 0,17	2,1 ± 0,03	30,3 ± 0,49	-29,6 ± 0,04	26,3 ± 0,18
Extraktion 3	-24,8 ± 0,22	2,0 ± 0,14	30,6 ± 0,46	-29,5 ± 0,02	26,2 ± 0,51
Extraktion 4	-25,0 ± 0,40	2,1 ± 0,21	30,0 ± 0,64	**-29,3 ± 0,06**	**26,8 ± 0,11**
Extraktion 5	-24,8 ± 0,31	2,1 ± 0,11	30,1 ± 0,21	-29,6 ± 0,06	26,3 ± 0,18
Extraktion 6	-24,6 ± 0,23	2,0 ± 0,15	30,4 ± 0,52	-29,5 ± 0,07	26,1 ± 0,30
Mittelwert	-24,8	2,1	30,2	-29,5	26,3
s_r (Versuch)	0,26	0,15	0,48	0,05	0,31
s_r (Labor)	0,21	0,11	0,54	0,08	0,40
Levene-Test* zw. Extraktion 1-6	0,556	0,246	0,397	0,137	0,299
ANOVA* zw. Extraktion 1-6	0,457	0,777	0,420	0,246	0,793
Post-Hoc-Tests* zw. Extraktion 1-6	kein signifikanter Unterschied	kein signifikanter Unterschied	kein signifikanter Unterschied	kein signifikanter Unterschied	kein signifikanter Unterschied

fett Ausreißer nach zweiseitigem Grubbs-Test (P = 95 %) und durch die Post-Hoc-Tests erkannter Verursacher eines signifikanten Mittelwertunterschieds ($p < 0,05$) bei der ANOVA ⇒ Werte wurden in die weiteren Berechnungen nicht mit einbezogen.

* Test auf Homogenität der Varianzen nach Levene, Vergleich der Mittelwerte mittels einfaktorieller ANOVA (P = 95 %) und Post-Hoc-Mehrfachvergleiche nach Scheffé, Tukey und LSD

Die Messwerte des Öls der Extraktion 4 wurden aus den statistischen Berechnungen herausgenommen, weil sie mit dem zweiseitigen Grubbs-Test (s. Anhang I: Statistische Tests) als Ausreißer erkannt wurden. Hier scheint ein Fehler nach der Extraktion gemacht worden zu sein, da nur das Öl und nicht der Rückstand betroffen ist. Dies kann z.B. durch Eintrag einer Verunreinigung beim Trocknen oder Umfüllen passiert sein.
Abgesehen von diesem Ausreißer beim Öl, ergibt sich aus den Mittelwerten der ^{13}C-, ^{15}N- und ^{18}O-Messung der Rückstände wie auch der Öle, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den sechs Extraktionen bestehen, d.h. mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit gehören diese Werte zu einer Grundgesamtheit.
Die Wiederholstandardabweichungen s_r (Versuch) der Extraktionen liegen zudem in der gleichen Größenordnung wie die im Rahmen der In-House-Validierung ermittelten Wiederholstandardabweichungen s_r (Labor) (s. Kapitel 4.5.2). Die Abweichungen zwischen den sechs Extraktionen sind somit nicht größer als die Methodenpräzision zulässt und die Reproduzierbarkeit der Extraktion mit der ASE-Technik zur Gewinnung des Pistazienöls und des entfetteten Rückstands ist daher gegeben.

4.7 Einfluss von Röstung und Salzung auf den δ-Wert

Pistazien durchlaufen viele Verarbeitungsschritte, bevor sie getrocknet, geröstet oder geröstet & gesalzen in den Handel gelangen. Die beiden diskriminierungsverdächtigsten Schritte sind dabei das Rösten und Salzen, daher wurde dies im Laborversuch nachgestellt und untersucht.

Durchführung:

Eine als „roh“ (getrocknet) gekaufte Ware wurde frisch, nach zwei verschieden langen Röstungszeiten (Unterschied: ¼h, Spannweite laut verwendetem Rezept s. Kapitel 9.3.6) und nach Salzung & Röstung auf ihr Isotopenverhältnis hin untersucht.

Ergebnis:

Tabelle 26: Einfluss des Röstens und Salzens auf den $\delta^{13}C_{PDB}$-Wert

$\delta^{13}C_{PDB}$	**Pistazie** (n = 3)	**Rückstand** (n = 3)	**Öl** (n = 2)
roh/getrocknet	-27,8 ‰	-25,8 ‰	-29,8 ‰
Röstung 1½h	-27,6 ‰	-24,5 ‰	-29,2 ‰
Röstung 1¾h	-27,6 ‰	-24,9 ‰	-29,4 ‰
Salzung + Röstung 1½h	-27,5 ‰	-24,4 ‰	-29,3 ‰
Salzung + Röstung 1¾h	-28,5 ‰	-25,4 ‰	-30,2 ‰
Mittelwert X aus den 5 Verarbeitungsstadien	-27,8 ‰	-25,0 ‰	-29,6 ‰
Standardabweichung s	0,41 ‰	0,60 ‰	0,41 ‰
s_r (^{13}C-Methode)	0,13 ‰	0,21 ‰	0,08 ‰
F-Test $(s^2/s_r^2 < \chi^2_{(0,95;f)}/f)$	**10,4 ≠< 2,4**	**7,8 ≠< 2,4**	**26,2 ≠< 2,4**
Signifikanz ANOVA*	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**

* Voraussetzung der Varianzhomogenität (Levene-Test) ist gegeben

Tabelle 27: Einfluss des Röstens und Salzens auf den $\delta^{15}N_{Air}$-Wert

$\delta^{15}N_{Air}$	**Pistazie** (n = 3)	**Rückstand** (n = 3)
roh/getrocknet	1,0 ‰	1,2 ‰
Röstung 1½h	1,2 ‰	1,4 ‰
Röstung 1¾h	0,6 ‰	0,9 ‰
Salzung + Röstung 1½h	0,7 ‰	0,6 ‰
Salzung + Röstung 1¾h	1,1 ‰	1,0 ‰
Mittelwert X aus den 5 Verarbeitungsstadien	0,9 ‰	1,0 ‰
Standardabweichung s	0,26 ‰	0,30 ‰
s_r (^{15}N-Methode)	0,17 ‰	0,11 ‰
F-Test $(s^2/s_r^2 < \chi^2(0,95;f)/f)$	**2,3 < 2,4**	**7,7 ≠< 2,4**
Signifikanz ANOVA*	**< 0,001**	**< 0,001**

* Voraussetzung der Varianzhomogenität (Levene-Test) ist gegeben

Tabelle 28: Einfluss des Röstens und Salzens auf den $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Wert

$\delta^{18}O_{SMOW}$	**Pistazie** (n = 4)	**Rückstand** (n = 4)	**Öl** (n = 3)
roh/getrocknet	27,8 ‰	29,8 ‰	27,6 ‰
Röstung 1½h	29,2 ‰	30,6 ‰	27,9 ‰
Röstung 1¾h	28,6 ‰	30,1 ‰	27,7 ‰
Salzung + Röstung 1½h	28,7 ‰	30,4 ‰	27,8 ‰
Salzung + Röstung 1¾h	27,8 ‰	29,8 ‰	27,5 ‰
Mittelwert X aus den 5 Verarbeitungsstadien	28,4 ‰	30,1 ‰	27,7 ‰
Standardabweichung s	0,61 ‰	0,36 ‰	0,16 ‰
s_r (^{18}O-Methode)	0,51 ‰	0,54 ‰	0,40 ‰
F-Test $(s^2/s_r^2 < \chi^2(0,95;f)/f)$	**1,4 < 2,4**	**0,4 < 2,4**	**0,2 < 2,4**
Signifikanz ANOVA*	**0,206**	**0,062**	**0,014**

* Voraussetzung der Varianzhomogenität (Levene-Test) ist gegeben

Die Ergebnistabellen 26 und 27 zeigen, dass bei gegebener Varianzhomogenität mit dem Mittelwertvergleichstest (ANOVA) ein deutlich signifikanter Unterschied zwischen den fünf Verarbeitungsstadien in den Messwerten des ^{13}C- und ^{15}N-Verhältnisses der Pistazie, des entfetteten Rückstands und des Öls festzustellen ist. Dies bestätigt auch der F-Test, bei dem der Unterschied der Standardabweichung s des Versuchs gegen die gegebene Wiederholstandardabweichung s_r der jeweiligen Methode getestet wird. Die Hypothese, dass s und s_r aus einer Grundgesamtheit

stammen, muss immer abgelehnt werden (Ausnahme δ^{15}N-Wert der Pistazie: er liegt knapp unter der χ^2-Prüfgröße).
Der signifikante Mittelwertunterschied besteht nicht nur zwischen allen fünf Verarbeitungsstadien, sondern auch beim Vergleich der einzelnen Stadien untereinander (Ergebnisdaten nicht aufgeführt). Daraus ist abzuleiten, dass die Röstung an sich, die Röstungsdauer und auch die Salzung das ^{13}C- und ^{15}N-Isotopenverhältnis beeinflussen. Die Änderungen in den Isotopenverhältnissen finden dabei stärker in den Bestandteilen des entfetteten Rückstands (Zucker, Proteine) statt, denn die Spannweiten zwischen den Verarbeitungsschritten sind hier deutlich größer als beim Öl.

Die Unterschiede zwischen den fünf Verarbeitungsstadien in den δ^{18}O-Werten werden außer beim Öl statistisch von der ANOVA nicht als signifikant angezeigt, gleichermaßen zeigt der F-Test, dass die Standardabweichung s des Versuchs und die Wiederholstandardabweichung s_r der jeweiligen Methode nicht aus verschiedenen Gruppen stammen (s. Tabelle 28). Es können jedoch gleiche Trends in den Messwertveränderungen (steigende/fallende Tendenzen) wie bei den beiden anderen Elementen beobachtet werden. Daher ist anzunehmen, dass auch das Sauerstoffisotopenverhältnis von Röstung und Salzung beeinflusst wird, dies jedoch durch die gerätebedingte höhere Streuung des TC/EA's statistisch nicht erkannt wird.

Mit diesem Laborversuch wurde somit nachgewiesen, dass die Röstung und Salzung das Isotopenverhältnis beeinflusst, und zwar schon aufgrund nur einer Rösttemperatur (160 °C) und zwei verschiedenen Röstzeiten, die sich nur um eine Viertelstunde unterscheiden.
Bei Handelsware kann nun von vielen verschiedenen Herstellungs-/Verarbeitungsvarianten ausgegangen werden, die das Isotopenverhältnis nachhaltig verändern bzw. die Isotopen diskriminieren. Dieser Fehlerbeitrag ist jedoch gering (s_{max} in diesem Laborversuch = 0,6 ‰) im Vergleich mit der Standardabweichung, die zwischen Nüssen einer Tüte besteht (s_{max} = 2,5 ‰, s. Kapitel 4.4.1). Neben der hier untersuchten Verarbeitung fließen in die sog. „biologische Streubreite" noch viele andere, natürliche Faktoren (Sorte, Gebiet etc.) ein, die den Fehler erhöhen. Die „biologische Streubreite" ist somit viel höher als der in diesem Versuch festgestellte Fehler, der durch die Verarbeitung eingetragen wird. Daher sind die herstellungsbedingten Unterschiede im Isotopenverhältnis insgesamt gesehen vernachlässigbar klein und die Proben bleiben vergleichbar.

5.

Ergebnisteil II: Univariate Statistik

5.1 Übersicht über das Probenmaterial

Es wurden insgesamt 164 Pistazienproben untersucht, von denen 101 authentisch sind und 63 im Handel gekauft wurden. Bei den authentischen Pistazien handelt es sich um Proben aus den beiden Hauptanbauländern USA und Iran, die direkt von Herstellern und Farmen bezogen oder im Land selbst gekauft wurden. Türkische Pistazien wurden ebenfalls in die Untersuchung mit einbezogen, da sie häufig auf dem deutschen Markt zu finden sind und bei ihnen, ebenso wie bei den iranischen Pistazien, Einfuhrauflagen wegen der Aflatoxinproblematik bestehen. Eine Direktverbindung in die Türkei für den Bezug authentischer Ware konnte leider nicht hergestellt werden, daher wurden die Pistazien größtenteils in türkischen Läden in Berlin gekauft und diese Handelsproben als authentisch angesehen. Zur besseren Übersicht veranschaulicht Abbildung 37 das in dieser Arbeit untersuchte Probenmaterial in einem Organigramm. Eine genaue Auflistung der einzelnen Proben mit Angaben über ihre Herkunft, Verarbeitung und den δ-Mittelwerten sind in Kapitel 9.1 und im Anhang III zu finden.

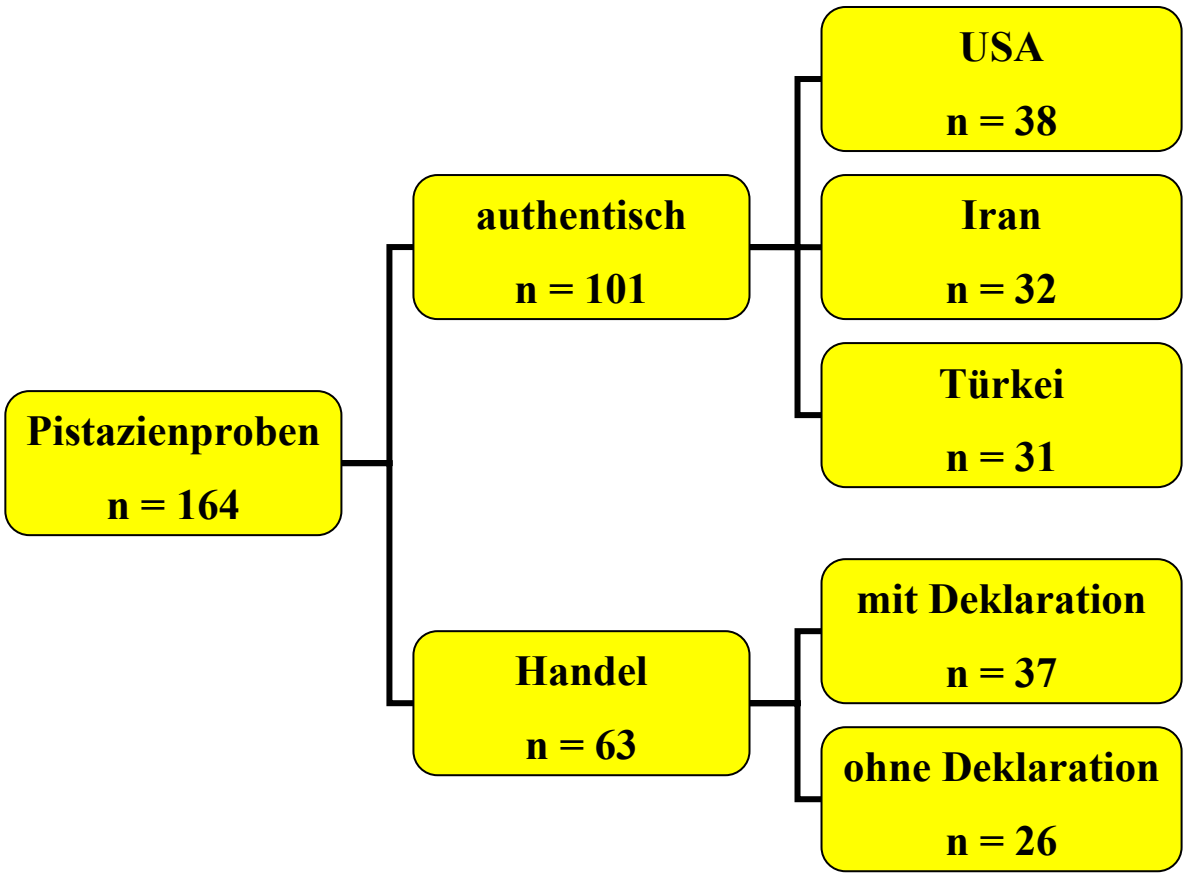


Abbildung 37: Überblick über das untersuchte Probenmaterial

5.2 Box-Plot-Betrachtung des authentischen Datenmaterials

Der Box-Plot ist eine zusammenfassende grafische Darstellung der Verteilung von Messwerten. Die Länge der Box ist der Abstand zwischen dem 25. und 75. Perzentil und visualisiert gleichzeitig den Streubereich dieser Werte. 50 % der Proben haben Werte innerhalb der Box und die innere Linie repräsentiert den Median. Der kleinste und größte beobachtete Wert, die keine Ausreißer sind, werden jeweils durch einen waagerechten auf einem senkrechten Strich gekennzeichnet. Werte, die um mehr als anderthalb Kastenlängen außerhalb liegen, sind Ausreißer und werden mit einem Kreis gekennzeichnet. Werte, die um mehr als drei Kastenlängen außerhalb liegen, gelten als Extremwerte und werden im Box-Plot mit einem Stern markiert.[37,132]

Durchführung:

Die Box-Plots der δ-Messwerte des authentischen Pistaziendatensatzes (getrennt nach Herkunftsländern und Isotopen) wurden mit Hilfe der Statistik-Software SPSS 12.0 erstellt. Die Probennummern in den Grafiken korrespondieren mit denen der Probenlisten in Kapitel 9.1 und im Anhang III.

Ergebnis:

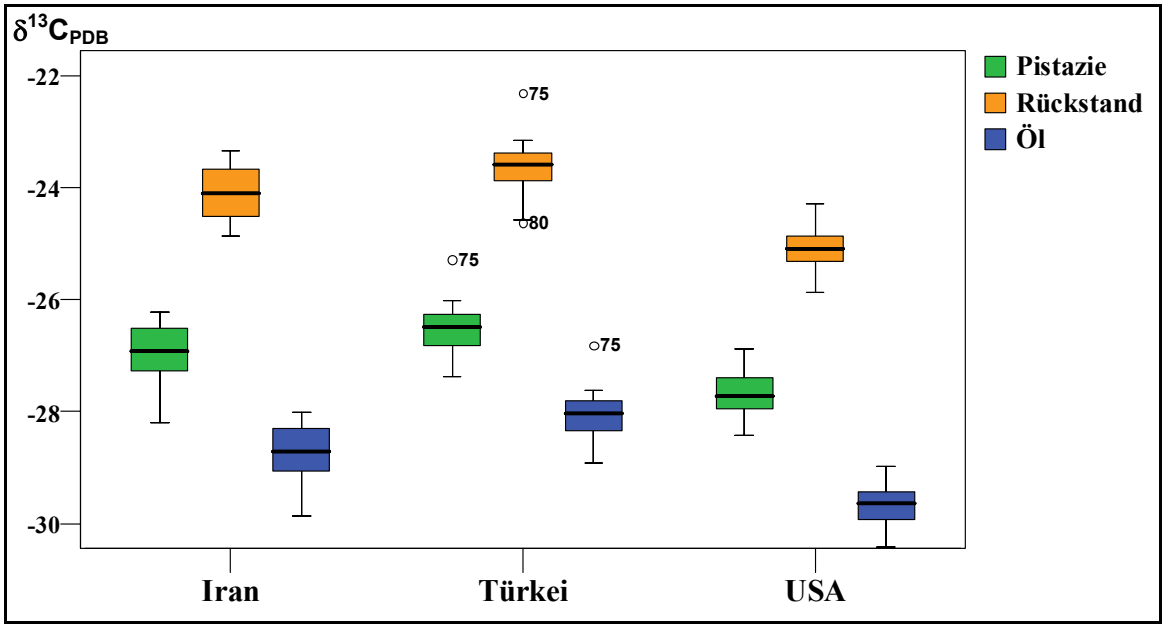


Abbildung 38: Box-Plot-Darstellung der $\delta^{13}C$-Messwerte des authentischen Datensatzes

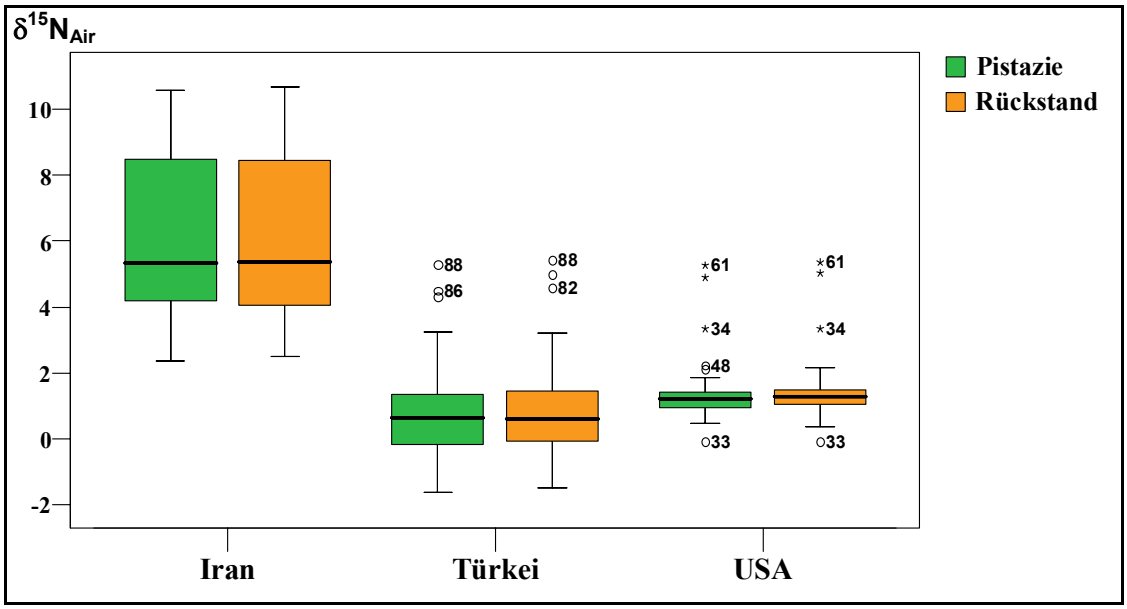


Abbildung 39: Box-Plot-Darstellung der $\delta^{15}N$-Messwerte des authentischen Datensatzes

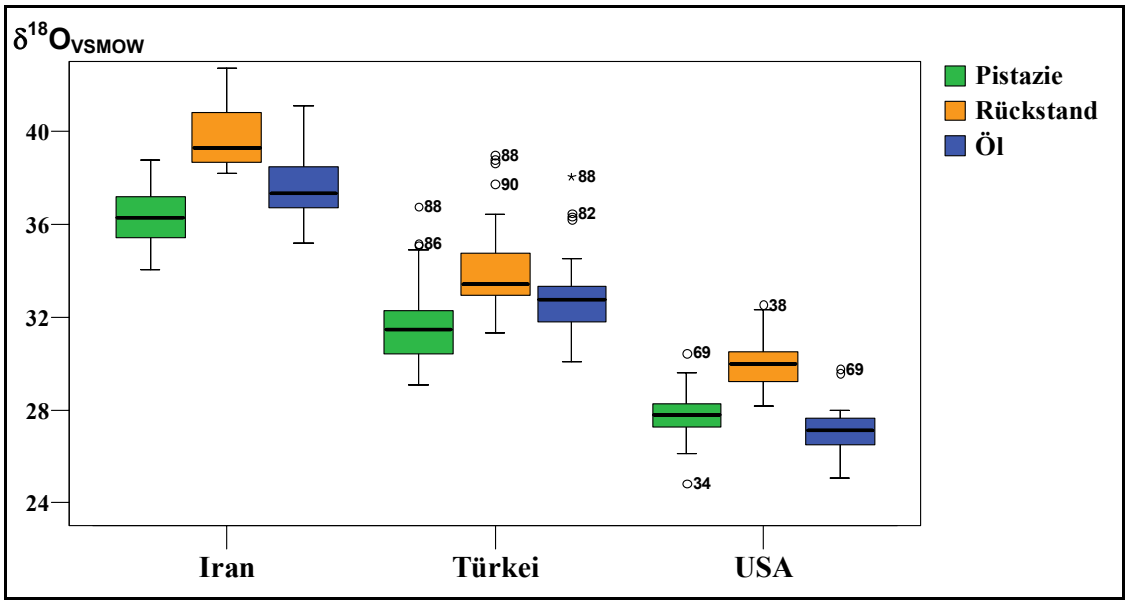


Abbildung 40: Box-Plot-Darstellung der $\delta^{18}O$-Messwerte des authentischen Datensatzes

Die Box-Plot-Darstellungen der $\delta^{13}C_{PDB}$-Werte des authentischen Datensatzes (s. Abbildung 38) lässt erkennen, dass die Stabilisotopenverhältnisse der drei Länder in allen betrachteten Pistazienfraktionen (Gesamtnuss, entfetteter Rückstand, Öl) sehr eng beieinander liegen. Dennoch ist hier ein Trend zu erkennen: Die $\delta^{13}C$-Werte der Türkei weisen in allen drei Fraktionen jeweils die höchsten und die USA immer die niedrigsten Messwerte auf. Die amerikanischen Proben sind zudem von den türkischen besser abgetrennt als von den iranischen.

Da die hier verglichenen Pistazienpflanzen denselben Photosyntheseweg haben, können die geringen, aber sichtbaren Unterschiede im $\delta^{13}C$-Verhältnis nur durch exogene Einflüsse hervorgerufen worden sein (s. Kapitel 3.2.1).

Das $\delta^{15}N_{Air}$-Verhältnis zeigt im Gegensatz zum $\delta^{13}C_{PDB}$-Verhältnis in allen Fraktionen eine deutliche Trennung zwischen den Messwerten des Irans und der USA an (s. Abbildung 39), jedoch überlappen sich die Werte der türkischen Proben mit denen der USA. Die Messwerte für die iranischen Proben sind insgesamt höher als die der amerikanischen und türkischen Pistazien. Hierfür können verschiedene exogene Faktoren verantwortlich sein: Dünger, Jahresdurchschnittstemperaturen, jahresdurchschnittliche Niederschlagsmenge, Bodenbeschaffenheit oder Sortenunterschiede (s. Kapitel 3.2.2).
Neben den $\delta^{15}N_{Air}$-Wert-Unterschieden ist auch die stark unterschiedliche Streuung (Länge der Boxen) zwischen den drei Ländern beim Stickstoffisotop sehr auffällig. Der Iran, als flächen- und mengenmäßig größter Produzent, zeigt hierbei die größte Streuung, während die USA mit einem recht abgegrenzten Anbaugebiet (Kalifornien) und wenigen, aber dafür sehr großen Farmen, die kleinste Streuung in den Messwerten aufweist. Hieraus lässt sich schließen, dass durch die größere Gesamtanbaufläche im Iran sich regionale Unterschiede (Klima, Boden, Mikroorganismen) ergeben, die sich im Stickstoffisotopenverhältnis der Pistazien niederschlagen. Für eine Herkunftsbestimmung von Pistazien innerhalb des Irans reichen diese Unterschiede allerdings nicht aus bzw. war der Datensatz zu klein (Überprüfung dieser Aussage mit der Diskriminanzanalyse, Ergebnisse nicht aufgeführt).

Eine vollständige Trennung zwischen den Pistazienproben der Hauptanbauländer Iran und USA liefert das Sauerstoff-Isotopenverhältnis (s. Abbildung 40). Hier überschneiden sich weder die äußersten Werte der Fraktion Pistazie, noch die des entfetteten Rückstands oder des Öls. An dieser Stelle ist das Hauptziel dieser Arbeit, nämlich Pistazien der beiden weltweit führenden Produzenten und Lieferanten Iran und USA zu unterscheiden, schon erreicht.
Die Messwerte des drittgrößten Pistazienproduzenten, der Türkei, ordnen sich allerdings genau zwischen denen des Irans und der USA an und überschneiden sich mit beiden Ländern. Daher ist eine Auswertung mit der multivariaten Datenanalyse unerlässlich (s. Kapitel 6), um zu versuchen, die türkischen Proben vollständig von den beiden anderen Ländern abzutrennen. Die vollständige Abgrenzung der Türkei von den beiden anderen Ländern wurde in der Arbeit von Anderson et al.[7] nämlich nicht erreicht. Nähere Ausführungen zu den Ursachen der Länderunterschiede zwischen den δ-Werten der Pistazien sind in Kapitel 7 gegeben.

Weiterhin ist bei der Betrachtung der Box-Plots aller Länder die sehr gleichmäßige Verschiebung der Messwertbereiche zwischen den Fraktionen Pistazie, entfettetem Rückstand und Öl in den $\delta^{13}C_{PDB}$- und $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werten auffällig (s. Abbildung 38 und 40). Da diese sehr gleichmäßig bei den Proben aus allen Ländern auftreten, könnte hier ein statistischer Zusammenhang wie eine Korrelation bestehen. Eine Korrelationsanalyse zur Überprüfung dieser Vermutung wird an späterer Stelle durchgeführt (s. Kapitel 5.3.5).

5.3 Univariate statistische Vorbetrachtung des authentischen Datenmaterials

Der Datensatz der authentischen Pistazienproben muss zuerst sorgfältig auf nachfolgende Kriterien hin untersucht werden, da er sonst nicht zur multivariaten Datenanalyse eingesetzt werden darf:

1. Ausreißer,
2. Normalverteilung,
3. Varianzhomogenität,
4. Gruppenunterschiede,
5. Korrelation.

Auf die Betrachtung der Ausreißer muss besondere Sorgfalt gelegt werden, da deren Entfernung aus dem Datensatz die Ergebnisse der multivariaten Datenanalyse maßgeblich beeinflusst. Zudem ist die Prüfung der Daten auf Normalverteilung entscheidend, da dies eine der Grundvoraussetzungen für die Anwendbarkeit der Diskriminanzanalyse ist.
Varianzhomogenität ist hilfreich für eine gute Separation der Gruppen und Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Fisher'schen Klassifizierungsfunktionen (Erläuterungen s. Kapitel 6.3.4 und Anhang II). Auch für die Hauptkomponentenanalyse sind diese Voraussetzungen empfehlenswert, um eine gute Korrelationsmatrix erstellen zu können.
Die Durchführung eines Mehrstichprobentests zur Prüfung auf Mittelwertgleichheit zwischen den Gruppen (Ländern) der einzelnen Variablen ist ratsam, um sicherzustellen, dass globale Gruppenunterschiede vorhanden sind. Mit Hilfe von Post-Hoc-Mehrfachvergleichen können dann paarweise Mittelwertvergleiche durchgeführt werden, um zu testen, ob zwischen allen einzelnen Gruppen signifikante Unterschiede bestehen.[239]
Die Prüfung der Korrelation der Variablen ist wiederum für die Diskriminanzanalyse wichtig, weil korrelierende Parameter nicht in den Lerndatensatz mit einbezogen werden dürfen, da sonst die Gefahr eines instabilen Modells besteht (s. Kapitel 3.4.2).

Die oben genannten fünf Kriterien, die der authentische Pistaziendatensatz erfüllen muss, um zur multivariaten Datenanalyse zugelassen zu werden, werden in den folgenden Kapiteln 5.3.1 bis 5.3.5 untersucht. Die statistischen Auswertungen und Tests wurden mit Hilfe der Statistik-Software SPSS 12.0 auf dem 95 %-Wahrscheinlichkeitsniveau durchgeführt.

5.3.1 Betrachtung der Ausreißer

Zur Überprüfung, ob es sich bei einem Wert, der von den anderen auffallend stark abweicht, um einen Ausreißer oder um eine zufällige Abweichung handelt, existieren eine Vielzahl von Tests. Prinzipiell überprüfen dabei alle die Hypothese, ob der verdächtigte Wert signifikant nicht mehr zur Messreihe gehört, also ein Ausreißer ist. Werden Messwerte als Ausreißer identifiziert, so dürfen sie in die Gesamtberechnung nicht mehr mit einbezogen werden.[122,166] Die vorliegenden Messwerte werden daher zuerst grafisch mit Hilfe der Box-Plot-Darstellung betrachtet und danach zur Bestätigung der visuell gefundenen Ausreißer dem Grubbs- und Nalimov-Ausreißertest unterzogen.

5.3.1.1 Box-Plots

Durchführung:

→ siehe Kapitel 5.2, Abbildung 38-40

In den nachfolgenden Tabellen 29 und 30 sind die in den Box-Plots angezeigten Ausreißer und Extremwerte (fett gedruckt) aufgelistet. Die aufgeführten Probennummern in den Tabellen und im Text korrespondieren mit denen in der Probenliste des Kapitels 9.1 und des Anhangs III.

Ergebnis:

Tabelle 29:
Zusammenfassung der Box-Plot-Ausreißer und -Extremwerte des authentischen Datenmaterials der USA

USA	**Probennummern**					
	Pistazie					
$\delta^{13}C_{PDB}$						
$\delta^{15}N_{Air}$	33	**34**	35	48	**61**	**69**
$\delta^{18}O_{VSMOW}$		34				69
	Rückstand					
$\delta^{13}C_{PDB}$						
$\delta^{15}N_{Air}$	33	**34**			**61**	**69**
$\delta^{18}O_{VSMOW}$			38			
	Öl					
$\delta^{13}C_{PDB}$						
$\delta^{18}O_{VSMOW}$	33					69

Tabelle 30:
Zusammenfassung der Box-Plot-Ausreißer und -Extremwerte des authentischen Datenmaterials der Türkei

Türkei	**Probennummern**						
	Pistazie						
$\delta^{13}C_{PDB}$	75						
$\delta^{15}N_{Air}$			82	86	88		
$\delta^{18}O_{VSMOW}$	71			86	88		
	Rückstand						
$\delta^{13}C_{PDB}$	75	80					
$\delta^{15}N_{Air}$			82	86	88		
$\delta^{18}O_{VSMOW}$			82	86	88	90	
	Öl						
$\delta^{13}C_{PDB}$	75						
$\delta^{18}O_{VSMOW}$			82	86	**88**	90	

Der authentischen Datensatz der Proben des Irans zeigt in der Box-Plot-Darstellung weder Ausreißer noch Extremwerte (s. Abbildung 38-40 in Kapitel 5.2).

Bei den authentischen Pistazienproben aus den USA sind Box-Plot-Ausreißer vor allem beim Stickstoff- weniger im Sauerstoff-Isotopenverhältnis zu finden. Viele davon sind sogar als Extremwerte gekennzeichnet (s. fett gedruckte Werte in Tabelle 29 und vgl. Abb. 38-40 in Kap. 5.2). Auffällig sind hier die Proben mit den Nummern 33, 34, 35, 61 und 69. Die ersteren drei sind direkt von kalifornischen Farmen bezogen worden (34/35 = gesalzene und ungesalzene Version), während die letzteren beiden im amerikanischen Handel gekauft wurden (gleiche Firma jedoch verschiedene Ernten) und den Vermerk „USDA organic“ tragen.
Mit dem Vermerk „organic“ dürfen in den USA nur Produkte gekennzeichnet werden, deren Hersteller von dem **U**nited **S**tates **D**epartment of **A**griculture (= Agrarministerium) begutachtet und akkreditiert wurden und die nach deren Vorgaben produziert werden. Dazu gehören die Vermeidung der meisten konventionellen Pestizide, Herbizide und kommerzieller Dünger, sowie keine Klärschlammaufbringung beim Anbau und keine Benutzung von Bestrahlung oder gentechnisch hergestellten Zutaten bei der Produktion. „Organic“ ist also vergleichbar mit dem deutschen Begriff „biologischer Anbau“.[265]

Die Box-Plot-Darstellung zeigt bei den authentisch-türkischen Messergebnissen sehr auffällige Ausreißer in den $\delta^{15}N_{Air}$- und $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werten und zwar bei denselben Proben in allen drei Fraktionen (s. Tabelle 30 und vgl. Abb. 38-40 in Kap. 5.2). Dies sind die Pistazienproben mit den Nummern 82 (= lose Ware ohne Schale), 86 (= verpackte Ware ohne Schale), 88 (= verpackte Ware 5 Jahre alt mit Schale) und 90 (= lose Ware mit Schale).
Es scheint, als ob die Pistazien ohne Schale durch äußere Einflüsse (z.B. Luft, Verarbeitung, Lagerung) in ihrem Stickstoff- und Sauerstoff-Isotopenverhältnis beeinflusst wurden bzw. mehr isotopenrelevant beeinflusst wurden als Pistazien mit Schale. Die beiden auffälligen Proben Nr. 82 und 86 sind auch die einzigen ohne Schale im authentisch-türkischen Datensatz. Bei Probe Nr. 88 könnte die Alterung (5 Jahre, keine Angaben über die Lagerungsbedingungen) zu einer Veränderung der Isotopenverhältnisse geführt haben. Die authentisch-türkische Herkunft der Probe Nr. 90 ist nicht mit Sicherheit anzunehmen, da sie als lose Ware in Berlin gekauft wurde.
Ein weiterer auffälliger Ausreißer im türkischen Datenmaterial ist die Probe Nr. 75, die nur im $\delta^{13}C_{PDB}$-Verhältnis aller Fraktionen ausreißt. Es handelt sich dabei ebenfalls um eine in Berlin gekaufte, lose Ware mit Schale und ihre türkische Herkunft kann somit nicht mit Gewissheit angenommen werden.

5.3.1.2 Ausreißertest nach Grubbs und Nalimov

Zur Überprüfung, ob ein Wert mit einer starken Abweichung ein Ausreißer ist oder nicht, wird beim Grubbs-Test die Prüfgröße *Q* und beim Nalimov-Test die Prüfgröße r berechnet (s. Anhang I: Formelverzeichnis) und mit einem Tabellenwert verglichen. Der Wert gilt als Ausreißer, wenn die berechnete Prüfgröße *Q* bzw. r größer als der entsprechende Tabellenwert ist.[122,166]

Durchführung:

Der zweiseitige Grubbs-Test wird zuerst auf die Messwerte der Mehrfachbestimmungen jeder einzelnen Probe angewendet. So erkannte Ausreißer wurden nicht in die Berechnung des Mittelwerts einbezogen. Danach wird der zweiseitige Grubbs-Test erneut auf die Mittelwerte aller Proben eines Landes angewendet (Signifikanzniveau P = 95 %). Die so ermittelten Grubbs-Ausreißer sind in den Tabellen 31-33 fett gedruckt hervorgehoben.

Danach werden die durch den Grubbs-Test bereinigten Mittelwerte auf einem Signifikanzniveau von P = 99 % dem Nalimov-Test unterzogen. Die aufgeführten Probennummern in den nachfolgenden Tabellen 31-33 und im Text korrespondieren mit denen der Probenlisten in Kapitel 9.1 und im Anhang III.

Ergebnis:

Tabelle 31:
Zusammenfassung der Grubbs-/Nalimov-Test-Ausreißer des authentischen Datenmaterials des Irans

Iran	**Probennummern**
	Pistazie
$\delta^{13}C_{PDB}$ $\delta^{15}N_{Air}$ $\delta^{18}O_{VSMOW}$	22
	Rückstand
$\delta^{13}C_{PDB}$ $\delta^{15}N_{Air}$ $\delta^{18}O_{VSMOW}$	
	Öl
$\delta^{13}C_{PDB}$ $\delta^{18}O_{VSMOW}$	7

Tabelle 32:
Zusammenfassung der Grubbs-/ Nalimov-Test-Ausreißer des authentischen Datenmaterials der USA

USA	**Probennummern**
	Pistazie
$\delta^{13}C_{PDB}$ $\delta^{15}N_{Air}$ $\delta^{18}O_{VSMOW}$	**34 61 69** 34 69
	Rückstand
$\delta^{13}C_{PDB}$ $\delta^{15}N_{Air}$ $\delta^{18}O_{VSMOW}$	**34 61 69**
	Öl
$\delta^{13}C_{PDB}$ $\delta^{18}O_{VSMOW}$	33 69

Tabelle 33:
Zusammenfassung der Grubbs-/Nalimov-Test-Ausreißer des authentischen Datenmaterials der Türkei

Türkei	**Probennummern**					
	Pistazie					
$\delta^{13}C_{PDB}$		**75**				
$\delta^{15}N_{Air}$	71		82	86	88	90
$\delta^{18}O_{VSMOW}$					88	
	Rückstand					
$\delta^{13}C_{PDB}$		75	80			
$\delta^{15}N_{Air}$	71		82	86	88	90
$\delta^{18}O_{VSMOW}$						
	Öl					
$\delta^{13}C_{PDB}$		**75**				
$\delta^{18}O_{VSMOW}$					88	

Der Grubbs-Test kennzeichnet auf dem 95 %-Signifikanzniveau nur vier Proben als Ausreißer (fett gedruckte Nummern in den Tabellen 31-33) und urteilt damit im Vergleich wesentlich weniger scharf als die Box-Plots (s. Kapitel 5.3.1.1) und dem Nalimov-Test (alle aufgeführten Probennummern in den Tabellen 31-33). Der Nalimov-Test wurde entgegen dem Grubbs-Test auf dem 99 %-Signifikanzniveau durchgeführt, da er bei P = 95 % zu scharf urteilt und fast alle Proben als Ausreißer kennzeichnet. Auf dem 99 %-Signifikanzniveau bestätigt der Nalimov-Test jedoch fast alle Box-Plot-Ausreißerproben (vgl. Tabellen 29 und 30 in Kap. 5.3.1.1 mit Tabellen 31-33), allerdings nicht immer in den gleichen Stabilisotopenverhältnissen.

Bei den iranischen Proben werden praktisch keine Ausreißer gefunden, auch wenn der Nalimov-Test (s. Tabelle 31) zwei anzeigt. Diese treten jedoch nicht wie die Ausreißerproben der anderen Länder in mehreren Fraktionen auf und werden weder mit dem Grubbs-Test noch von den Box-Plots bestätigt. Es kann hier keine plausible Erklärung für deren „Herausfallen“ gefunden werden, da sie 100 % authentisch sind und keiner auffälligen Produktion oder Region entstammen. Sie werden daher nicht aus dem Datensatz entfernt, sondern alle 32 authentisch-iranischen Proben werden in die multivariate Datenanalyse einfließen.

Der Nalimov- und Grubbs-Test bestätigen bei den USA-Proben die drei Extremwert-Proben Nr. 34, 61 und 69 der Box-Plots (s. Tabelle 32 und vgl. mit Tabelle 29 in Kap. 5.3.1.1). Die vier Ausreißerproben Nr. 33, 35, 38 und 48, die bei der Box-Plot-Darstellung noch nah an der Boxgrenze liegen (s. Kapitel 5.2), werden von Nalimov allerdings nicht als Ausreißer angezeigt.

Den Proben mit den Nummern 33, 34, 61 und 69 scheint der „biologische Anbau“ gemeinsam zu sein, da es sich bei diesen Proben um diejenigen handelt, die den Aufdruck „organic“ tragen bzw. direkt von kleinen Privatfarmen bezogen wurden. Es wird hier vermutet, dass sich eine bevorzugte oder ausschließliche Aufbringung von organischen Düngern auf das ^{15}N- und ^{18}O-Stabilisotopenverhältnis ausgewirkt hat. Diese Proben sind dadurch jedoch nicht weniger authentisch, sondern zeigen nur, dass die Düngung einen starken Einfluss hat (vor allem auf das Stickstoff-Isotopenverhältnis). Sie werden aber trotzdem aus dem authentischen Datenmaterial entfernt und fließen nicht mit in die multivariate Datenanalyse ein. Ebenso Probe Nr. 35, die zwar nur in der Box-Plot-Darstellung auffällig ist, jedoch stammt sie von der gleichen Farm wie die Ausreißerprobe Nr. 34. Sie unterscheiden sich nur in der Verarbeitung gesalzen/ungesalzen.
Somit werden fünf Proben (Nr. 33, 34, 35, 61, 69) aus dem amerikanischen Pistaziendatensatz entfernt und nur 33 von 38 authentischen USA-Proben zur multivariaten Datenanalyse zugelassen. Die beiden Proben Nr. 38 und 48 verbleiben im Datensatz, da sie jeweils nur in einer Variablen in den Box-Plots auffällig sind.

Während die Box-Plots die Ausreißer bei den türkischen Proben mehr im Sauerstoffisotopenverhältnis (s. Tabelle 30) gekennzeichnet haben, reißen dieselben Proben (s. Tabelle 33, Probe Nr. 71, 82, 86, 88, 90) beim Nalimov-Test im $^{15}N/^{14}N$-Verhältnis aus. Die Ausreißerprobe Nr. 71 ist zwar eine in der Türkei gekaufte lose Ware, bei der die Authentizität schwer anzuzweifeln ist, jedoch ist sie von zwei Tests eindeutig als Ausreißer erkannt worden. Außerdem wird auch die türkische Probe Nr. 75 wie mit den beiden anderen Tests als Ausreißer beim $\delta^{13}C_{PDB}$-Verhältnis erkannt.
Es finden sich somit bei den authentisch-türkischen Proben die meisten Ausreißer, was zu erwarten war, da die Proben nicht direkt aus dem Land sondern größtenteils in türkischen Läden in Deutschland erworben wurden. Die o.g. Proben (Nr. 71, 75, 82, 86, 88, 90) werden daher aus dem Datensatz genommen und nicht zur multivariaten Datenanalyse zugelassen. Somit fließen nur 25 von 31 türkischen Ausgangsproben in die multivariate Auswertung ein. Probe Nr. 80 wird im Datensatz belassen, da sie nur in der Variable „$\delta^{13}C$ Rückstand“ ausreißt und nicht wie alle anderen Ausreißerproben in mehreren Variablen und Elementen.

Insgesamt ist anzumerken, dass die meisten und deutlichsten Ausreißer im Stickstoff-Isotopenverhältnis zu finden sind. In Kapitel 3.2.2 wurde hierzu schon angemerkt, dass durch die Vielschichtigkeit der äußeren Einflussfaktoren die Schwankungsbreite des $\delta^{15}N$-Werts des Bodens und damit der Pflanzen beträchtlich sein kann, was sich bei einer Herkunftsbestimmung über dieses Element nachteilig auswirkt. Viele Zusammenhänge von Boden, Luft, Dünger und Pflanze sind auch noch nicht eingehend wissenschaftlich untersucht worden. Die Verwendung

des Stickstoffisotopenverhältnisses hat sich somit als nicht besonders geeignet für eine Herkunftsbestimmung herausgestellt.

Alle Ausreißerproben werden an späterer Stelle noch einmal mit der multivariaten Datenanalyse (s. Kapitel 6.4.5) gesondert betrachtet und ihre Herausnahme aus dem authentischen Datensatz in der Ergebnisdiskussion (s. Kapitel 7) eingehend diskutiert; vor allem die vier USA-Proben (Nr. 33, 34, 61 und 69), bei denen ganz offensichtlich die Art der Düngung das Isotopenverhältnis beeinflusst hat.

5.3.2 Prüfung der Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov

Der Test nach Kolmogorov (1941) und Smirnov (1948) ist dem Chi²-(χ^2-) Anpassungstest ähnlich und vergleicht die empirische Verteilungsfunktion für eine Variable mit der Normalverteilung. Dabei zeigt ein Testwertergebnis >0,05 an, dass die betrachtete Variable normalverteilt ist. Eine Normalverteilung der Variablen ist Grundvoraussetzung für deren Verwendbarkeit in der Diskriminanzanalyse und für die Aufstellung einer guten Korrelationsmatrix in der Hauptkomponentenanalyse.[224,251,256]

Durchführung:
Der Test auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov (K-S) wird mit dem um die Ausreißer verminderten authentischen Datensatz durchgeführt.

Ergebnis:

Tabelle 34: Signifikanzergebnisse (P = 95%) des K-S-Normalverteilungstests vom authentischen Datenmaterial ohne Ausreißer

Kolmogorov-Smirnov-Normalverteilungstest	Iran	USA	Türkei
$\delta^{13}C_{PDB}$ **Pistazie**	0,972	1,000	0,783
$\delta^{15}N_{Air}$ **Pistazie**	0,422	0,706	0,903
$\delta^{18}O_{VSMOV}$ **Pistazie**	0,951	0,979	0,874
$\delta^{13}C_{PDB}$ **Rückstand**	0,910	0,952	0,692
$\delta^{15}N_{Air}$ **Rückstand**	0,460	0,830	0,863
$\delta^{18}O_{VSMOV}$ **Rückstand**	0,163	0,985	0,871
$\delta^{13}C_{PDB}$ **Öl**	0,408	0,872	0,774
$\delta^{18}O_{VSMOV}$ **Öl**	0,494	0,543	0,849

Der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest auf Normalverteilung zeigt für alle betrachteten Elemente, Fraktionen und Länder eine zweiseitige Signifikanz >0,05, d.h. es kann für alle Messreihen eine Normalverteilung nicht abgelehnt werden (s. Tabelle 34).

5.3.3 Prüfung der Homogenität der Varianzen nach Levene

Der Levene-Test dient zum Vergleich von Gruppenvarianzen und zum Testen derer Homogenität. Er ist relativ unempfindlich (robust) gegenüber Abweichungen von der Normalverteilung und testet die Nullhypothese („alle Varianzen sind gleich“) gegen die F-Verteilung. Falls das Signifikanzergebnis <0,05 ist, wird die Alternativhypothese angenommen, d.h. mindestens zwei der betrachteten Varianzen sind ungleich. Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Levene-Tests sind Stichprobenumfänge pro Gruppe >10. Eine Varianzhomogenität zwischen den Gruppen wäre für die nachfolgenden multivariaten Datenanalysen wünschenswert und hilfreich, ist jedoch keine zwingende Voraussetzung.[224,239,256]

Durchführung:
Der Test auf Varianzhomogenität nach Levene wird mit dem um die Ausreißer verminderten authentischen Datensatz durchgeführt.

Ergebnis:

Tabelle 35: Signifikanzergebnisse des Levene-Tests auf Varianzhomogenität

Levene-Homogenitätstest		Signifikanz
$\delta^{13}C_{PDB}$	**Pistazie**	**0,057**
$\delta^{15}N_{Air}$	**Pistazie**	<0,001
$\delta^{18}O_{VSMOV}$	**Pistazie**	0,020
$\delta^{13}C_{PDB}$	**Rückstand**	0,043
$\delta^{15}N_{Air}$	**Rückstand**	<0,001
$\delta^{18}O_{VSMOV}$	**Rückstand**	**0,052**
$\delta^{13}C_{PDB}$	**Öl**	0,038
$\delta^{18}O_{VSMOV}$	**Öl**	0,006

Es wird nur für zwei der acht Variablen eine signifikante Varianzhomogenität der Gruppen vom Levene-Test angezeigt (s. fett gedruckte Werte in Tabelle 35). Bei natürlichen Messwertreihen ist dies jedoch zu erwarten und in der Box-Plot-Darstellung ist die Varianzheterogenität der Variablen auch schon zu erkennen: Die Unterschiede in der Länge der Boxen, d.h. in der Streuung

der Werte, sind zwischen den Ländern zum Teil erheblich. Daher kann zwischen den Ländern innerhalb einer Fraktion keine Varianzhomogenität bestehen. Die möglichen Gründe dafür werden in Kapitel 7 (Ergebnisdiskussion) eingehend diskutiert.

5.3.4 Prüfung auf Gruppenunterschiede über Post-Hoc-Mehrfachvergleiche

Zur Prüfung auf Gruppenunterschiede kann die weit verbreitete und bekannte einfaktorielle ANOVA (**an**alysis **o**f **va**riance, F-Test) mit dem vorliegenden Datenmaterial nicht durchgeführt werden. Die Grundvoraussetzung für diesen Test, die Varianzhomogenität (Levene-Test, s. Kapitel 5.3.3), wird von den meisten Variablen des authentischen Pistaziendatensatzes nicht erfüllt.[239] Es gibt jedoch paarweise multiple Vergleichstests, bei denen Varianzheterogenität zugelassen ist, so dass die einzelnen Gruppen innerhalb einer Variablen gegeneinander auf signifikante Erwartungswertunterschiede (P = 95 %) getestet werden können.[251] Ein Wert <0,05 zeigt an, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten der einzelnen Länder besteht.

Durchführung:

Der konservative, paarweise Vergleichstest T2 nach Tamhane, bei dem keine Varianzgleichheit vorausgesetzt ist und auf der Grundlage eines T-Tests basiert, wird auf das um die Ausreißer verminderte authentische Datenmaterial angewendet (P = 95 %). Ebenso wird zum Vergleich die Scheffé-Prozedur als Vertreter eines F-Tests durchgeführt, bei dem Varianzhomogenität Voraussetzung ist. Hiermit soll überprüft werden, ob die vom Levene-Test angezeigte Varianzinhomogenität des Datensatzes groß oder klein ist.

Ergebnis:

Tabelle 36: Signifikanz-Ergebnisse multipler Vergleichstests

Post-Hoc-Mehrfachvergleiche			**Signifikanz Tamhane-T2**	**Signifikanz Scheffé-Prozedur**
$\delta^{13}C_{PDB}$	**Pistazie**	Iran ⇔ USA	<0,001	<0,001
		USA ⇔ Türkei	<0,001	<0,001
		Türkei ⇔ Iran	0,004	0,003
$\delta^{15}N_{Air}$	**Pistazie**	Iran ⇔ USA	<0,001	<0,001
		USA ⇔ Türkei	0,001	**0,197**
		Türkei ⇔ Iran	<0,001	<0,001
$\delta^{18}O_{VSMOV}$	**Pistazie**	Iran ⇔ USA	<0,001	<0,001
		USA ⇔ Türkei	<0,001	<0,001
		Türkei ⇔ Iran	<0,001	<0,001

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite!

Fortsetzung der Tabelle 36:

Post-Hoc-Mehrfachvergleiche			Signifikanz Tamhane-T2	Signifikanz Scheffé-Prozedur
$\delta^{13}C_{PDB}$	**Öl**	Iran ⇔ USA	<0,001	<0,001
		USA ⇔ Türkei	<0,001	<0,001
		Türkei ⇔ Iran	<0,001	<0,001
$\delta^{18}O_{VSMOV}$	**Öl**	Iran ⇔ USA	<0,001	<0,001
		USA ⇔ Türkei	<0,001	<0,001
		Türkei ⇔ Iran	<0,001	<0,001
$\delta^{13}C_{PDB}$	**Rückstand**	Iran ⇔ USA	<0,001	<0,001
		USA ⇔ Türkei	<0,001	<0,001
		Türkei ⇔ Iran	0,002	0,001
$\delta^{15}N_{Air}$	**Rückstand**	Iran ⇔ USA	<0,001	<0,001
		USA ⇔ Türkei	0,001	**0,215**
		Türkei ⇔ Iran	<0,001	<0,001
$\delta^{18}O_{VSMOV}$	**Rückstand**	Iran ⇔ USA	<0,001	<0,001
		USA ⇔ Türkei	<0,001	<0,001
		Türkei ⇔ Iran	<0,001	<0,001

Es konnte mit dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest T2 nach Tamhane gezeigt werden, dass die erwünschten signifikanten Unterschiede auf dem 95 %-Signifikanzniveau zwischen den einzelnen Gruppen (= Ländern) in allen Variablen bestehen. Alle Signifikanzwerte sind kleiner als 0,05 (s. Tabelle 36, linke Wertespalte), was bedeutet, dass die Mittelwerte der einzelnen Gruppen pro Variable nicht aus einer Grundgesamtheit stammen. Es bestehen damit signifikante Unterschiede zwischen den Ländern und die Voraussetzungen für eine multivariate Datenanalyse zur Herkunftserkennung sind gegeben.

Zum Vergleich wurde auch die hier eigentlich unzulässige Scheffé-Prozedur durchgeführt, die Varianzhomogenität voraussetzt. Auch mit diesem Test werden für fast alle Variablen signifikante Gruppenunterschiede angezeigt (Ergebnisse <0,05). Die Mittelwerte liegen also trotz unterschiedlicher Varianzen weit genug auseinander (s. Tabelle 36, rechte Wertespalte). Nur für die beiden Stickstoff-Parameter wird zwischen den Pistazien der USA und der Türkei kein signifikanter Unterschied gefunden, während der Varianzheterogenität-tolerierende Tamhane-T2-Test das Gegenteil anzeigt. Bei der Betrachtung der entsprechenden Box-Plot-Darstellungen (s. Abbildung 39 in Kapitel 5.2) wird diese Diskrepanz visuell deutlich, denn die Mediane sind zwar verschieden, jedoch hat der Pistazienprobendatensatz der Türkei eine wesentlich größere Spannweite und schließt damit alle amerikanischen Messwerte in seinem Intervall ein.

5.3.5 Korrelationsanalyse

Bei der Betrachtung der Box-Plot-Darstellungen (s. Abbildung 38-40 in Kapitel 5.2) des authentischen Datenmaterials wurde aufgrund der gleichmäßigen Verschiebungen zwischen den δ-Werten der Pistazie, des entfetteten Rückstands und des Öls vermutet, dass die Fraktionen miteinander korrelieren. Zur Überprüfung dieser Vermutung wird eine Korrelationsanalyse durchgeführt, die die Zusammenhänge zwischen gleichwertigen Zufallsvariablen anhand einer Stichprobe untersucht. Eine Maßzahl für die Stärke und Richtung eines linearen Zusammenhangs ist der Korrelationskoeffizient ς. Er liegt zwischen –1 und +1, wobei ein Betrag nahe ±1 einen starken und ein Betrag nahe Null einen schwachen Zusammenhang anzeigt.[37,224] Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten hängt vom Skalenniveau der betreffenden Variablen ab. Im vorliegenden Fall der Pistazienmesswerte sind alle Variablen intervallskaliert und normalverteilt, daher wird die Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson angewandt (s. Anhang I: Formelverzeichnis).[37]

Durchführung:

Die Korrelationsanalyse nach Pearson wird mit dem um die Ausreißer verminderten authentischen Datensatz durchgeführt.

Ergebnis:

Tabelle 37: Korrelationskoeffizienten nach Pearson für die Variablen der authentischen Proben

Korrelations-analyse	**$\delta^{13}C$ Pistazie**	**$\delta^{13}C$ Rückst.**	**$\delta^{13}C$ Öl**	**$\delta^{15}N$ Pistazie**	**$\delta^{15}N$ Rückst.**	**$\delta^{18}O$ Pistazie**	**$\delta^{18}O$ Rückst.**	**$\delta^{18}O$ Öl**
$\delta^{13}C$ Pistazie	1	**0,896**	**0,961**	0,088	0,087	0,462	0,427	0,535
$\delta^{13}C$ Rückstand	**0,896**	1	**0,928**	0,058	0,045	0,499	0,465	0,576
$\delta^{13}C$ Pistazienöl	**0,961**	**0,928**	1	0,023	0,018	0,453	0,416	0,537
$\delta^{15}N$ Pistazie	0,088	0,058	0,023	1	**0,988**	0,757	0,789	0,720
$\delta^{15}N$ Rückstand	0,087	0,045	0,018	**0,988**	1	0,750	0,781	0,716
$\delta^{18}O$ Pistazie	0,462	0,499	0,453	0,757	0,750	1	**0,981**	**0,980**
$\delta^{18}O$ Rückstand	0,427	0,465	0,416	0,789	0,781	**0,981**	1	**0,974**
$\delta^{18}O$ Pistazienöl	0,535	0,576	0,537	0,720	0,716	**0,980**	**0,974**	1

fettgedruckt: Korrelationen zwischen den Fraktionen eines Elements. Die Korrelationen sind alle auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

unterstrichen: Korrelationen zwischen den Fraktionen verschiedener Elemente. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Die Korrelationsanalyse nach Pearson (s. Tabelle 37) bestätigt statistisch den schon bei der Betrachtung der Box-Plots visuell erkannten Zusammenhang (s. Kapitel 5.2), dass die Fraktionen Pistazie, entfetteter Rückstand und Öl innerhalb eines Elements miteinander korrelieren. Der Korrelationszusammenhang ist fast immer, abgesehen von einer Ausnahme, „sehr hoch" ($\varsigma > 0{,}9$) und damit hoch signifikant. Dies war zu erwarten, denn wie schon in Kapitel 3.2 dargelegt wurde, korrelieren die δ-Werte der Pflanzen mit ihren jeweiligen Kohlenstoff-, Stickstoff- und Sauerstoffquellen der Umwelt. Im weiteren Stoffwechsel der Pflanzen kommt es zwar zu diversen Isotopeneffekten, jedoch nach diesem Ergebnis scheinen die Isotopeneffekte immer in einem Korrelationsgleichgewicht abzulaufen. Daher führt die Untersuchung der einzelnen Fraktionen „Öl" und „entfetteter Rückstand" nicht zu einer Verschärfung der Trennung zwischen den Ländern.

Durch die hier festgestellten Korrelationen zwischen den Fraktionen eines Elements lässt sich außerdem ableiten, dass für die Diskriminanzanalyse nur eine Fraktion pro Element zugelassen werden darf, da sonst die Aussagekraft des Modells verschlechtert wird (s. Kapitel 3.4.2). Für die Hauptkomponentenanalyse dagegen ist die Korrelation von Variablen gerade erstrebenswert, da diese die korrelierenden Fraktionen zu Faktoren bündeln wird.

Außerdem ist zu beobachten, dass neben den sehr hohen Korrelationskoeffizienten zwischen Pistazie, Rückstand und Öl innerhalb der Elemente, auch signifikante Korrelationen zwischen verschiedenen Elementen bestehen. Die Variablen des Sauerstoffisotopenverhältnisses korreliert sowohl „hoch" ($\varsigma > 0{,}7$) mit den Stickstoff-Variablen als auch noch „gering" mit dem Kohlenstoff-Variablen ($\varsigma \sim 0{,}5$). Diese Kreuzkorrelationen sind für die Hauptkomponentenanalyse erstrebenswert, da dadurch eine weitere Bündelung der Variablen und eine Variablenreduktion zu erwarten ist. Die Grundvoraussetzung für eine gute Eignung des Datensatzes für die Hauptkomponentenanalyse ist damit hinreichend gegeben. Weitere Prüfkriterien dazu werden im nächsten Kapitel untersucht.
Für die Diskriminanzanalyse ist die hohe Korrelation zwischen Sauerstoff und Stickstoff eher kritisch zu betrachten. Es könnten dadurch Probleme bei der Modellbildung entstehen, da die Diskriminanzanalyse sehr empfindlich auf zwischenelementare Korrelationen reagiert. Dies wird sich jedoch erst beim Testen des Diskriminanzmodells zeigen.

6.

Ergebnisteil III: Multivariate Statistik

In diesem Kapitel werden die δ-Wertergebnisse der authentischen Pistazienproben zuerst in einfachen Streudiagrammen zur visuellen Darstellung der Trennfähigkeit der Isotopenvariablen betrachtet. Danach wird der authentische Datensatz mit multivariaten Datenanalysen untersucht, um ein Modell zur Prüfung der Authentizität von Pistazien aus den drei Hauptanbauländern Iran, USA und Türkei zu erstellen. Im Anschluss wird die Leistungsfähigkeit des erstellten Modells mit Handelsproben überprüft und getestet.

In vorherigen Kapitel 5 wurde das authentische Pistaziendatenmaterial bereits univariat betrachtet und auf Ausreißer und seine Eignung für die Hauptkomponenten- und Diskriminanzanalyse hin untersucht. Es hat sich dabei herausgestellt, dass die Isotopen-Messwerte der Pistazien alle zwingend geforderten Kriterien (Normalverteilung, Gruppenunterschiede, Korrelation) erfüllen und sich daher sehr gut für die multivariate Datenanalyse eignen. Es mussten zudem nur einige Ausreißer aus dem Datensatz entfernt werden (genaue, sachlogische Erklärungen dazu sind in der Ergebnisdiskussion in Kapitel 7 gegeben), so dass die Probenanzahl pro Gruppe (Land) noch genügend groß für den Einsatz zur multivariaten Statistik ist.

Bei der multivariaten Datenanalyse wird der authentische Datensatz zuerst einer Hauptkomponentenanalyse unterzogen. Hierbei werden nämlich keine Gruppen (Länder) vorgegeben, daher eignet sich die Hauptkomponentenanalyse hervorragend zur Entdeckung der Strukturen des Datensatzes und damit auch zur Prüfung, ob die Stabilisotopenvariablen dazu geeignet sind, nach der Herkunft zu trennen (s. Kapitel 3.4.1). Sie wird in Kapitel 6.2 in folgenden Schritten durchgeführt und die Ergebnisse jeweils diskutiert werden:

1. Prüfung der Eignung der Korrelationsmatrix,
2. Extraktion der Faktoren (Komponenten),
3. Faktorinterpretation,
4. grafische Darstellung.

Der Nachteil eines strukturen-entdeckenden Verfahrens wie der Hauptkomponentenanalyse ist es allerdings, dass mit ihr keine neuen Proben ein- bzw. zugeordnet werden können. Das Ziel dieser Arbeit ist es jedoch, Pistazienproben, deren Herkunft unbekannt oder zweifelhaft ist, den Erzeugerländern Iran, USA oder Türkei anhand ihrer Stabilisotopenverhältnisdaten eindeutig zuordnen zu können. Daher muss zusätzlich ein strukturen-prüfendes Verfahren wie die Diskriminanzanalyse auf den authentischen Datensatz angewendet werden, denn erst hiermit kann ein Klassifikations-(Zuordnungs-)modell für Pistazien erstellt werden.

Die Diskriminanzanalyse wird in Kapitel 6.3 zuerst schrittweise durchgeführt, um die Gesamtanzahl der Variablen zu reduzieren und die aussagekräftigsten herauszufiltern. Danach wird mit den „optimalen" Variablen das Diskriminanzmodell erstellt. Dazu wird versucht, die Koeffizienten der Diskriminanzfunktion so zu ermitteln, dass die untersuchten Gruppen möglichst optimal getrennt werden, d.h. das *Diskriminanzkriterium* Γ[1] maximal wird.[13,36,37] Eine neue (unbekannte) Probe wird dann nach der Bayes'schen Klassifikationsregel in diejenige Gruppe eingeordnet, der sie am nächsten liegt, d.h. bezüglich derer die Distanz zwischen Element und Gruppenmittel (Zentroid) minimal wird (s. Kapitel 3.4.1).
Die Klassifikationsfähigkeit des erstellten Diskriminanzmodells muss außerdem geprüft werden, und zwar über die Häufigkeit von korrekt und falsch klassifizierten Elementen bekannter Herkunft. Da in der Regel aber alle authentischen Proben als Lerndatensatz für die Erstellung des Klassifizierungsmodells verwendet werden, müssen diese zusätzlich als Quasi-Proben fungieren (näheres zur Methodik siehe in Kapitel 6.3.3). Hierfür gibt das Statistik-Programm SPSS 12.0 eine sog. Klassifikationsmatrix aus, aus der sehr einfach die Klassifikationsfehlerrate für die aufgestellte Zuordnungsregel abgelesen werden kann.
Des Weiteren wird auch die Eignung der Isotopenvariablen zur Anwendung der linearen Klassifizierungsfunktionen nach Fisher geprüft (s. Kapitel 6.3.4) und die Ergebnisse der Diskriminanzanalyse grafisch in Streudiagrammen veranschaulicht (s. Kapitel 6.3.5).

Im abschließenden Abschnitt 6.4 dieses Kapitels werden dann die Leistungsfähigkeit und die Grenzen des erstellten Modells anhand von Handelsproben aufgezeigt und die Ausreißer des authentischen Datensatzes noch einmal im Diskriminanzmodell betrachtet.

Die Durchführung und Auswertung der multivariaten Datenanalysen erfolgt in diesem Kapitel unter Zuhilfenahme der Statistik-Software SPSS 12.0 auf dem 95 %-Wahrscheinlichkeitsniveau und es wird ausschließlich der um die Ausreißer verminderte authentische Pistaziendatensatz für die Berechnungen verwendet.

[1] Diskriminanzkriterium Γ:
Γ = Streuung zwischen den Gruppen / Streuung in den Gruppen
Die Streuung *zwischen* den Gruppen wird durch die quadrierte Abweichung der Gruppenzentroide vom Gesamtmittel gemessen. Die Streuung *in* den Gruppen wird durch die quadrierten Abweichungen der Gruppenelemente vom jeweiligen Gruppenzentroid gemessen.[13] Die Separation wird umso besser, je homogener die Gruppen sind, je kleiner also die Streuung der Objekte innerhalb der Gruppen verglichen mit der Streuung der Gruppenmittelpunkte (Streuung zwischen den Gruppen) ist.[129]

6.1 Betrachtung des authentischen Datenmaterials in x-y-Streudiagrammen

Das Verhalten der $\delta^{13}C_{PDB}$-, $\delta^{15}N_{Air}$- und $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Messwerte der authentischen Proben soll vor der multivariaten Datenanalyse in einfachen, zweidimensionalen Streudiagrammen visuell betrachtet werden. Hieraus lassen sich Rückschlüsse auf die zu erwartenden multivariaten Ergebnisse ziehen und die Trennkraft der einzelnen Variablen besser als in den Box-Plots (s. Kapitel 5.2) visualisieren und mit dem Ergebnis von Anderson et al. (2005)[7] vergleichen.

Durchführung:

Es werden alle drei gemessenen Stabilisotopenvariablen des authentischen Datensatzes in einem x-y-Streudiagramm jeweils gegeneinander aufgetragen. Es werden dafür beispielhaft nur die Messwerte der Pistazien (Gesamtnuss) genommen, die des Öls und des entfetteten Rückstands geben ähnliche visuelle Ergebnisse.

Ergebnis:

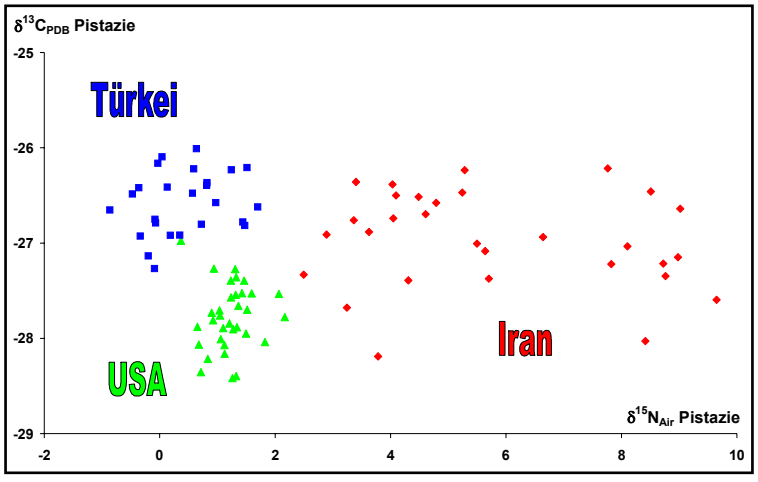


Abbildung 41:
Auftragung der $\delta^{13}C_{PDB}$- gegen die $\delta^{15}N_{Air}$-Messwerte der authentischen Pistazien

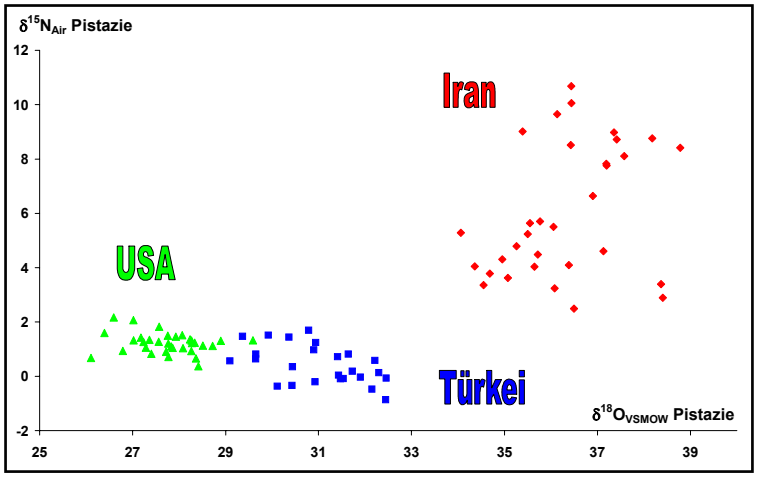


Abbildung 42:
Auftragung der $\delta^{15}N_{Air}$- gegen die $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Messwerte der authentischen Pistazien

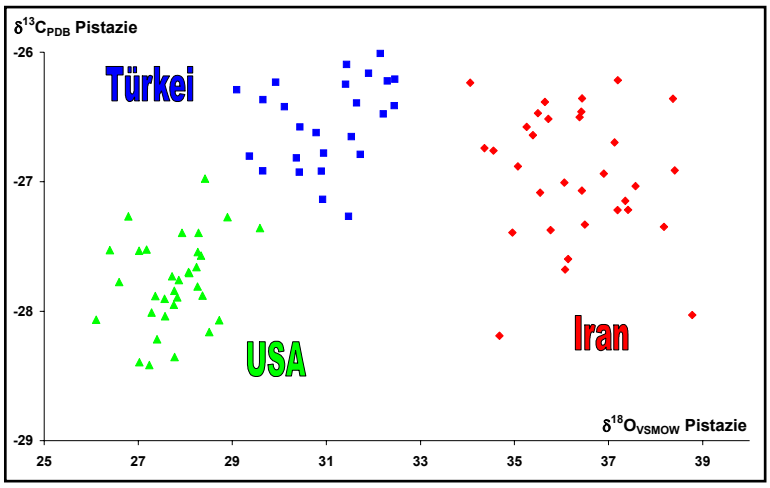


Abbildung 43:
Auftragung der $\delta^{13}C_{PDB}$- gegen die $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Messwerte der authentischen Pistazien

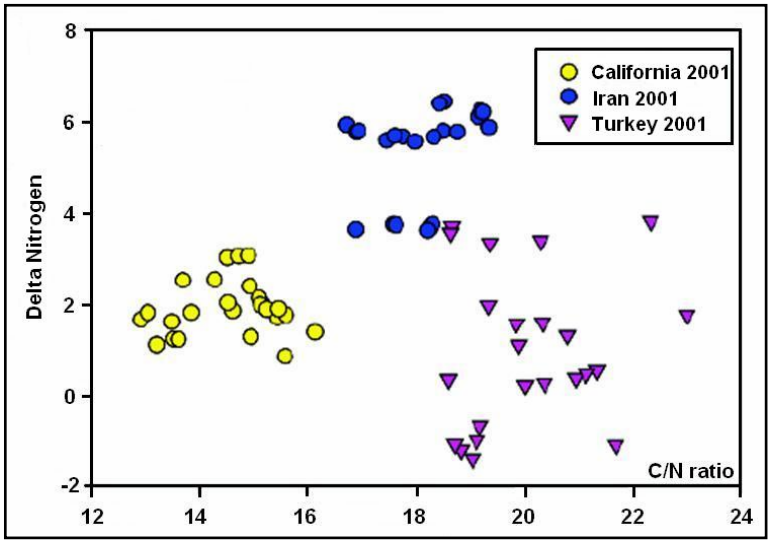


Abbildung 44:
Wiederholung der Abbildung 1 zum Vergleich

Originalgrafik verändert nach Anderson et al.[7]

In der einfachen Auftragung des $\delta^{13}C_{PDB}$-Werts der Pistazien gegen ihren $\delta^{15}N_{Air}$-Wert (s. Abbildung 41) kann durch die unterschiedliche Farbgebung schon eine Anordnung der Werte in Punktwolken aber keine klare Trennung der Länder erkannt werden. Die Messwerte der USA und der Türkei bilden kleine, mehr rundliche Punktwolken, während die Punktwolke der Iranproben durch die große Streubreite in deren $\delta^{15}N_{Air}$-Werten (s. Kapitel 5.2) lang gestreckt ist. Wird dagegen der $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Wert als eine der Variablen verwendet (s. Abbildung 42 und 43), kann wie bei den Box-Plots in Kapitel 5.2 eine deutliche Abtrennung der iranischen Pistazienproben von denen der USA beobachtet werden. Die Punktwolke der türkischen Messwerte ordnet sich jedoch immer zwischen der iranischen und amerikanischen an.

Dadurch stoßen z.B. in Abbildung 42 die Punktwolken der türkischen und der USA-Proben ohne Zwischenraum aneinander. Da das Stickstoffisotop in diesem Fall gar keine Trennung leistet, liegen diese beiden Punktwolken auch auf gleicher Höhe. Die iranischen Proben sind hier dagegen aufgrund differierender $\delta^{15}N_{Air}$-Werte in y-Richtung verschoben. Es ist daher zu bemerken, dass durch die Auftragung des $\delta^{15}N_{Air}$-Werts gegen das Sauerstoff-Isotopenverhältnis eine Abgrenzung iranischer Pistazien von amerikanischer und türkischer Ware erreicht wird.

Bei der Auftragung des $\delta^{13}C_{PDB}$-Werts gegen das $\delta^{18}O$-Verhältnis (s. Abbildung 43) sind die amerikanische und iranische Punktwolke ebenfalls klar getrennt, jedoch ordnen sich die türkischen Pistazienproben ohne eindeutige Abgrenzung genau dazwischen an. Sie heben sich nur aufgrund ihrer etwas höheren $\delta^{13}C_{PDB}$-Werte optisch von der amerikanischen Punktwolke ab. Auffällig ist hier außerdem die große Streubreite der iranischen Proben im $^{12}C/^{13}C$-Verhältnis die die gesamte Spannweite der amerikanischen und türkischen Proben einschließt.

Der Vergleich der drei Streudiagramme (s. Abbildung 41-43) mit dem ebenfalls grafisch zweidimensionalen Ergebnis von Anderson et al.[7] (s. Abbildung 44, Auftragung des $\delta^{15}N$-Werts gegen das C/N-Verhältnis) lässt nun erkennen, dass auch durch die Hinzunahme des Sauerstoff-Isotopenverhältnisses keine bessere Trennung der drei Länder erreicht wurde. Die beiden Hauptpistazienproduzenten Iran und USA konnten in dieser Arbeit wie auch in der von Anderson et al.[7] deutlich voneinander getrennt werden, jedoch überschneiden sich die türkischen Pistazien mit denen der beiden Hauptproduzenten: In dieser Arbeit mehr mit den amerikanischen Proben, bei Anderson et al.[7] mit den iranischen.

Es führt somit keine zweidimensionale Kombination der drei gemessenen Stabilisotopenverhältnisse (s. Abbildung 41-43) zu einer befriedigenden, klaren Trennung der drei Länder, jedoch zeigen alle eine potenzielle Eignung, was für die anschließenden multivariaten Datenanalysen von großem Vorteil ist. Multivariate Datenanalysen nutzten derartige Trends aus und verstärken sie statistisch, was in diesem Fall auf eine vollständige Trennung der drei Länder hoffen lässt. Das Sauerstoff-Isotopenverhältnis ist hierbei die wichtigste Variable, da sie schon alleinig die iranischen und amerikanischen Pistazienproben voneinander trennt. Außerdem trennt sie auch die türkischen Proben recht gut von den iranischen ab, aber nicht vollständig von den amerikanischen.
Der $\delta^{13}C_{PDB}$-Wert ist die zweitwichtigste Variable, denn sie zeigt Stärken bei der Trennung der amerikanischen Proben von den türkischen. Das Stickstoff-Isotopenverhältnis zeigt hier die wenigste Trennkraft, denn es kann nur die Sauerstoffvariable bei der Distanzierung der iranischen Pistazien von den beiden anderen Ländern unterstützen.

6.2 Hauptkomponentenanalyse

6.2.1 Prüfung der Eignung der Korrelationsmatrix

Die Korrelationsmatrix des authentischen Pistaziendatensatzes wurde schon separat in Kapitel 5.3.5 eingehend untersucht. Die Matrix müsste danach sehr gut für die Hauptkomponentenanalyse geeignet sein, da sehr hohe Korrelationen zwischen den Variablen eines Elements sowie zwischen den verschiedenen Elementen bestehen. Korrelationen zwischen den Variablen sind die Grundvoraussetzung für die Eignung eines Datensatzes zur Hauptkomponentenanalyse.

Durchführung:
Als Maß für die Eignung einer Korrelationsmatrix für die Hauptkomponentenanalyse dienen statistische Prüfkriterien wie z.B. der Bartlett-Test, das KMO-Kriterium oder das MSA-Maß.

Bartlett-Test:
Es wird mit einem χ^2-Wert die Hypothese getestet, nach der alle Korrelationskoeffizienten zwischen den Variablen in der Grundgesamtheit den Wert Null haben (Nullhypothese: Es besteht keine Korrelation). Ist die Signifikanz <0,05 besteht mindestens zwischen zwei Variablen eine Korrelation.[36]

*KMO (**K**aiser-**M**eyer-**O**lkin)-Kriterium / MSA (**M**easure of **S**ampling **A**dequacy)-Maß:*
Diese Prüfgrößen zeigen an, in welchem Umfang die Ausgangsvariablen zusammengehören und zeigen an, ob eine Hauptkomponentenanalyse sinnvoll erscheint oder nicht. Das KMO-Kriterium erlaubt hierbei eine Beurteilung der Korrelationsmatrix insgesamt, während das MSA-Maß die Beurteilung der einzelnen Variablen erlaubt. Die Wertebereiche liegen jeweils zwischen Null und Eins, wobei Werte <0,5 anzeigen, dass die Korrelationsmatrix nicht für eine Hauptkomponentenanalyse geeignet ist; Werte ≥0,8 sind wünschenswert.[13,36] Bei der Bewertung des KMO- und MSA-Maßes sind folgende Wortlaute gebräuchlich:[36]

Wert	Beurteilung
0,9 bis 1,0	fabelhaft (marvelous)
0,8 bis < 0,9	recht gut (meritorious)
0,7 bis < 0,8	mittelprächtig (middling)
0,6 bis < 0,7	mäßig (mediocre)
0,5 bis < 0,6	schlecht (miserable)
< 0,5	inakzeptabel (unacceptable)

Ergebnis:

Tabelle 38: Ergebnis des Bartlett-Tests und Wert des KMO-Kriteriums

Signifikanz des **Bartlett-Tests** auf Sphärizität:	**<0,001**
Maß der Stichprobeneignung nach **K**aiser-**M**eyer-**O**lkin:	**0,807**

Tabelle 39: Ergebnisse des MSA-Maßes

	$\delta^{13}C$ Pistazie	$\delta^{13}C$ Rückst.	$\delta^{13}C$ Öl	$\delta^{15}N$ Pistazie	$\delta^{15}N$ Rückst.	$\delta^{18}O$ Pistazie	$\delta^{18}O$ Rückst.	$\delta^{18}O$ Öl
MSA-Maß	0,761	0,915	0,722	0,728	0,715	0,877	0,891	0,834

Das KMO-Maß zeigt mit einem Wert von ca. 0,8 (s. Tabelle 38) eine recht gute Eignung der gesamten Korrelationsmatrix für die Hauptkomponentenanalyse an. Der Bartlett-Tests bestätigt dies, denn durch das Ergebnis von $p < 0,05$ wird die Nullhypothese abgelehnt, d.h. die Variablen der Erhebungsgesamtheit sind mit einer Wahrscheinlichkeit von nahe 100 % korreliert (s. Tabelle 38). Die MSA-Werte (s. Tabelle 39) werden an den Diagonalelementen der Anti-Image-Matrize[2] abgelesen und geben Aufschluss über die Eignung der einzelnen Variablen für die Hauptkomponentenanalyse. Die Eignung der Variablen ist von „mittelprächtig“ (>0,7) über „recht gut“ (>0,8) bis „fabelhaft“ (>0,9) zu bezeichnen. Es ist somit keine Variable von der Hauptkomponentenanalyse auszuschließen.

[2] Anti-Image-Matrix:
Das *Image* beschreibt den Anteil der Varianz, der durch die verbleibenden Variablen mit Hilfe einer multiplen Regressionsanalyse erklärt werden kann, während das *Anti-Image* denjenigen Teil darstellt, der von den übrigen Variablen unabhängig ist. Da die Faktorenanalyse unterstellt, dass den Variablen gemeinsame Faktoren zugrunde liegen, ist es unmittelbar einsichtig, dass Variablen nur dann für eine Faktorenanalyse geeignet sind, wenn das Anti-Image der Variablen möglichst gering ausfällt (⇒ Nicht-Diagonal-Elemente der Anti-Image-Kovarianz-Matrix müssen nahe bei null liegen).[13,36]

6.2.2 Extraktion der Faktoren (Komponenten)

Um die den Variablen zugrunde liegenden Faktoren konkret zu bestimmen, müssen lineare Kombinationen der Variablen gebildet und das Ergebnis der Faktorenextraktion mit geeigneten Maßen beurteilt werden.

Durchführung:

Die erste Hauptkomponente wird so bestimmt, dass sie einen möglichst großen Teil der Gesamtstreuung aller beobachteten Variablen im statistischen Sinne erklärt. Der zweite Komponente wird anschließend so ermittelt, dass sie sich zur ersten orthogonal verhält (mit dieser also unkorreliert ist) und einen möglichst großen Teil der verbleibenden Streuung erklärt. Auf diese Weise lassen sich immer weitere Komponenten bestimmen, bis im Extremfall so viele Komponenten ermittelt wurden, wie Ausgangsvariablen im Faktorenmodell enthalten sind.[36]

Im Einzelnen werden zur gegebenen Korrelationsmatrix die sog. *Eigenwerte* und die dazugehörigen *Eigenvektoren* bestimmt. Der Eigenwert einer Komponente zeigt an, welcher Betrag der Gesamtstreuung aller beobachteten Variablen durch diese erklärt wird. Mit dem Eigenwert-Eins-Kriterium nach Kaiser oder dem Scree-Test nach Cattell wird die signifikante Komponentenzahl bestimmt. Üblicherweise werden so viele Komponenten „extrahiert" wie Eigenwerte mit einem Wert >1 vorliegen. Die zu diesen Eigenwerten gehörenden Eigenvektoren bilden die Komponenten, die Elemente der Eigenvektoren nennt man die Faktorladungen. Diese können als Korrelationskoeffizienten zwischen den betreffenden Variablen und den Komponenten verstanden werden. Ebenfalls eine große Bedeutung für die Beurteilung der Faktorenextraktion hat die sog. *Kommunalität*. Sie gibt - anders als der Eigenwert - an, welcher Teil der Streuung einer Variablen durch alle Komponenten erklärt wird.[13,36,37,121,129]

Ergebnis:

Tabelle 40: Eigenwerte und prozentueller Beitrag der Komponenten zur Erklärung der Gesamtvarianz

Komponente	Eigenwerte	% der erklärten Varianz	Kumulierte Varianz-%
1	5,100 (4,208)*	63,745 (52,595)*	63,745 (52,595)*
2	2,427 (3,319)*	30,338 (41,489)*	94,084 (94,084)*
3	0,304	3,800	97,884
4	0,094	1,173	99,057
5	0,032	0,399	99,456
6	0,018	0,231	99,687
7	0,015	0,191	99,878
8	0,010	0,122	100,000

* Werte in Klammern ergeben sich mit der Varimax-Rotation.

Tabelle 41: Anfängliche und mit zwei Faktoren extrahierte Kommunalitäten

Kommunalitäten		Anfänglich	Extraktion
$\delta^{13}C_{PDB}$	**Pistazie**	1,000	0,924
$\delta^{13}C_{PDB}$	**Rückstand**	1,000	0,935
$\delta^{13}C_{PDB}$	**Pistazienöl**	1,000	0,967
$\delta^{15}N_{Air}$	**Pistazie**	1,000	0,930
$\delta^{15}N_{Air}$	**Rückstand**	1,000	0,926
$\delta^{18}O_{VSMOW}$	**Pistazie**	1,000	0,941
$\delta^{18}O_{VSMOW}$	**Rückstand**	1,000	0,950
$\delta^{18}O_{VSMOW}$	**Pistazienöl**	1,000	0,953

Tabelle 40 ist zu entnehmen, dass die erste Hauptkomponente schon über 60 % der Gesamtstreuung der Variablen erklärt, die zweite steuert ca. 30 % bei und die dritte nur noch knapp 4 %. Danach nimmt der Erklärungsbeitrag aller weiteren Komponenten rapide ab. Damit wird die Auswahl der Faktorenzahl für die weiteren Schritte der Hauptkomponentenanalyse recht einfach: Da Komponente 1 und 2 zusammen schon fast die gesamte Erklärung der Varianz (>90 %) liefern, ist die Einbeziehung aller übrigen, weniger aussagekräftigen Faktoren nicht mehr nötig. Richtet man sich nach dem Kaiser-Kriterium, sollten diejenigen Komponenten ins Modell aufgenommen werden, die einen Eigenwert >1 haben. Dies sind in diesem Fall auch nur die ersten beiden Komponenten, alle anderen haben Werte nahe Null.

Tabelle 41 enthält die Werte der Kommunalitäten. Sie gibt in der Spalte *Anfänglich* die Kommunalitäten an, die sich ergeben, solange im ersten Schritt der Faktorextraktion insgesamt acht Faktoren (alle Stabilisotopenvariablen) unterschieden werden. Die Spalte *Extraktion* gibt nun die Kommunalitäten für die abschließende Lösung der Faktorextraktion wieder. Sie sind kleiner als Eins, da nur noch zwei Faktoren im Faktormodell verwendet werden, die nur einen Teil der Streuung jeder Variablen erklären können.[36] Die Werte der Kommunalitäten liegen jedoch trotzdem noch für alle Variablen nahe Eins. Dies bedeutet, dass durch die beiden ersten Hauptkomponenten (Faktoren) fast die gesamte Streuung jeder einzelnen Variablen erklärt wird. Damit hat sich die vorangegangene Auswahl von nur zwei Faktoren für die weitere Hauptkomponentenanalyse als ausreichend für den Erklärungsgehalt erwiesen.

6.2.3 Faktorinterpretation / Rotation

Es soll nun versucht werden, die Faktoren mit Hilfe der Faktorladungen zu interpretieren.

Durchführung:

Die Faktorladung ist ein Maß für den Zusammenhang zwischen Variablen und Faktor und ist somit ein Korrelationskoeffizient.[13] Große Faktorladungen zeigen daher eine große Bedeutung eines Faktors für die entsprechende Variable an, kleine dagegen eine geringe. Ein Faktor ist dann leicht zu interpretieren, wenn einige Variablen hoch auf ihn laden (Werte > |0,5|) und gleichzeitig die Landungen der anderen Variablen auf diesen Faktor gering sind.[36]

Ergebnis:

Tabelle 42: Komponentenmatrix

	Faktor 1	Faktor 2
$\delta^{18}O$ Pistazienöl	0,972	
$\delta^{18}O$ Pistazie	0,953	
$\delta^{18}O$ Rückstand	0,947	
$\delta^{15}N$ Pistazie	0,730	-0,629
$\delta^{15}N$ Rückstand	0,724	-0,633
$\delta^{13}C$ Pistazienöl	0,642	0,746
$\delta^{13}C$ Rückstand	0,668	0,699
$\delta^{13}C$ Pistazie	0,660	0,699

Werte <0,5 sind nicht aufgeführt.

Tabelle 43: Rotierte Komponentenmatrix

Varimax-Rotation	Faktor 1	Faktor 2
$\delta^{15}N$ Pistazie	0,960	
$\delta^{15}N$ Rückstand	0,957	
$\delta^{18}O$ Rückstand	0,907	
$\delta^{18}O$ Pistazie	0,884	
$\delta^{18}O$ Pistazienöl	0,848	
$\delta^{13}C$ Pistazienöl		0,979
$\delta^{13}C$ Rückstand		0,957
$\delta^{13}C$ Pistazie		0,952

Werte <0,5 sind nicht aufgeführt.

In Tabelle 42 sind die nach Größe sortierten Werte der Komponentenmatrix wiedergegeben und es ist deutlich zu erkennen, dass alleinig das Sauerstoffverhältnis auf den ersten Faktor hoch lädt. Die Stickstoff- und Kohlenstoffvariablen erweisen sich dagegen als heterogen, denn sie laden jeweils auf beiden Faktoren ungefähr gleich hoch. Somit ist eine Interpretation der Faktoren erst einmal nicht möglich.

Wird die Komponentenladungsmatrix allerdings durch orthogonale Drehung transformiert (Varimax-Verfahren), ergibt sich eine neue Komponentenmatrix wie sie in Tabelle 43 dargestellt ist. Durch die Rotation werden auch die Eigenwerte und der prozentuelle Beitrag der Komponenten zur Erklärung der Gesamtvarianz beeinflusst (s. Werte in Klammern in Tabelle 40). Die Faktoren in der rotierten Form weisen eine viel klarere Beziehung zu den einzelnen Variablen auf. Es ist nun deutlich zu erkennen, dass Komponente 1 vornehmlich von den Stickstoff- und Sauerstoffvariablen beschrieben wird, während auf Komponente 2 nur die Variablen der Kohlenstoffisotope laden.

6.2.4 Grafische Darstellung der Faktorwerte

Durchführung:

Die Schätzung der Faktorwerte erfolgte auf Basis einer multiplen Regressionsrechnung. Dies führt zu standardisierten Faktorwerten mit einem Mittelwert von Null und einer Standardabweichung von Eins, die bei zwei Komponenten, wie in diesem Fall, in einem Streudiagramm grafisch dargestellt werden können. Für die inhaltliche Interpretation der Komponentenwerte ist jedoch zu beachten, dass die Komponenten unter Verwendung aller Faktorladungen aus der rotierten Komponentenmatrix berechnet werden; in Tabelle 43 wurden nur die Ladungen >0,5 aufgeführt. Auch kleine Faktorladungen haben einen gewissen Einfluss auf die Größe der Faktorwerte.

Ergebnis:

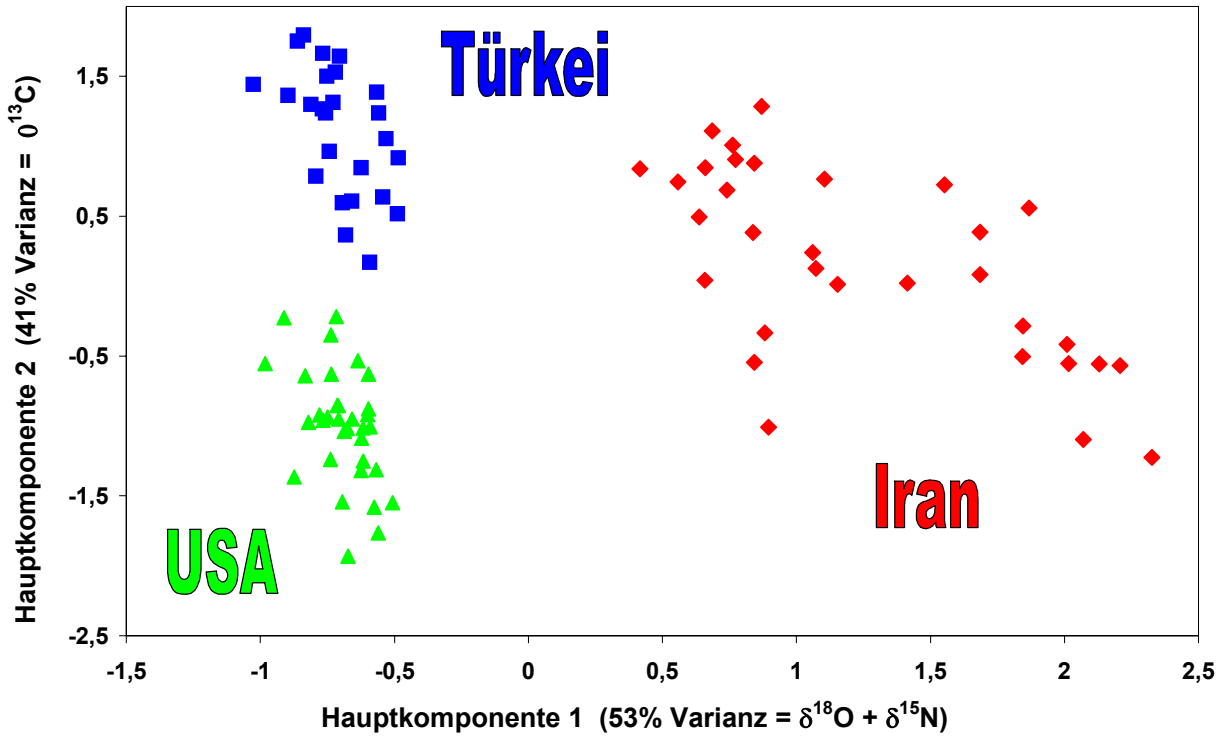


Abbildung 45: Grafische Darstellung der Varimax-rotierten Faktorwerte aus der Hauptkomponentenanalyse mit dem authentischen Pistaziendatensatz

Die grafische Darstellung der Faktorwerte in Abbildung 45 zeigt deutlich, dass sich der Datensatz der authentischen Pistazienmesswerte in drei separate Punktwolken gruppiert. Durch die unterschiedliche Farbgebung der drei untersuchten Länder zeigt sich weiterhin, dass sich der Datensatz auch genau in diese aufteilt. Somit ist die Trennfähigkeit der verwendeten Variablen, d.h. der Stabilisotopenverhältnisse von Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff, in die drei Hauptanbaugebiete der Pistazien bewiesen. Dabei ist die Hauptkomponente 1 ($\delta^{18}O$- und $\delta^{15}N$-

Variablen) nur für die vollständige Abtrennung der iranischen Proben von denen der beiden anderen Ländern verantwortlich und erst durch die Hauptkomponente 2 ($\delta^{13}C$-Variablen) wird die vollständige Trennung zwischen den amerikanischen und türkischen Pistazien erreicht.

Diese Aufteilung der Trennrichtungen zwischen den Elementen ist mit Hilfe der Box-Plot- und Streudiagramm-Darstellungen zu erklären. In Kapitel 5.2 und 6.1 wurde bereits dargelegt, dass das Sauerstoffisotop schon univariat die vollständige Trennung zwischen den beiden Pistazienhauptanbauländern leistet, während sich die türkischen Werte genau dazwischen anordnen. Univariat wurde ebenfalls erkannt, dass das Stickstoffisotop eine fast vollständige Trennung der iranischen und amerikanischen Proben schafft, sich aber türkische und amerikanische Proben in diesem Element überschneiden. Aus diesem Grund sind die Sauerstoff- und Stickstoffvariablen in der ersten Hauptkomponente gebündelt und dienen zur Abtrennung der iranischen Pistazien von denen aus den USA und der Türkei.

Die vollständige Abtrennung der türkischen Messwerte von den amerikanischen wird erst durch die Hauptkomponente 2 (y-Richtung) erreicht, deren Trennkraft hauptsächlich auf dem Kohlenstoffisotop beruht. Es fließen hier allerdings noch geringfügig die guten Trenneigenschaften des Sauerstoffs mit ein. Die rotierten Faktoren der Sauerstoffisotopen-Variablen der zweiten Hauptkomponente wurden in Tabelle 43 zwar nicht aufgeführt, weil die <0,5 und daher nicht als „hoch ladend“ zu bezeichnen sind, doch liegen sie immerhin zwischen 0,3 und 0,5 und gehen somit nicht unerheblich in die Berechnung der Faktorwerte mit ein. Aufgrund dessen ist auch die Punktwolke der iranischen Messwerte ein wenig in y-Richtung verschoben. Die in Tabelle 43 nicht aufgeführten rotierten Faktoren für die Stickstoffisotopen-Variablen liegen dagegen unter 0,1, d.h. sie tragen nur sehr geringfügig zur Hauptkomponente 2 und damit zur Trennung der USA-Proben von denen der Türkei bei.

Beim Vergleich der grafischen Darstellung der Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse mit den einfachen x-y-Streudiagrammen der einzelnen Stabilisotopenvariablen aus Kapitel 6.1 (s. Abbildung 41-43) ist eine erhebliche Verbesserung in der Ländertrennung zu erkennen. Die iranischen Proben sind deutlich von denen der beiden anderen Länder abgetrennt, was jedoch schon teilweise mit den einfachen Streudiagrammen erreicht wurde. Durch die Hauptkomponentenanalyse ist es nun aber gelungen, auch die türkischen Pistazien vollständig von den amerikanischen zu trennen. Hiermit ist auch eine erhebliche Verbesserung gegenüber den Ergebnissen von Anderson et al.[7] (s. Kapitel 6.1, Abbildung 44) erreicht worden, die keine multivariate Datenauswertung angewendet haben, sondern mit der alleinigen Abtrennung der amerikanischen Proben von denen des Irans und der Türkei zufrieden waren.

6.3 Diskriminanzanalyse

Die im vorangegangenen Kapitel 6.2 durchgeführte Hauptkomponentenanalyse hat gezeigt, dass die gemessenen Stabilisotopenverhältnisse grundsätzlich eine gute Trennkraft bezüglich der Pistazienherkunftsländer besitzen. Der authentische Datensatz wurde grafisch in drei separate Punktwolken aufgeteilt, die auch genau den drei Ländern Iran, USA und Türkei entsprechen. Eine Diskriminanzanalyse wird nun durchgeführt, um über die vollständige Trennung des Datensatzes ein Klassifizierungsmodell zu erstellen, denn nur so können neue, unbekannte Proben einem Land zugeordnet werden.

6.3.1 Schrittweise Diskriminanzanalyse

Durchführung:

Bei der schrittweisen Diskriminanzanalyse werden die Variablen solange einzeln nacheinander in das Modell einbezogen, bis von den noch nicht aufgenommenen kein signifikanter Erklärungsbeitrag mehr zu erwarten ist. Das Selektionskriterium hierbei ist das Wilks´Lambda Gütemaß, und zwar wird diejenige Variable zuerst in das Modell aufgenommen, für die sich der kleinste Wilks´Lambda Wert ergibt. Nach der Aufnahme der zweiten Variable wird die erste erneut daraufhin überprüft, ob sie auch noch in Kombination mit der zweiten Variable einen genügend großen Erklärungswert (Signifikanztest über partiellen F-Wert) für die Diskriminanzfunktion liefert. Anschließend folgen analog weitere Schritte, bis keine der noch nicht aufgenommenen Variablen das Aufnahmekriterium mehr erfüllt. Als Signifikanzgrenzwert (minimaler partieller F-Wert) für die Aufnahme einer Variablen in das Modell wird der in SPSS 12.0 voreingestellte Wert 3,84 genommen, der Grenzwert (maximaler partieller F-Wert) für den erneuten Ausschluss einer schon ins Modell aufgenommenen Variable ist 2,71.

Neben dem F-Wert und Wilks´Lambda wird auch die Toleranz als Kriterium für die Aufnahme oder den Ausschluss einer Variablen in der schrittweisen Diskriminanzanalyse verwendet. Sie ist ein Maß dafür, wie stark die unabhängigen Variablen untereinander korreliert sind und ist definiert als $1-\varsigma^2$, wobei ς^2 der quadrierte multiple Korrelationskoeffizient zwischen der jeweils betrachteten Variablen und der Gesamtheit der anderen bereits im Modell aufgenommenen Variablen ist. Liegt eine starke Korrelation vor, ergibt sich ein hohes ς^2 und damit ein niedriger Toleranzwert. Per Voreinstellung von SPSS 12.0 werden Variablen dann nicht in das Modell aufgenommen, wenn ihr Toleranzwert unter 0,001 liegt bzw. diese das Toleranzniveau einer bereits im Modell enthaltenen Variable auf einen Werte unter 0,001 verringern würden.

Ergebnis 1:

Tabelle 44: Ergebnis der schrittweisen Diskriminanzanalyse mit allen Variablen des authentischen Datensatzes der Pistazien

Schritt	aufgenommeneVariable	Toleranz	F-Wert für Ausschluss	Wilks´ Lambda
1	$\delta^{18}O$ Öl	1,000	815,904	
2	$\delta^{18}O$ Öl	0,999	561,817	0,266
	$\delta^{13}C$ Öl	0,999	71,930	0,051
3	$\delta^{18}O$ Öl	0,449	15,169	0,019
	$\delta^{13}C$ Öl	0,984	36,687	0,026
	$\delta^{18}O$ Rückstand	0,448	15,784	0,019
4	$\delta^{18}O$ Öl	0,439	15,977	0,016
	$\delta^{13}C$ Öl	0,952	20,911	0,018
	$\delta^{18}O$ Rückstand	0,446	11,578	0,015
	$\delta^{15}N$ Rückstand	0,895	6,853	0,014
5	$\delta^{18}O$ Öl	0,292	18,134	0,016
	$\delta^{13}C$ Öl	0,951	19,235	0,016
	$\delta^{18}O$ Rückstand	0,395	6,014	0,012
	$\delta^{15}N$ Rückstand	0,883	7,403	0,013
	$\delta^{18}O$ Pistazie	0,312	3,944	0,012

Die schrittweise Diskriminanzanalyse hat aus den acht gemessenen unabhängigen Variablen fünf in das Modell aufgenommen (s. Tabelle 44). Darunter sind alle drei Variablen des Sauerstoff-Isotopenverhältnisses, von denen aus der Korrelationsanalyse (s. Kapitel 5.3.5) schon bekannt ist, dass sie hoch miteinander korrelieren. Eine Grundvoraussetzung für ein aussagekräftiges Diskriminanzmodell ist jedoch, dass die verwendeten Variablen unkorreliert sind. Daher dürfen nicht alle drei Sauerstoffisotopenvariablen gleichzeitig in das Diskriminanzmodell aufgenommen werden. Ihre Korrelation ist auch an den Toleranzwerten zu erkennen: Sobald die zweite Variable des Sauerstoffs ins Modell aufgenommen wird (3. Schritt), sinken beide Toleranzwerte der Sauerstoffvariablen stark ab, mit Aufnahme der dritten (5. Schritt) sogar auf <0,4. Die schrittweise Diskriminanzanalyse wurde daher nochmals durchgeführt, und zwar ohne die Variablen „$\delta^{18}O$ Rückstand“ und „$\delta^{18}O$ Pistazie“. Die Variable “$\delta^{18}O$ Öl“ wurde im Datensatz belassen, da diese von der Diskriminanzanalyse als erstes ausgewählt wurde und somit die aussagekräftigste ist.

Ergebnis 2:

Tabelle 45: Ergebnis der schrittweisen Diskriminanzanalyse mit sechs Variablen

Schritt	aufgenommene Variable	Toleranz	F-Wert für Ausschluss	Wilks´ Lambda
1	δ^{18}O Öl	1,000	815,904	
2	δ^{18}O Öl	0,999	561,817	0,266
	δ^{13}C Öl	0,999	71,930	0,051
3	δ^{18}O Öl	0,915	148,911	0,067
	δ^{13}C Öl	0,971	28,833	0,025
	δ^{15}N Rückstand	0,896	11,639	0,019

Mit der zweiten schrittweisen Diskriminanzanalyse wurden neben der „δ^{18}O Öl“-Variable nur noch zwei weitere ausgewählt (s. Tabelle 45), und zwar genau die beiden, die auch schon in dem ersten Versuch (s. Tabelle 44) als modellrelevant angezeigt wurden: „δ^{13}C Öl“ und „δ^{15}N Rückstand“. Die Auswahl gerade dieser Element-Fraktion-Kombinationen vom System ist leicht erklärlich, denn bei der Diskriminanzanalyse kommt es neben einer großen Streuung zwischen den Gruppenmittelpunkten vor allem darauf an, dass die Streuung innerhalb der Gruppen möglichst klein ist, d.h. die Gruppen homogen sind. Die geringste Streuung innerhalb der Gruppen ist bei den Ölen zu finden, da sie flüssig und damit viel homogener als die Feststofffraktionen sind.

Die Stickstoffvariable wurde von der schrittweisen Diskriminanzanalyse als letztes ausgewählt. Bei der Betrachtung der Box-Plots (s. Abb. 39 in Kap. 5.2) und den Streudiagrammdarstellungen (s. Abb. 41 und 42 in Kap. 6.1) wurde schon erkannt, dass dieses Element die schwächste Trennkraft hinsichtlich der Pistazienherkunft hat. Es wird daher vermutet, dass das ^{15}N/^{14}N-Verhältnis nur sehr wenig zur Trennung beitragen wird und ggf. auch weggelassen werden kann. Das Diskriminanzmodell wird daher einmal mit allen drei Variablen, die die schrittweise Diskriminanzanalyse als optimale Lösung ausgegeben hat, und als zweites nur mit den beiden ersten Variablen („δ^{18}O Öl“ und „δ^{13}C Öl“) erstellt.

6.3.2 Erstellung des Diskriminanzmodells

6.3.2.1 Schätzung der Koeffizienten der Diskriminanzfunktionen

Das Ziel der Diskriminanzanalyse besteht in der Schätzung der Koeffizienten für die Diskriminanzfunktionen, mit Hilfe derer die untersuchten Gruppen möglichst optimal/vollständig getrennt werden. Im vorliegenden Fall sind zwei Diskriminanzfunktionen zu schätzen, da drei Gruppen/Länder getrennt werden sollen. Das Statistikprogramm SPSS 12.0 gibt auf Grundlage der zuvor mit der schrittweisen Diskriminanzanalyse ermittelten 3-Variablenkombination („δ^{18}O Öl“, „δ^{13}C Öl“ und „δ^{15}N Rückstand“) folgende Koeffizienten für die zwei Diskriminanzfunktionen aus:

$$\mathbf{d_1 = 0{,}891 \times „\delta^{18}O\ Öl“ + 0{,}564 \times „\delta^{13}C\ Öl“ + 0{,}061 \times „\delta^{15}N\ Rückstand“ - 12{,}585}$$

$$\mathbf{d_2 = -0{,}017 \times „\delta^{18}O\ Öl“ + 1{,}788 \times „\delta^{13}C\ Öl“ - 0{,}370 \times „\delta^{15}N\ Rückstand“ + 53{,}235}$$

Für die 2-Variablenkombination („δ^{18}O Öl“ und „δ^{13}C Öl“) haben die Koeffizienten der Diskriminanzfunktionen nachstehende Werte:

$$\mathbf{d_1 = 0{,}917 \times „\delta^{18}O\ Öl“ + 0{,}536 \times „\delta^{13}C\ Öl“ - 14{,}059}$$

$$\mathbf{d_2 = -0{,}244 \times „\delta^{18}O\ Öl“ + 2{,}374 \times „\delta^{13}C\ Öl“ + 76{,}480}$$

Um nun die Werte der Diskriminanzfunktion für die einzelnen Proben zu berechnen, sind lediglich die Ausprägungen der drei erklärenden Variablen in diese Funktionen einzusetzen.

6.3.2.2 Beurteilung der Trennkraft/Güte der Diskriminanzfunktionen

Im nächsten Schritt ist die Trennkraft (Güte) der ermittelten Diskriminanzfunktionen zu beurteilen, wofür mehrere Maßzahlen zur Verfügung stehen.

Durchführung:

Es wird zu jeder Diskriminanzfunktion der dazugehörige Eigenwert γ (Maximalwert des Diskriminanzkriteriums Γ) bestimmt, der sowohl in seiner Berechnung als auch in dem zugrunde liegenden Konzept weitgehend dem F-Wert einer Varianzanalyse entspricht. Er ergibt sich aus dem Quotienten der Quadratsummen zwischen den Gruppen und innerhalb der Gruppen. Er ist somit eine Kennzahl dafür, wie „sauber“ die Diskriminanzfunktion zwischen den verschiedenen Objekten der abhängigen Variablen zu trennen in der Lage ist. Er wird der Einfachheit halber meist

normiert, so dass er Werte zwischen Null und Eins annimmt. Bei der Diskriminanzanalyse wird ein möglichst großer Eigenwert (nahe Eins) angestrebt, denn dann ist gewährleistet, dass sich die Funktionswerte der einzelnen Gruppen deutlich voneinander unterscheiden, während die Werte innerhalb einer Gruppe sehr ähnlich sind.[13,36]

Das im Zusammenhang mit der Diskriminanzanalyse häufiger betrachtete Kriterium ist *Wilks´ Lambda* Λ, welches den Anteil der Streuung innerhalb der Gruppen an der gesamten Streuung ($\Lambda = \Pi\ 1/(1+\gamma)$) kennzeichnet. Auch dieser Wert ist normiert, jedoch zeigen hier kleine Werte (nahe Null) eine gute Trennung zwischen den Gruppen an. Wilks´ Lambda lässt sich außerdem in ein annähernd Chi(χ)²-verteiltes Maß transformieren, so dass ein Hypothesentest durchgeführt werden kann. Hierbei wird getestet, ob zwischen den durchschnittlichen Funktionswerten in den einzelnen Fallgruppen kein Unterschied besteht.

Der kanonische Korrelationskoeffizient misst wiederum den Anteil der Streuung zwischen den Gruppen und der gesamten Streuung. Die Werte des Koeffizienten liegen zwischen Null und Eins, wobei ein hoher kanonischer Korrelationskoeffizient auf eine gute Trennung zwischen den Gruppen und damit auf einen hohen Erklärungsgehalt des Modells hinweist.[13,36]

Ergebnis:

Tabelle 46: Maßzahlen zur Überprüfung der Modellgüte der Diskriminanzanalyse mit 3 und 2 Variablen

Funktion	Eigenwert	% der Varianz	Kanonische Korrelation
1	19,781 (19,633)	90,1 (92,6)	0,976 (0,975)
2	2,177 (1,559)	9,9 (7,4)	0,828 (0,781)

Die in Klammern stehenden Werte sind die Ergebnisse aus der 2-Variablenkombination.

Tabelle 47: Wilks´ Lambda und χ^2-Test zur Bewertung der Modellgüte

Funktionen	Wilks´s Lambda	χ^2-Signifikanz
1 und 2	0,015 (0,019)	0,000 (0,000)
nur 2	0,315 (0,391)	0,000 (0,000)

Die in Klammern stehenden Werte sind die Ergebnisse aus der 2-Variablenkombination.

Im vorliegenden Fall sind die Eigenwerte beider Funktionen beider Variablenkombinationen als hoch zu bezeichnen, wobei der Wert der ersten Diskriminanzfunktion wesentlich größer als der der zweiten ist (s. Tabelle 46). Dies kommt auch in der Spalte „% der Varianz“ zum Ausdruck, in der angegeben wird, welcher Anteil der gesamten Streuung (berechnet als Summe der Quadratsummen zwischen den Gruppen) auf die einzelnen Funktionen entfällt. Die erste Funktion leistet hier mit über 90 % fast alleinig die Trennung der Gruppen. Des Weiteren zeigen die kano-

nischen Korrelationskoeffizienten mit den hier errechneten Werten von >0,7 an, dass sich beide Funktionen beider Variablenkombinationen als erklärungsrelevant für das Modell erweisen, auch wenn die zweite Funktion nur ca. 10 % zur Trennung beiträgt.

Tabelle 47 enthält die Maßzahlen zur Beurteilung der Modellgüte. Mit einem Wilks´ Lambda Wert von <0,02 liefert die Kombination der beiden Funktionen eine hervorragende Trenngüte, was der Signifikanztest mit der Ablehnung der Nullhypothese bestätigt. Diese Nullhypothese wird ebenfalls abgelehnt, wenn nur noch die zweite Funktion betrachtet wird, d.h. auch diese Funktion trägt signifikant zur Trennung bei.

6.3.2.3 Ableitung des Erklärungsbeitrags der einzelnen Variablen

Nachdem alle betrachteten Kennzahlen eine sehr gute Modellgüte sowohl für die 3- als auch für die 2-Variablenkombination anzeigen, ist es als nächstes interessant, den Erklärungsbeitrag der einzelnen Variablen abzuleiten.

Durchführung:

Es wird einer Korrelationsanalyse durchgeführt, bei der jedoch die *gepoolten* Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen unabhängigen Variablen und den Diskriminanzfunktionen berechnet werden. Hierbei ergeben sich Koeffizienten für die gesamten Variablen, deren Werte zwischen Null und Eins liegen und die aus allen Fällen des verwendeten Datensatzes gleichzeitig und gleichberechtigt berechnet werden („Struktur-Matrix“). Für die Rückschlüsse von den Beiträgen der Koeffizienten auf den Erklärungsgehalt der Variablen gibt es jedoch Einschränkungen: Sobald Korrelationen zwischen den Variablen vorliegen könnten die Koeffizienten verzerrt sein und derartige Rückschlüsse sind dann nicht mehr uneingeschränkt möglich.[36]

Ergebnis:

Tabelle 48: Struktur-Matrix der 3-Variablenkombination

	Funktion 1	**Funktion 2**
δ^{18}O Öl	**0,973**	-0,137
δ^{13}C Öl	0,252	**0,831**
δ^{15}N Rückstand	0,299	**-0,691**

Tabelle 49: Struktur-Matrix der 2-Variablenkombination

	Funktion 1	**Funktion 2**
δ^{18}O Öl	**0,975**	-0,220
δ^{13}C Öl	0,257	**0,966**

Die Korrelationsmatrix der gepoolten Koeffizienten der 3-Variablenkombination (s. Tabelle 48) gibt ein recht eindeutiges Bild über den jeweiligen Erklärungsbeitrag der drei Variablen zu den beiden Funktionen aus: Das Sauerstoffisotop des Öls korreliert sehr hoch (>0,9) mit der Diskriminanzfunktion 1, während die beiden anderen Variablen mit Werten <0,3 kaum einen Erklärungsbeitrag zu dieser Funktion leisten. Das Kohlenstoff- und Stickstoffisotop korrelieren dafür mit der 2. Diskriminanzfunktion sehr stark (>|0,7|) und erklären dort gemeinsam die Trenneigenschaften. Dafür leistet hier die Sauerstoffvariable praktisch keinen Beitrag. Anders als bei der Hauptkomponentenanalyse lädt das Stickstoffisotop hier auf der 2. Diskriminanzfunktion, zusammen mit dem Kohlenstoff. Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da der Grundgedanke zur Bündelung von Variablen bei diesen beiden multivariaten Analysen völlig verschieden ist. Die Hauptkomponentenanalyse sucht nach Korrelationen zwischen Variablen (daher laden Sauerstoff und Stickstoff auf der 1. Hauptkomponente), während bei der Diskriminanzanalyse die Gruppen vorgegeben werden und über die Streuung in und zwischen den Gruppen nach der maximalen Trennmöglichkeit gesucht wird.
Die Struktur-Matrix der 2-Variablenkombination (s. Tabelle 49) gibt eine analoge Beziehung der Variablen zu den Funktionen aus: Die Sauerstoffvariable korreliert sehr hoch mit der ersten Funktion und kaum mit der zweiten, während die Kohlenstoffvariable die Trennkraft der zweite Funktion ausmacht und kaum einen Erklärungsbeitrag zur ersten liefert.

Das Sauerstoffisotop ist somit das Element, was den größten Beitrag zur Trennung der Pistazien nach ihrer Herkunft leistet, denn es lädt fast alleinig auf der 1. Diskriminanzfunktion (Korrelationskoeffizient >0,9, s. Tab. 48 und 49), die wiederum über 90 % der Varianz erklärt (s. Kapitel 6.3.2.2, Tabelle 46).

6.3.3 Prüfung des Klassifizierungsmodells

Nachdem das Klassifizierungsmodell mit Hilfe des authentischen Probenmaterials erstellt wurde, muss nun die Güte der Klassifikation überprüft werden. Dies erfolgt aufgrund der gepoolten Varianzen innerhalb der Gruppen und das Statistik-Programm SPSS 12.0 berechnet die Sicherheit optional nach drei verschiedenen Methoden:[36]

1. Resubstitutionsmethode (R-Methode),
2. Leaving-one-out-Methode (L-Methode),
3. Hold-out-Methode (H-Methode).

Durchführung:

Die einfachste und am weitesten verbreitete Prozedur zur Prüfung der Klassifikationsgüte eines Diskriminanzmodells ist die *Resubstitutionsmethode*, bei der es sich um bloßes Wiedereinsetzen aller Lernobjekte selbst in das Klassifikationsmodell handelt. Da so die Fehlerrate auf Basis derselben Stichprobe berechnet wird, die auch für die Schätzung der Diskriminanzfunktion verwendet wurde (und diese so ermittelt wurde, dass die Fehlerrate in der verwendeten Stichprobe minimal wird), führt dies zwangsläufig zu einer Unterschätzung der Fehlerrate, vor allem bei kleinen Stichprobenumfängen.[13,56,129]

Die *Leaving-one-out-Methode* liefert dagegen einen im Mittel richtigen Schätzwert, denn hier werden Lernobjekte getestet, die selbst nicht in das Klassifizierungsmodell eingegangen sind. Dazu wird jedes der n Lernobjekte der Reihe nach genau einmal vom Datensatz isoliert. Die Klassifikationsregel, die dann auf das isolierte Objekt angewendet wird, ergibt sich aus den jeweils verbleibenden n-1 Lernobjekten. Da auch das isolierte Objekt zum ursprünglichen Lerndatensatz gehörte, ist seine Herkunft bekannt, und es können sukzessiv die Fehlentscheidungen ausgezählt werden. Dadurch ergibt sich eine realistische und im Allgemeinen höhere Fehlerrate als bei der R-Methode. Die R-Methode dient häufig nur dazu, die Verlässlichkeit der L-Methode zu überprüfen. Sind beide Schätzwerte gleich, so deutet dies darauf hin, dass der gewählte Stichprobenumfang groß genug für ein verlässliches Klassifikationsmodell und die Angabe einer Fehlerrate ist. Klaffen die beiden Schätzungen weit auseinander, deutet dies auf das Gegenteil hin: der Stichprobenumfang ist zu klein.[56,129]

Bei der *Hold-out-Methode* wird der Datensatz in zwei Teile untergliedert, wobei der eine Teil als Lernstichprobe zur Schätzung der Diskriminanzfunktionen dient, während der andere als Kontrollstichprobe zur Schätzung der Fehlerrate fungiert (prozentuale Unterteilung Lernstichprobe/Kontrollstichprobe: 50/50 oder 70/30). Die H-Methode ist nur dann zweckmäßig, wenn eine hinreichend große Stichprobe zur Verfügung steht, da mit abnehmender Größe der Lernstichprobe die Zuverlässigkeit der geschätzten Diskriminanzkoeffizienten abnimmt.[13,129]

Ergebnis:

Tabelle 50: Klassifikationsmatrix mit den Ergebnissen der 3- und 2-Variablenkombination nach der R-, L- und H-Methode

		Vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit				
Prüfmethode	**Gruppe**	**Iran**	**USA**	**Türkei**	**Gesamt**	**Fälle**
R-Methode	**Iran**	**100 %**	0 %	0 %	100 %	32
	USA	0 %	**100 %**	0 %	100 %	33
	Türkei	0 %	0 %	**100 %**	100 %	25
L-Methode	**Iran**	**100 %**	0 %	0 %	100 %	32
	USA	0 %	**100 %**	0 %	100 %	33
	Türkei	0 %	0 %	**100 %**	100 %	25
H-Methode*	**Iran**	**100 %**	0 %	0 %	100 %	16
	USA	0 %	**100 %**	0 %	100 %	16
	Türkei	0 %	0 %	**100 %**	100 %	12

* Für die Berechnung der H-Methode wurden die Gruppen per Zufallsgenerator in jeweils 50 % Lern- und 50 % Kontrollstichprobe unterteilt.

Tabelle 50 zeigt die Klassifikationsmatrix mit dem Berechnungsergebnis der Fehlerraten nach der R-, L- und H-Methode. Die 3- und 2-Variablenkombination liefern hierbei exakt die gleichen Werte, daher ist nur eine Tabelle dargestellt. Das Ergebnis aller drei Methoden ist sehr eindeutig: Alle authentischen Proben werden in ihre vorgegebene Gruppe richtig eingeordnet, was durch die relative Häufigkeit von 100 % zum Ausdruck gebracht wird. Damit ist dieses Klassifizierungsmodell hervorragend dazu geeignet, Pistazien unbekannter Herkunft den Ländern Iran, USA oder Türkei zuzuordnen oder deren Etikettierung zu überprüfen.

6.3.4 Klassifizierungsfunktionen nach Fisher

Die Klassifizierung von Merkmalselementen kann auch über Fishers lineare Klassifizierungsfunktionen erfolgen. Die Berechnung der Funktionen erfolgt zunächst mit SPSS 12.0, aber danach kann die Gruppenzugehörigkeit einer unbekannten Probe ohne das kanonische Diskriminanzmodell bzw. ohne die Zuhilfenahme einer Statistik-Software ermittelt werden. Die δ-Messwerte einer Probe werden einfach direkt in die Funktionen eingesetzt (z.B. unter Zuhilfenahme eines Taschenrechners) und derjenigen Gruppe zugeordnet, für die der Funktionswert F maximal wird.

Durchführung:
Nach Fisher wird für jedes der drei hier untersuchten Länder eine lineare Klassifizierungsfunktion erstellt. Vorraussetzung für die Anwendbarkeit der Fisher´schen Klassifizierungsfunktionen ist jedoch die Annahme gleicher Kovarianzmatrizen in den Gruppen (Box-M-Signifikanztest). Zur Überprüfung der Güte des Klassifikationsmodells kann hier die R- und H-Methode eingesetzt werden.

Ergebnis:

3-Variablenkombination:

$$\mathbf{F_{Iran} = 41{,}556 \times „\delta^{18}O\ Öl“ - 182{,}362 \times „\delta^{13}C\ Öl“ - 13{,}451 \times „\delta^{15}N\ Rückstand“ - 3359{,}922}$$

$$\mathbf{F_{USA} = 32{,}395 \times „\delta^{18}O\ Öl“ - 187{,}859 \times „\delta^{13}C\ Öl“ - 14{,}142 \times „\delta^{15}N\ Rückstand“ - 3222{,}118}$$

$$\mathbf{F_{Türkei} = 37{,}272 \times „\delta^{18}O\ Öl“ - 179{,}101 \times „\delta^{13}C\ Öl“ - 14{,}969 \times „\delta^{15}N\ Rückstand“ - 3112{,}862}$$

2-Variablenkombination:

$$\mathbf{F_{Iran} = 36{,}360 \times „\delta^{18}O\ Öl“ - 173{,}343 \times „\delta^{13}C\ Öl“ - 3173{,}467}$$

$$\mathbf{F_{USA} = 26{,}932 \times „\delta^{18}O\ Öl“ - 178{,}376 \times „\delta^{13}C\ Öl“ - 3016{,}012}$$

$$\mathbf{F_{Türkei} = 31{,}490 \times „\delta^{18}O\ Öl“ - 169{,}065 \times „\delta^{13}C\ Öl“ - 2881{,}964}$$

Tabelle 51: Fisher-Klassifikationsmatrix mit den Ergebnissen der 3- und 2-Variablenkombination nach der R- und H-Methode

		Vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit				
Prüfmethode	**Gruppe**	**Iran**	**USA**	**Türkei**	**Gesamt**	**Fälle**
R-Methode	**Iran**	**100 %**	0 %	0 %	100 %	32
	USA	0 %	**100 %**	0 %	100 %	33
	Türkei	0 %	0 %	**100 %**	100 %	25
H-Methode*	**Iran**	**100 %**	0 %	0 %	100 %	16
	USA	0 %	**100 %**	0 %	100 %	16
	Türkei	0 %	0 %	**100 %**	100 %	12

* Für die Berechnung der H-Methode wurden die Gruppen per Zufallsgenerator in jeweils 50 % Lern- und 50 % Kontrollstichprobe unterteilt.

Nach dem Box-M-Signifikanztest (Ergebnisse nicht dargestellt) liegen keine gleichen Kovarianzmatrizen in den Gruppen des authentischen Pistaziendatensatzes vor und die linearen Klassifizierungsfunktionen nach Fisher dürften nicht angewandt werden. Tabelle 51, die die Werte der Fehlerrate zur Prüfung der Modellgüte nach der R- und H-Methode enthält, zeigt allerdings das gleiche Ergebnis wie es mit den kanonischen Diskriminanzfunktionen (s. vorheriges Kap. 6.3.3) erreicht wurde: Alle Proben beider Variablenkombinationen werden durch die Fisher´schen Klassifizierungsfunktionen in ihre vorgegebene Gruppe richtig eingeordnet. Aus diesem eindeutigen Ergebnis kann abgeleitet werden, dass die Fisher'schen Klassifizierungsfunktionen trotz fehlender Voraussetzung hier anwendbar sind und als Alternative zum kanonischen Diskriminanzmodell zur „schnellen" Bestimmung der Herkunft einer Pistazienprobe genutzt werden kann.

6.3.5 Grafische Darstellung der Funktionswerte

Bei einer Diskriminanzanalyse mit nur zwei Diskriminanzfunktionen kann die Lage der Funktionswerte sehr einfach grafisch in einem x-y-Streudiagramm dargestellt und dadurch die Trenngüte des Modells visualisiert werden.

Durchführung:

Es werden für sämtliche Fälle des authentischen Datensatzes mit Hilfe der beiden kanonischen Diskriminanzfunktionen die Funktionswerte errechnet und in ein Streudiagramm eingetragen. Im Falle der 2-Variablenkombination können zusätzlich mit den Fisher'schen Klassifizierungsfunktionen auch die Trenngraden (Grenzen zwischen den Gruppen/Punktwolken) berechnet und grafisch im Streudiagramm dargestellt werden.

Ergebnis:

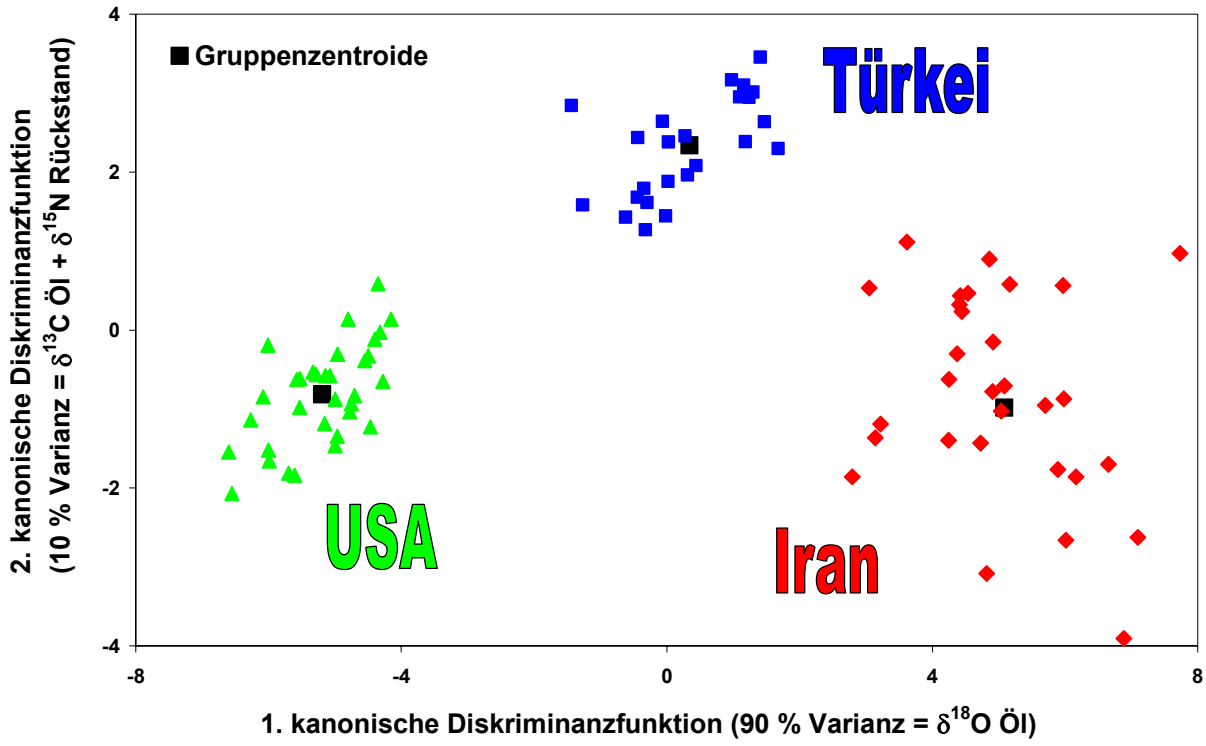


Abbildung 46: Grafische Darstellung der Funktionswerte aus der Diskriminanzanalyse mit 3 Variablen

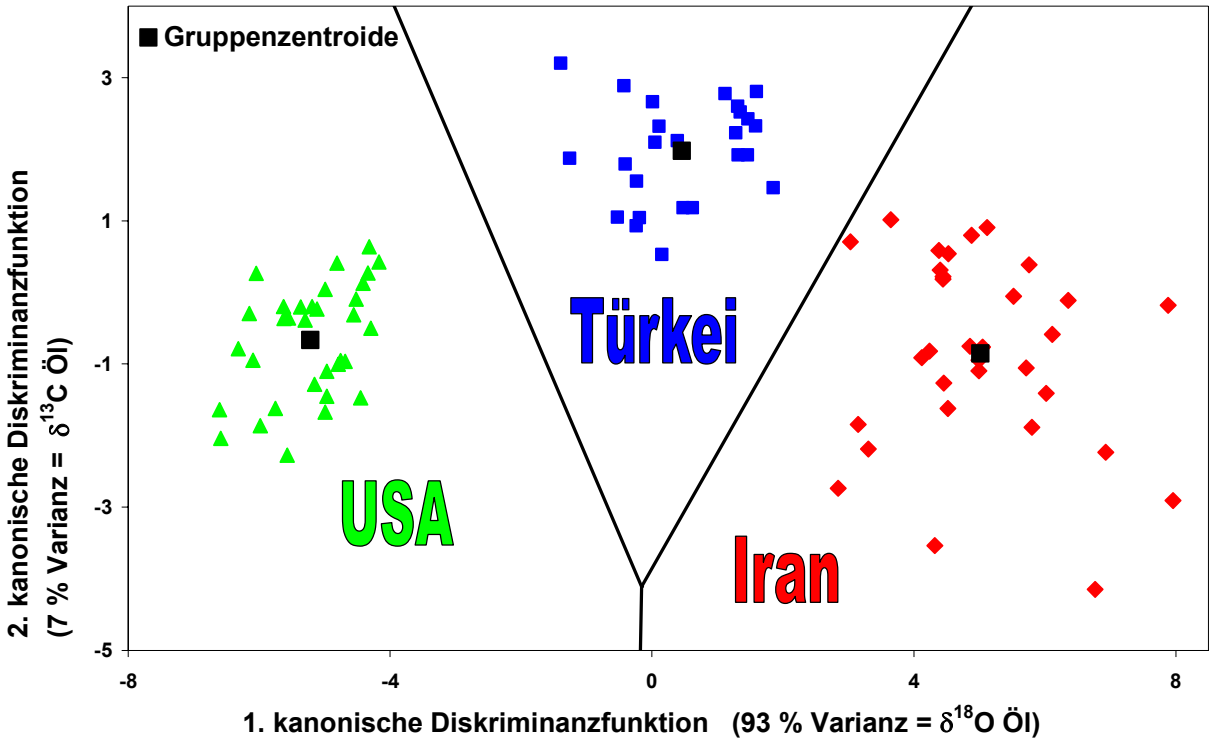


Abbildung 47: Grafische Darstellung der Funktionswerte und Trenngeraden aus der Diskriminanzanalyse mit 2 Variablen

Die grafische Darstellung der Funktionswerte (s. Abbildung 46 und 47) verdeutlicht sehr klar die hervorragende Trennleistung der beiden Klassifizierungsmodelle (3- und 2-Variablenkombination). Die Pistazienproben der Länder Iran, USA und Türkei bilden drei separate Punktwolken, zwischen denen ein deutlicher Zwischenraum liegt.
Durch die grafische Darstellung wird nun auch ein kleiner Unterschied zwischen dem 3- und 2-Variablen-Diskriminanzmodell erkennbar: Die Punktwolken der 2-Variablenkombination sind etwas größer, d.h. sie streuen mehr, und die Punktwolke der türkischen Proben liegt etwas tiefer, so dass der Abstand zwischen den Werten der türkischen und iranischen Pistazien etwas kleiner ist als bei der 3-Variablenkombination. Hier wird der Informationsverlust durch die Herausnahme der Variable „δ^{15}N Rückstand“ aus dem Diskriminanzmodell deutlich. Da jedoch beide Modelle den authentischen Datensatz vollständig zu trennen vermögen, ist die Kombination aus nur zwei Variablen als gleichwertig anzusehen. Zudem würde durch Verzicht der Vermessung des Stickstoff-Isotopenverhältnisses Geld und Analysenzeit gespart werden.

In dem vorherigen Kapitel 6.3.2.3 wurde festgestellt, dass hinter der 1. kanonischen Diskriminanzfunktion bei beiden Variablenkombinationen vor allem das Sauerstoffisotop steht. In der grafischen Darstellung der Funktionswerte (s. Abbildung 46 und 47) wird nun deutlich, dass die 1. kanonische Diskriminanzfunktion allein für die Trennung der beiden Pistazienhauptanbaugebiete Iran und USA verantwortlich ist. Die große Trennkraft des Sauerstoffisotops, welche schon

bei der Betrachtung der Sauerstoffisotopen-Box-Plots (s. Kapitel 5.2) und den einfachen Streudiagrammen (s. Kapitel 6.1) auffiel, wird natürlich auch in der Diskriminanzanalyse ausgenutzt. Die Gründe dafür liegen in der geografische Lage dieser beiden Länder und dem globalen Wasserkreislauf. Dies wird näher in der Ergebnisdiskussion (s. Kapitel 7) ausgeführt.

Die δ-Messwerte der türkischen Pistazien liegen auch bei der Diskriminanzanalyse wieder genau zwischen denen der USA und dem Iran. Jedoch wird die Punktwolke, die die Türkei repräsentiert, durch die 2. kanonische Diskriminanzfunktion auf der y-Achse nach oben verschoben, so dass sie wesentlich deutlicher von den beiden anderen Ländern abgetrennt wird als mit der Hauptkomponentenanalyse (vgl. Abb. 46 und 47 mit Abb. 45 in Kap. 6.2.4).
Dies wird hauptsächlich durch das Kohlenstoffisotopenverhältnis bewirkt, welches tendenziell, aber nicht vollständig, die drei Länder zu trennen vermag (s. Abb. 38 in Kap. 5.2).

An dieser Stelle sollte noch einmal erwähnt werden, dass wenn nur zwischen amerikanischen und iranischen Pistazien unterschieden werden soll, schon eine univariate Betrachtung des Sauerstoff-Isotopenverhältnisses ausreichend ist. Die Betrachtung der Sauerstoffisotopenwerte in den Box-Plots (s. Kapitel 5.2) hat sehr deutlich gezeigt, dass diese zwischen dem Iran und der USA so stark verschieden sind, dass eine multivariate Datenanalyse zur Authentifizierung nicht mehr nötig ist.

6.3.6 Diskriminanzanalyse mit den Isotopenvariablen der Pistazien-Gesamtnuss

Mit Hilfe der schrittweisen Diskriminanzanalyse wurden aus den acht vorhandenen Variablen die drei Isotopenverhältnis-Fraktion-Kombinationen ausgewählt, die den besten Erklärungsbeitrag (die optimale Lösung) zur Trennung der Pistazien nach ihrer Herkunft liefern. Dabei stellten sich die extrahierten Fraktionen (Öl und entfetteter Rückstand) wegen ihrer Matrixhomogenität als die besseren Variablen heraus. Die Gewinnung des Öls und des entfetteten Rückstands kostet jedoch Analysenzeit und -geld. Daher wird die Diskriminanzanalyse wiederholt, um zu prüfen, ob mit nur den drei bzw. zwei Isotopenverhältnisvariablen der reinen, gemahlenen Pistazien die gleiche Modellgüte erreicht werden kann wie mit der optimalen Lösung aus Kapitel 6.3.2.

Durchführung:

Die Erstellung des Diskriminanzmodells, die Prüfung des Klassifizierungsmodells mit der R-, L- und H-Methode und die Berechnung der Funktionswerte zur grafischen Darstellung werden analog zu den Kapiteln 6.3.2 bis 6.3.5 durchgeführt.

Ergebnis:

Diskriminanzfunktionen der 3-Pistazienvariablenkombination:

d_1 = 0,900 × „δ^{18}O Pistazie“ + 0,421 × „δ^{13}C Pistazie“ + 0,148 × „δ^{15}N Pistazie“ - 17,492

d_2 = 0,088 × „δ^{18}O Pistazie“ + 1,882 × „δ^{13}C Pistazie“ - 0,402 × „δ^{15}N Pistazie“ + 49,372

Diskriminanzfunktionen der 2-Pistazienvariablenkombination:

d_1 = 0,965 × „δ^{18}O Pistazie“ + 0,426 × „δ^{13}C Pistazie“ - 19,020

d_2 = -0,216 × „δ^{18}O Pistazie“ + 2,423 × „δ^{13}C Pistazie“ + 72,601

Klassifizierungsergebnisse:

Tabelle 52: Klassifikationsmatrix aus der Diskriminanzanalyse der 3- und 2-Variablenkombination der Pistazien-Gesamtnuss mit den Ergebnissen nach der R-, L- und H-Methode

		Vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit				
Prüfmethode	**Gruppe**	**Iran**	**USA**	**Türkei**	**Gesamt**	**Fälle**
R-Methode	**Iran**	**100 %**	0 %	0 %	100 %	32
	USA	0 %	**100 %**	0 %	100 %	33
	Türkei	0 %	0 %	**100 %**	100 %	25
L-Methode	**Iran**	**100 %**	0 %	0 %	100 %	32
	USA	0 %	**100 %**	0 %	100 %	33
	Türkei	0 %	0 %	**100 %**	100 %	25
H-Methode*	**Iran**	**100 %**	0 %	0 %	100 %	12
	USA	0 %	**100 %**	0 %	100 %	13
	Türkei	0 %	0 %	**100 %**	100 %	9

* Für die Berechnung der H-Methode wurden die Gruppen per Zufallsgenerator in jeweils 70 % Lern- und 30 % Kontrollstichprobe unterteilt.

Grafische Darstellung der Funktionswerte:

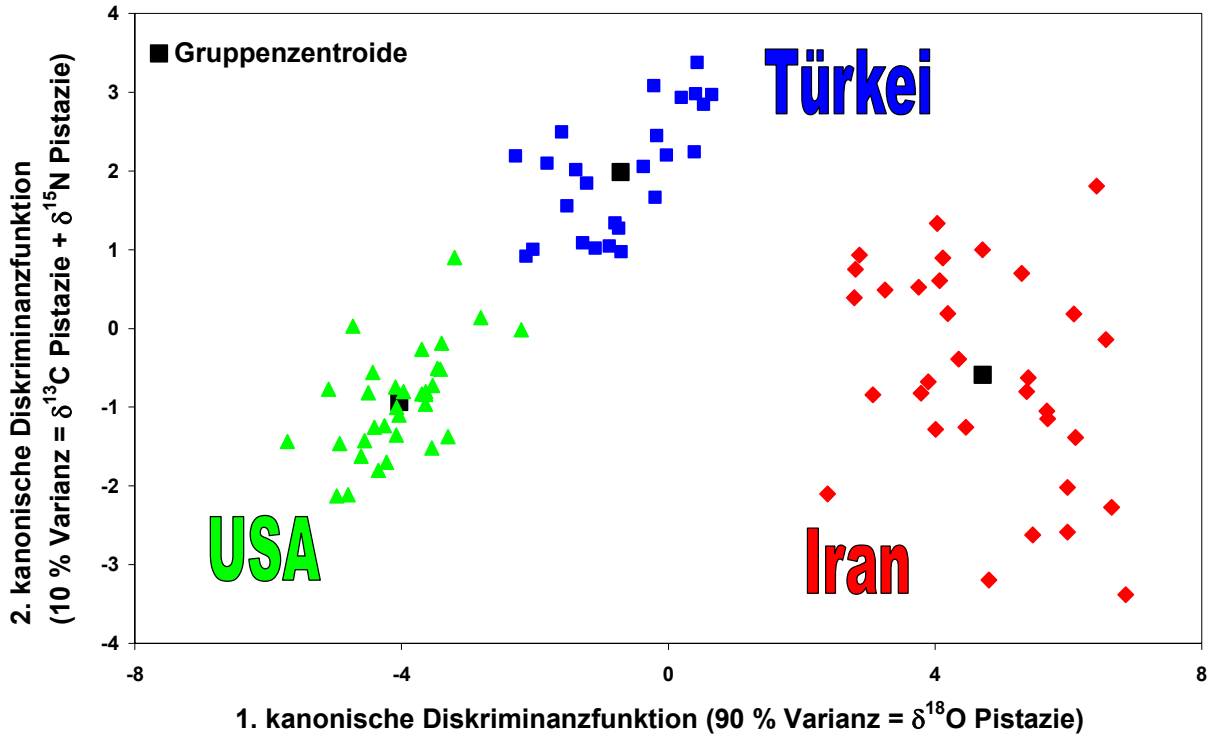


Abbildung 48: Grafische Darstellung der Funktionswerte aus der Diskriminanzanalyse mit den 3 Pistazien-Gesamtnussvariablen

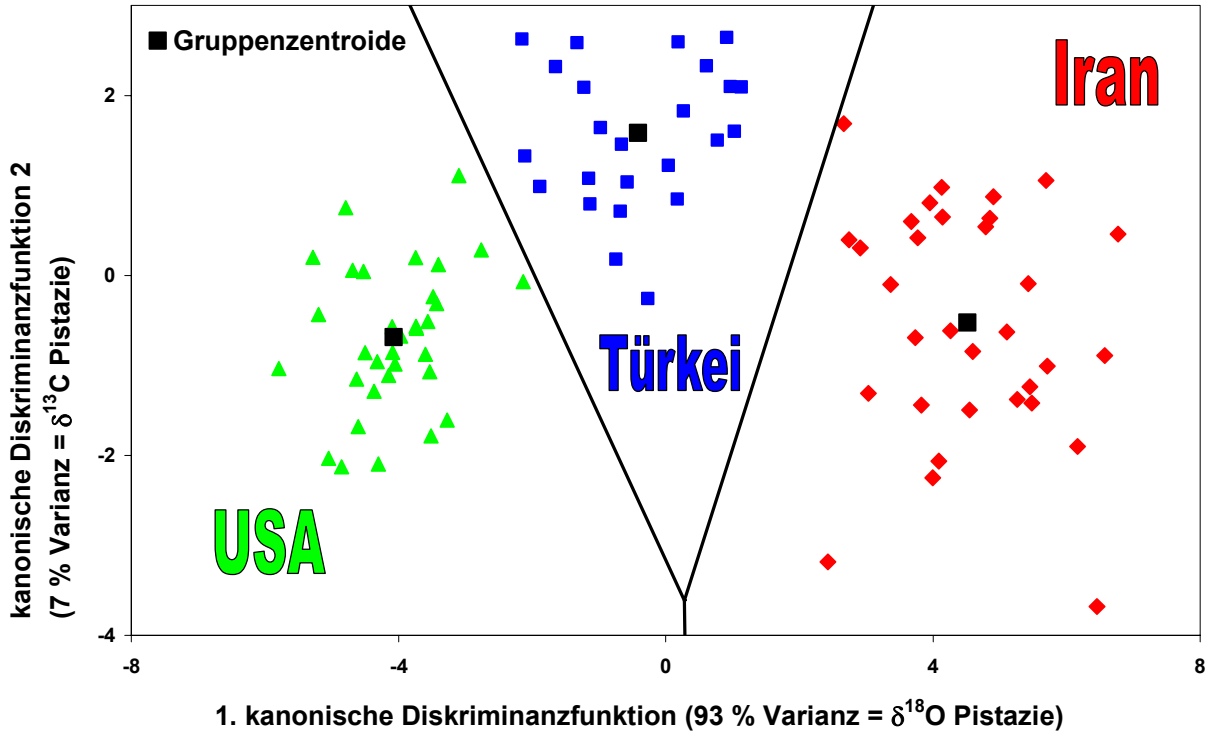


Abbildung 49: Grafische Darstellung der Funktionswerte und Trenngeraden aus der Diskriminanzanalyse mit den 2 Pistazien-Gesamtnussvariablen

Die Diskriminanzanalyse mit nur den Stabilisotopenverhältnisvariablen der Pistazien-Gesamtnuss ergibt ein gleich gutes Klassifizierungsergebnis für beide Variablenkombinationen wie das Diskriminanzmodell der „optimalen Lösung“ (s. Kapitel 6.3.3). Auch hier werden mit allen drei Klassifizierungsmethoden alle authentischen Proben richtig in ihre vorgegebenen Gruppen eingeordnet, d.h. relative Häufigkeiten von 100 % erreicht. Die Trennleistung der Pistazienvariablen reicht somit augenscheinlich schon aus, um ihre Herkunft zu bestimmen.
Bei der Betrachtung der grafischen Auftragung der Funktionswerte (s. Abbildungen 48 und 49) zeigt sich jedoch der große Unterschied gegenüber den Diskriminanzmodellen mit den Variablen der Pistazienfraktionen. Die Gruppen streuen wesentlich stärker und die Punktwolken sind daher größer. Dadurch liegen die Punktwolken der drei Länder viel dichter zusammen und die amerikanischen Pistazien sind von den türkischen nur knapp getrennt. Bei der 2-Variablenkombination (s. Abbildung 49) liegen einige Datenpunkte sogar fast auf den Trenngeraden. Dies wird durch die größere Streuung der δ-Messwerte der Pistazien-Gesamtnuss gegenüber der in den Fraktionen bedingt. Die beiden Diskriminanzmodelle, die nur aus den Variablen Pistazien-Gesamtnuss erstellt wurden, sind daher sehr bedingt zur Authentifizierung von unbekannten (Handels-) Proben geeignet. Die Wahrscheinlichkeit einer Fehleinordnung ist durch die schlechte Abgrenzung der Messwerte der türkischen Proben recht hoch. Eine Extraktion des Pistazienöls und Verwendung dieser Messdaten im Diskriminanzmodell ist daher anzuraten, auch wenn dies einen Zeit- und Kostenfaktor darstellt.

Es wurde auch die Trenngüte von Diskriminanzmodellen getestet, die nur aus den Variablen der Kohlenstoff- und Stickstoff-Isotopenverhältnisse bestanden, jedoch werden damit nur Klassifikationsraten unter 90 % erreicht. Die Vermessung des Sauerstoff-Isotopenverhältnisses zur Feststellung der Authentizität von Pistazien ist daher unerlässlich.

6.4 Anwendung der multivariaten Datenmodelle

Die multivariate Datenanalyse wurde bisher nur zur grundsätzlichen Eignungsprüfung der Stabilisotopenvariablen zum Herkunftsnachweis (Hauptkomponentenanalyse) und zur Erstellung eines Klassifizierungsmodells (Diskriminanzanalyse) eingesetzt. Dazu wurde ein Datensatz aus authentischen Proben, d.h. Proben mit bekannter Herkunft, benutzt.
Ziel dieser Arbeit ist es jedoch, der Lebensmittelüberwachung eine effiziente Methode zur Aufdeckung falsch deklarierter Handelspistazien oder zur Ermittlung der Herkunft unbekannter Proben zu liefern. Daher sollen der praktische Nutzen und die Grenzen der Diskriminanz- und Hauptkomponentenanalyse anhand einiger nachfolgender Beispielanwendungen aufgezeigt werden.

6.4.1 Klassifizierung von Handelsproben mit deklarierter Herkunft

Das Hauptanwendungsgebiet des in dieser Arbeit erstellten Diskriminanzmodells (s. Kapitel 6.3) soll die Überprüfung der Herkunftsdeklaration von Pistazien sein. Da amerikanische Pistazien auf dem Weltmarkt im Allgemeinen einen höheren Preis erzielen, besteht hier eine potenzielle Gefahr der Täuschung des Verbrauchers durch eine falsche Deklaration. Es werden daher iranisch und amerikanisch deklarierte Handelsproben in das im vorangegangenen Kapitel 6.3.2 erstellte 3-Variablen-Klassifikationsmodell eingesetzt, um die Richtigkeit ihrer Deklaration zu überprüfen.

Durchführung:
Amerikanische und iranische Handelsproben mit deklarierter Herkunft (s. Kapitel 9.1 und Anhang III) werden in das 3-Variablen-Diskriminanzmodell aus Kapitel 6.3.2 eingesetzt und klassifiziert. Die Ergebnisse der Klassifikation werden farblich abgesetzt in einem Streudiagramm visuell dargestellt und daher die Klassifikationsmatrix nicht mit aufgeführt. Die Probennummern in der Grafik stimmen mit denen im Kapitel 9.1 und im Anhang III überein.

Ergebnis:

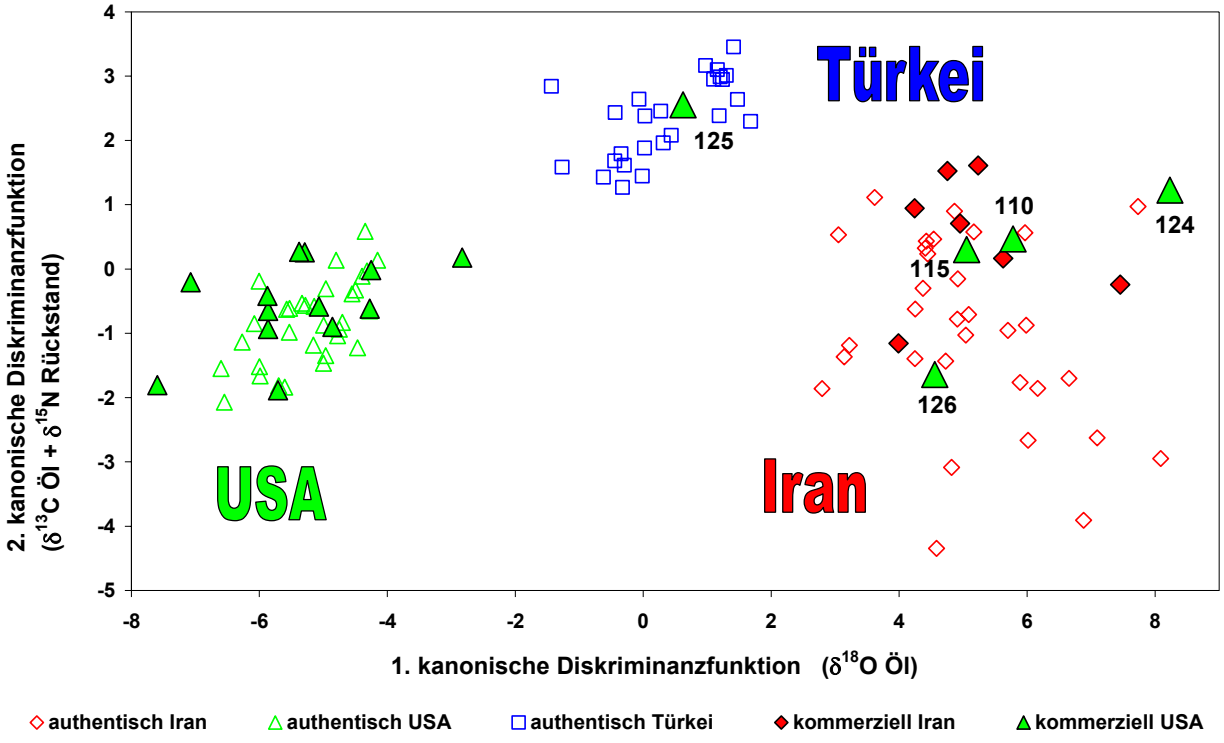


Abbildung 50: Grafische Darstellung der Klassifizierung von Handelsproben mit deklarierter Herkunft durch das 3-Variablen-Diskriminanzmodell aus Kapitel 6.3.2

Die grafische Darstellung des Klassifizierungsergebnisses (s. Abbildung 50) zeigt deutlich, dass alle Handelsproben (als Dreiecke in ihrer deklarierten Gruppenfarbe dargestellt) durch das Diskriminanzmodell eindeutig einem der drei Länder zugeordnet werden. Während alle getesteten iranischen Handelspistazien auch innerhalb der iranischen Punktwolke wieder zu finden sind, werden bei den amerikanischen nicht alle Handelsproben auch der USA-Gruppe zugeordnet. Vier der vermeintlich amerikanischen Proben sind hier deutlich der iranischen Punktwolke zugeordnet und eine liegt innerhalb der türkischen. Da diese fünf USA-deklarierten Proben so klar, d.h. inmitten der Punktwolke, die die Proben aus dem Iran bzw. der Türkei repräsentieren, eingeordnet werden, kann hier von einer Falschdeklaration ausgegangen werden.

Die Klassifizierungsfunktionen von Fisher (s. Kapitel 6.3.4) sowie auch das kanonische Diskriminanzmodell aus nur 2-Variablen liefern die gleichen Klassifizierungsergebnisse wie es in Abbildung 50 dargestellt ist, d.h. es werden die gleichen fünf amerikanisch-deklarierten Proben dem Iran bzw. eine davon der Türkei zugeordnet.

6.4.2 Klassifizierung von Handelsproben unbekannter Herkunft

Eine weitere praktische Anwendung des Diskriminanzmodells liegt in der Herkunftsbestimmung von unbekannten Pistazienproben. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass das hier aufgestellte Diskriminanzmodell nur zwischen den drei Ländern Iran, USA und Türkei unterscheiden kann, d.h. andere Anbauländer können nicht erkannt werden bzw. Proben anderer Anbauländer werden grundsätzlich einem der drei Hauptanbauländer zugeordnet.

Durchführung:

Handelsproben ohne jegliche Herkunftsangaben (s. Kapitel 9.1 und Anhang III) werden in das 3-Variablen-Diskriminanzmodell aus Kapitel 6.3.2 eingesetzt und klassifiziert. Die Ergebnisse der Klassifikation werden farblich abgesetzt in einem Streudiagramm visuell dargestellt und daher die Klassifikationsmatrix nicht mit aufgeführt.

Ergebnis:

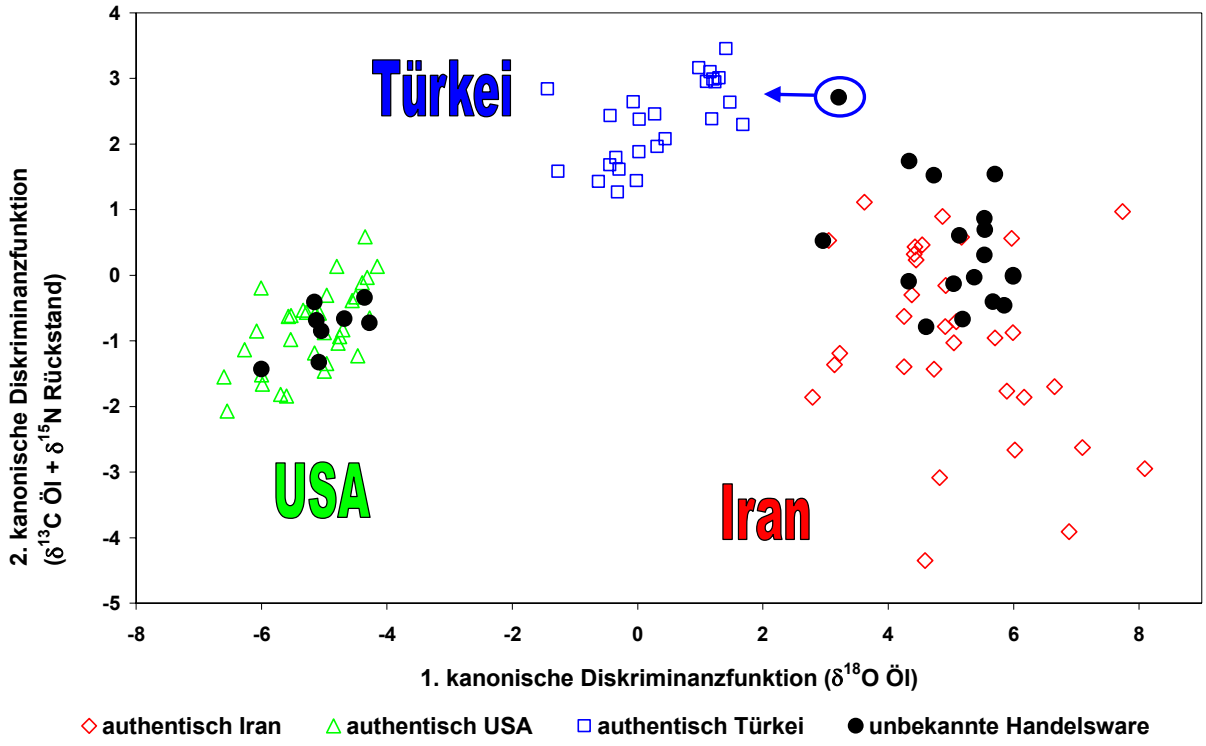


Abbildung 51: Grafische Darstellung der Klassifizierung von Handelsproben unbekannter Herkunft durch das 3-Variablen-Diskriminanzmodell aus Kapitel 6.3.2

Die Handelsproben unbekannter Herkunft werden vom Diskriminanzmodell fast überwiegend in die iranische Punktwolke eingeordnet (s. Abbildung 51). Die meisten Pistazien auf dem deutschen Markt stammen demnach aus dem Haupterzeugerland Iran, was den Importstatistiken zufolge (s. Kap. 3.1.3, Abb. 10)[90,261] auch die tatsächliche Marktsituation in Deutschland wider-

spiegelt. Der USA-Punktwolke werden 8 der 24 undeklarierten Proben zugeordnet. Eine weitere Probe befindet sich in der Grafik genau zwischen der türkischen und iranischen Punktwolke. Sie wird vom Klassifizierungsmodell statistisch der Türkei zugeordnet, jedoch könnte diese Probe auch aus einem anderen, vierten Land stammen oder eine Mischprobe sein.

Auch in diesem Versuch führt die Klassifikation mit den Fisher´schen Klassifizierungsfunktionen und der 2-Variablenkombination zu den gleichen Ergebnissen.

6.4.3 Klassifizierung von Mischproben USA ↔ Iran

Im vorherigen Kapitel 6.4.2 wurden die Grenzen des Diskriminanzmodells anhand der zwischen den Punktwolken liegenden Probe angesprochen: Die Diskriminanzanalyse kann weder andere Länder als die drei vorgegebenen (Iran, USA, Türkei) noch Mischungen erkennen, d.h. derartige Fälle werden zwangsweise in eine der vorgegebenen Gruppen eingeordnet. Um das Modell dahingehend zu testen, wurden Mischproben aus authentisch iranischen und authentisch amerikanischen Pistazien in verschiedenen Verhältnissen hergestellt, vermessen und in das Diskriminanzmodell eingeordnet.

Durchführung:
Es wurde die authentisch amerikanische Pistazienprobe Nr.36 mit der authentisch iranischen Probe Nr. 12 (s. Kap. 9.1 und Anhang III) für diesen Versuch ausgewählt und in folgenden Verhältnissen gemischt: 10:90, 30:70, 50:50, 70:30 und 90:10. Die Klassifikation dieser Mischungen wird auf Grundlage der 3-Variablen-Diskriminanzmodells aus Kapitel 6.3.2 durchgeführt.

Ergebnis 1:

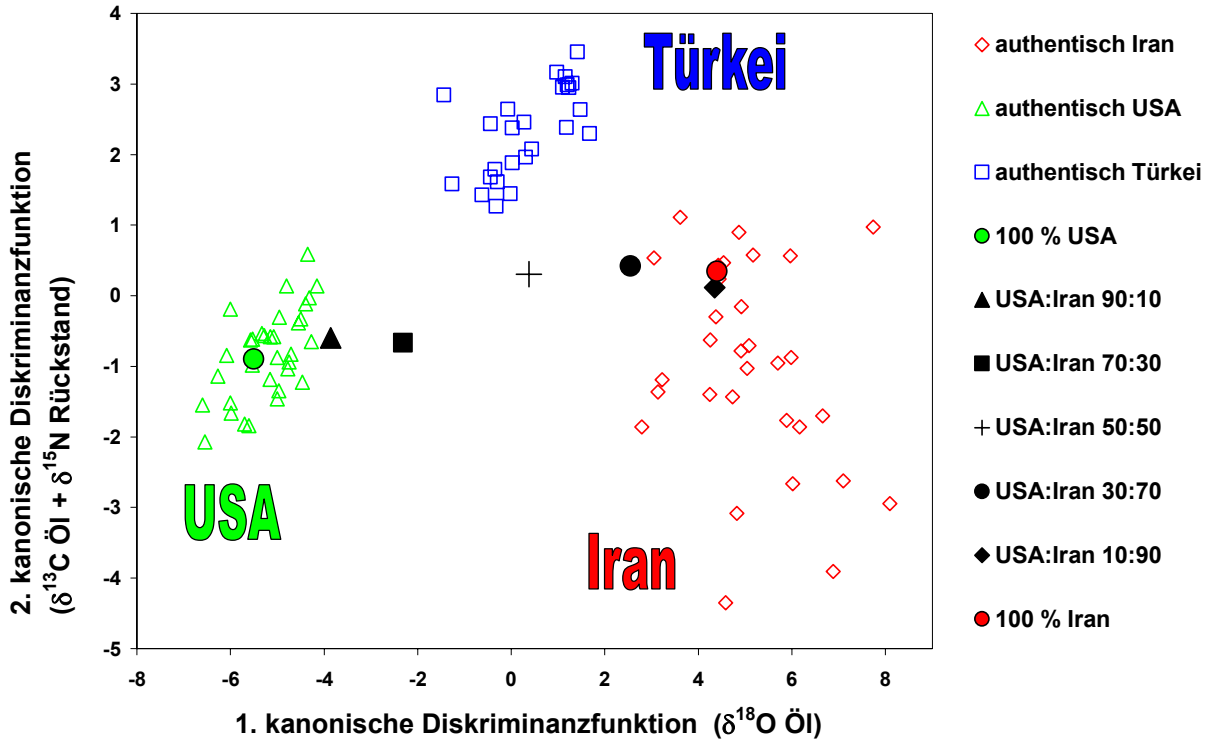


Abbildung 52: Grafische Darstellung der Klassifizierung von USA-Iran-Mischproben verschiedener Verhältnisse durch das 3-Variablen-Diskriminanzmodell aus Kapitel 6.3.2

Die Klassifizierung der USA-Iran-Pistazienmischproben in das 3-Länder-Diskriminanzmodell erweist sich wie vermutet als nicht sehr aussagekräftig. Von den fünf Mischungen sind grafisch nur zwei auffällig, weil sie abseits der Punktwolken liegen (Quadrat und Kreuz in Abbildung 52). Dabei wird die 50:50-Mischung rein statistisch vom Diskriminanzmodell sogar der türkischen Punktwolke zugeordnet. Die Mischung mit einem Anteil von 70 % USA-Pistazien (Quadrat) liegt auffällig neben der amerikanischen Punktwolke, während die Mischung mit einem Anteil von 70 % iranischen Pistazien (Punkt) sich zwar am Rand des iranischen Bereichs befindet, jedoch nicht auffällig außerhalb.

Es wird daher eine weitere Diskriminanzanalyse durchgeführt, und zwar diesmal nur mit dem authentischen Datensatz der USA und dem Iran, bei der nur diese beiden Länder als Gruppen vorgegeben werden. Bei zwei Gruppen wird nur noch eine Diskriminanzfunktion extrahiert und die grafische Darstellung ist daher eindimensional. Zum Vergleich ist die grafische Auftragung der $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Messwerte der Öle dem Ergebnis der Diskriminanzanalyse gegenübergestellt.

Ergebnis 2:

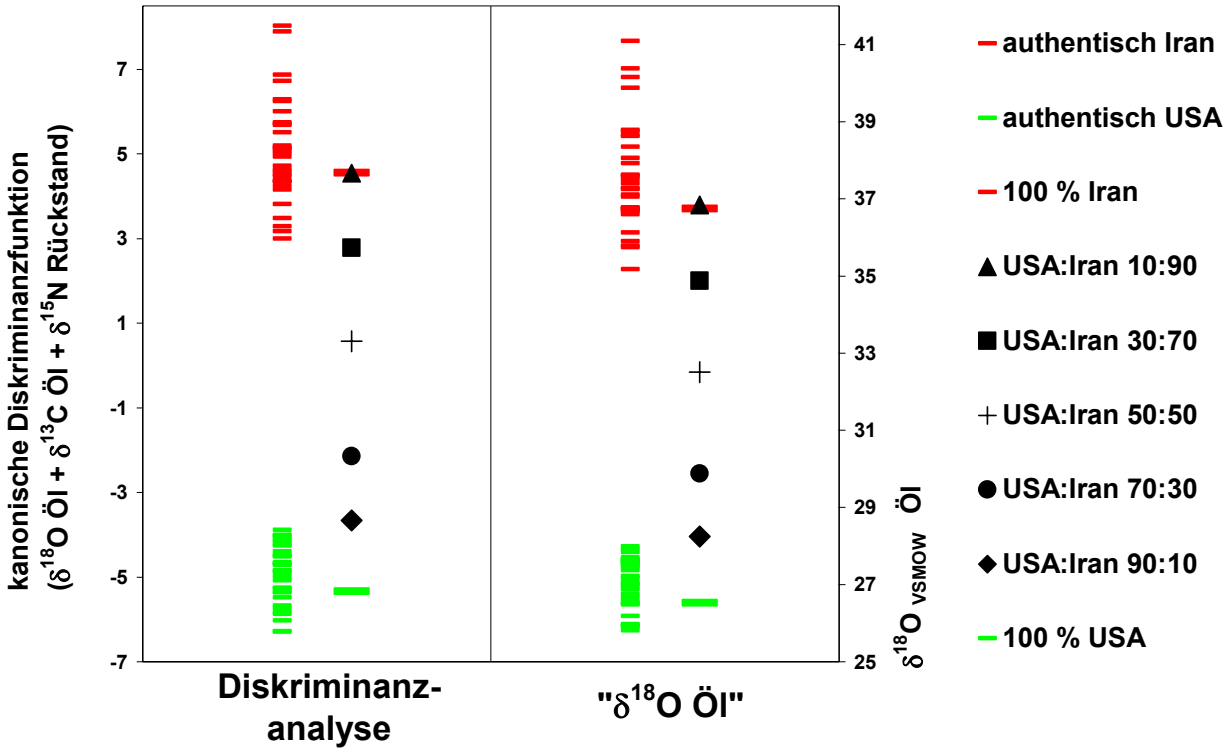


Abbildung 53: Grafische Darstellung der Klassifizierung von USA-Iran-Mischproben verschiedener Verhältnisse durch ein 2-Länder-Diskriminanzmodell im Vergleich mit der $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Messreihe des Öls

Die Klassifizierung der USA-Iran-Mischproben durch das 2-Länder-Diskriminanzmodell (s. Abbildung 53) ergibt keine deutlichere Abtrennung von den authentischen Reinproben als mit dem 3-Länder-Diskiminanzmodell (vgl. mit Abb. 52). Auch hier können nur die USA:Iran 50:50 und 70:30 Mischungen als visuell eindeutige „Ausreißer“ aus dem authentischen Datensatz erkannt werden. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass bestenfalls ab einer Zumischung von mehr als 10 % iranischen Pistazien zu amerikanischer Ware die Verfälschung erkannt werden kann. Durch die größere Streuung in den iranischen Daten und die dadurch größere Punktwolke ist eine Zumischung von über 70 % iranischen zu amerikanischen Pistazien nicht mehr auffällig.

6.4.4 Klassifizierung der Ausreißer aus Kapitel 5.3.1

Die Ausreißer-Betrachtung des authentischen Datenmaterials in Kapitel 5.3.1 erbrachte vor allem bei den amerikanischen Proben mehrere Ausreißer-Fälle, die zwar von allen Tests angezeigt wurden, aber deren Authentizität aufgrund des Direktbezugs aus den USA schwer anzuzweifeln ist. Es soll daher geprüft werden, wie sich die Ausreißer in der Diskriminanzanalyse verhalten, d.h. ob sie grafisch auffällig sind oder inmitten einer der drei Punktwolken eingeordnet werden. Da sie meistens aufgrund des Stickstoff-Isotopenverhältnises als Ausreißer erkannt wurden, sollen sie zusätzlich auch mit dem 2-Variablen-Diskriminanzmodell betrachtet werden, bei dem keine Stickstoffvariable eingeht. Hierdurch soll getestet werden, ob die Ausreißer immer noch grafisch auffällig oder in falsche Gruppen eingeordnet werden und ob das Stickstoff-Isotopenverhältnis überhaupt zur Herkunftsbestimmung von Pistazien geeignet ist oder zu Falsch-Klassifizierungen führt.

Durchführung:

Alle in Kapitel 5.3.1 erkannten Ausreißer werden mit dem 3- und 2-Variablen-Diskriminanzmodell klassifiziert und die Ergebnisse grafisch dargestellt (Ausreißer: gefüllte Symbole in jeweiligen Gruppefarbe). Die Probennummern in den Grafiken und im Text stimmen mit denen in Kapitel 9.1 und im Anhang III überein.

Ergebnis:

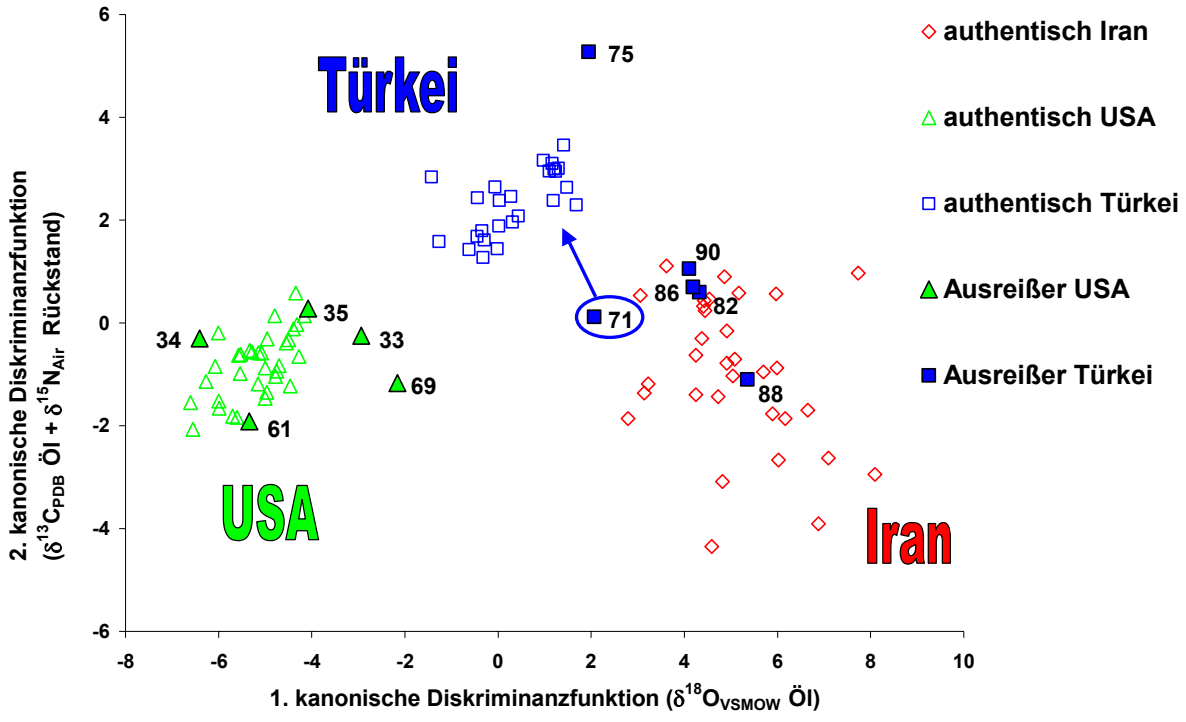


Abbildung 54: Klassifizierung der Ausreißer aus dem authentischen Pistaziendatensatz mit dem 3-Variablenmodell

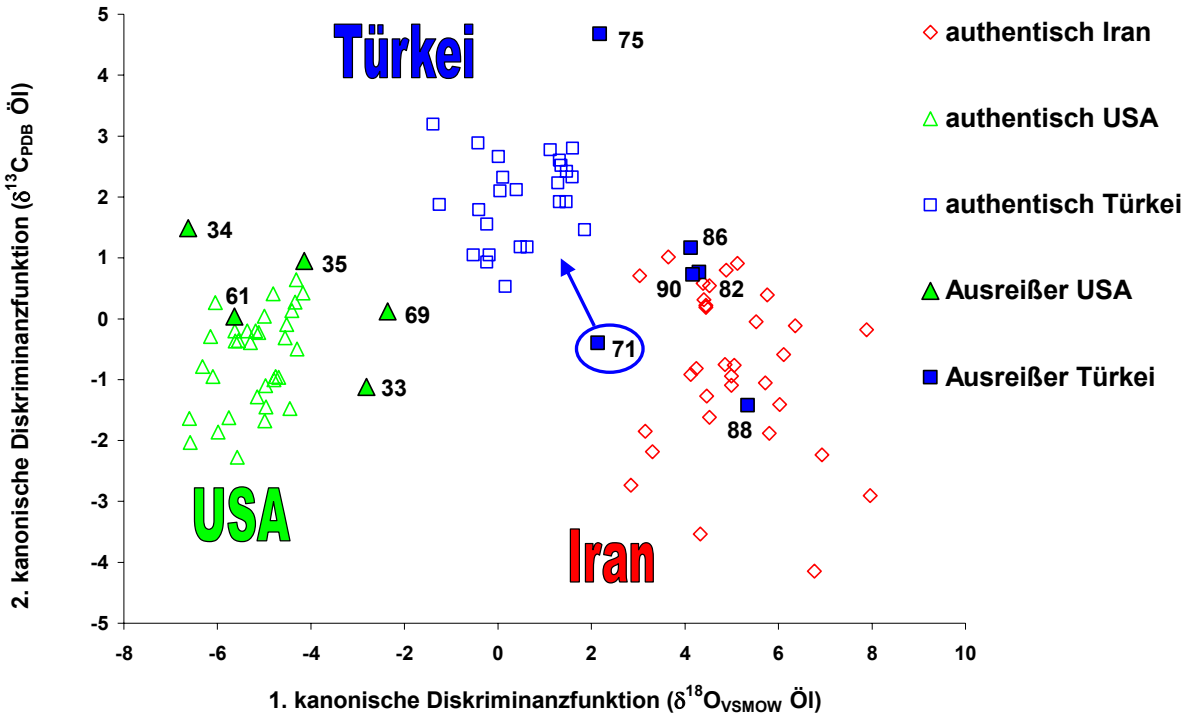


Abbildung 55: Klassifizierung der Ausreißer aus dem authentischen Pistaziendatensatz mit dem 2-Variablenmodell

Rein mathematisch werden alle fünf Ausreißer (Nr. 33, 34, 35, 61, 69) des authentisch-amerikanischen Datensatzes von beiden Diskriminanzmodellen (s. Abbildung 54 und 55) der amerikanischen Gruppe zugeordnet. Allen fünf Ausreißern des authentischen Pistaziendatensatzes der USA ist gemein, dass sie Ausreißer und Extremwerte im Stickstoff-Isotopenverhältnis zeigen und drei davon auch in den Sauerstoffvariablen. Ihre Lage in den grafischen Darstellungen der Diskriminanzfunktionen (s. Abbildung 54 und 55) lässt erkennen, dass sie in der 3-Variablenkombination näher an der amerikanischen Gruppe liegen als bei der Diskriminanzanalyse mit nur 2-Variablen, bei der die Stickstoffvariable nicht eingeht. Diese bessere Zuordnung der besagten Proben ist jedoch nur scheinbar, denn das Stickstoff- wie auch das Sauerstoff-Isotopenverhältnis leisten einen negativen Erklärungsbeitrag auf der 2. kanonischen Diskriminanzfunktion (s. Kapitel 6.3.2.3). Je höher also der $\delta^{15}N_{Air}$-Wert einer Probe ist desto mehr wird der Funktionswert auf der y-Achse nach unten gedrückt, nämlich auf das Niveau der iranischen Proben, deren $\delta^{15}N_{Air}$-Werte allgemein deutlich höher sind als die der amerikanischen und türkischen (s. Abbildung 39 in Kapitel 5.2). Daher liegen die amerikanischen Ausreißerproben mit ihren Extremwerten im Stickstoff-Isotopenverhältnis allgemein tiefer im 3- als im 2-Variablenmodell und damit näher/besser in der amerikanischen Punktwolke.

Optisch auffällig in Abbildung 54 und 55 sind bei den univariat erkannten Ausreißern des authentisch-amerikanischen Datensatzes eigentlich nur zwei von den fünf Proben. Nur die Proben mit den Nummern 33 und 69 liegen optisch auffällig rechts neben der amerikanischen Punktwolke. Sie sind wegen ihrer hohen $\delta^{15}N_{Air}$-Werte nicht nur nach unten, sondern aufgrund des zusätzlich erhöhten $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werts auch noch nach links in Richtung der iranischen Punktwolke verschoben. Probe Nr. 33 liegt in Abb. 54 allerdings höher als in Abb. 55, da ihr $\delta^{15}N_{Air}$-Wert niedriger als der amerikanische Durchschnitt ist.
Die Proben mit den Nummern 35 und 61 sind optisch keine auffälligen Ausreißer, denn sie liegen noch am Rand der USA-Punktwolke. Desgleichen Probe Nr. 34, die nur im 2-Variablenmodell auffällig abgesetzt am linken Rand der Gruppe liegt, jedoch klar als amerikanische Probe klassifiziert werden muss, da es an dieser Stelle keine Schnittmenge mit anderen Gruppen gibt.

Es ist somit zusammenfassend festzustellen, dass nur USA-Proben mit erhöhten (für iranische Pistazien typischen bzw. ähnlichen) Sauerstoff-Isotopenverhältnissen im Streudiagramm visuell auffällig rechts neben ihrer Punktwolke liegen. Da aber der Abstand zur iranischen Punktwolke sehr groß ist, kommt es nicht zu einer Fehlklassifizierung.
Fehlklassifizierungen von amerikanischen Pistazien mit türkischen können ebenfalls nicht vorkommen, da die türkische Punktwolke oberhalb und nach rechts verschoben von der amerikanischen liegt. Nähere Erläuterungen zu den möglichen Gründen der erhöhten $\delta^{15}N_{Air}$- und $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte in den USA-Ausreißerproben sind im nachfolgenden Kapitel 7 (Ergebnisdiskussion) gegeben.

Im authentisch-türkischen Datensatz waren nach der univariaten Ausreißerbetrachtung sechs Proben auffällig (s. Kapitel 5.3.1) und wurden aus dem Datensatz entfernt. Beide Diskriminanzmodelle (s. Abbildung 54 und 55) ordnen die Proben mit den Nummern 71 und 75 mathematisch der türkischen Gruppe zu, während die übrigen vier (Proben Nr. 82, 86, 88 und 90) der iranischen Punktwolke zugehörig sind.
Ausreißerprobe Nr. 71 wird vom Klassifizierungsmodell zwar als türkische Probe erkannt, jedoch liegt sie optisch bei der iranischen Punktwolke (s. Abbildung 54 und 55)und scheint daher ein echter Ausreißer zu sein. Probe Nr. 75 liegt in beiden Grafiken (s. Abbildung 54 und 55) auffällig oberhalb der türkischen Punktwolke, da ihr $\delta^{13}C_{PDB}$-Wert überdurchschnittlich hoch ist. An dieser Stelle gibt es jedoch keinerlei Überschneidungen mit den beiden anderen Ländern, daher ist die türkische Authentizität dieser Probe schwer anzuzweifeln.
Der optisch deutlichste Ausreißer im authentisch-türkischen Datensatz ist Probe Nr. 88, denn sie liegt inmitten der iranischen Punktwolke. Ihre $\delta^{15}N_{Air}$- und $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte sind in allen Frak-

tionen extrem hoch und liegen in der Spannweite des Irans. Es handelt sich hierbei um eine 5 Jahre alte, als türkisch deklarierte Handelsware, die entweder tatsächlich falsch deklariert ist oder deren Stabilisotopenverhältnisse über die Jahre sehr stark fraktioniert sind. Letztere Möglichkeit ist durch die Alterungsstudie in Kapitel 4.5.4 eher anzuzweifeln, da eine Fraktionierung bzw. ein Austausch der Stabilisotopen mit der Umwelt zumindest über einen Zeitraum von einem Jahr nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Proben mit den Nummern 82 und 86 haben ebenfalls überdurchschnittlich hohe $\delta^{15}N_{Air}$- und $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte und sind deshalb als Ausreißer markiert worden. Sie liegen beide im oberen Teil der iranischen Punktwolke, da sie aufgrund ihres erhöhten Sauerstoff-Isotopenverhältnisses vom Diskriminanzmodell dorthin (nach rechts, weg von der türkischen Punktwolke) verschoben wurden. Im 2-Variablenmodell (s. Abbildung 55) liegen die beiden Proben immer noch auf der Höhe der türkischen Werte während sie wegen ihres iranähnlichen Stickstoff-Isotopenverhältnisses im 3-Variablenmodell (s. Abbildung 54) dagegen zusätzlich noch nach unten gedrückt worden sind. Daher liegen Probe Nr. 82 und 86 im 3-Variablenmodell optisch weiter von der türkischen Gruppe entfernt.
Ausreißerprobe Nr. 90 liegt in beiden Grafiken (s. Abbildung 54 und 55) am oberen Rand der iranischen Punktwolke und würde im unteren Bereich der türkischen Punktwolke liegen, wenn sie aufgrund ihres hohen $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werts vom Klassifizierungsmodell nicht nach rechts verschoben worden wäre. Ihre türkische Authentizität ist jedoch anzuzweifeln, da sie als lose Ware auf einem Berliner Markt gekauft wurde.

Die Trennung zwischen Pistazien aus dem Iran und der Türkei ist somit schwierig. Im Gegensatz zu den Ausreißern im authentisch amerikanischen Datensatz ist die Authentizität der univariat erkannten türkischen Ausreißerproben tatsächlich anzuzweifeln, da die meisten Proben aufgrund fehlender Direktkontakte in die Türkei auf dem deutschen Markt gekauft wurden. Türkische Proben mit erhöhten $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werten (und $\delta^{15}N_{Air}$-Werten) werden wie die amerikanischen Proben in der grafischen Darstellung nach rechts (und nach unten) verschoben, jedoch liegen sie damit zwangsläufig in der iranischen Punktwolke bzw. werden auch als solche klassifiziert. Zwischen der Türkei und dem Iran kann es daher sehr leicht zu Fehlklassifizierungen bei der Diskriminanzanalyse kommen (s. dazu auch Kapitel 7: Ergebnisdiskussion).

6.4.5 Multivariate Betrachtung anderer Länder

Neben den Pistazien aus den drei Hauptanbauländern Iran, USA und Türkei, konnten auch einige Proben aus anderen Ländern gesammelt werden (1×Italien/Sizilien, 1×Marokko, 1×Usbekistan, 3×Syrien, 6×Griechenland). Da von der Diskriminanzanalyse fremde Gruppen nicht erkannt werden können, sondern jede Probe in eins der vorgegebenen Länder eingeordnet wird, wurde die Hauptkomponentenanalyse mit Varimax-Rotation nochmals angewendet. Sie ist im Gegensatz zur Diskriminanzanalyse eine strukturen-entdeckende Methode (s. Kapitel 3.4.1) und daher geeignet, vorhandene Unterschiede in Messdaten aufzudecken und nachzuprüfen, ob sich andere Länder von den drei Hauptanbaugebieten unterscheiden lassen.

Das Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse mit den Daten des authentischen Pistaziendatensatzes und den Proben der fünf neuen Länder (Ergebnisgrafik nicht dargestellt) zeigt jedoch sehr deutlich, dass sich alle Proben dieser fünf Länder innerhalb oder nahebei der Punktwolken vom Iran, der USA und der Türkei einordnen. Die italienische (sizilianische) und marokkanische Probe sind z.B. in der iranischen Punktwolke angesiedelt, während die Probe aus Usbekistan sich im türkischen Bereich befindet. Die Proben aus Syrien sind sogar in zwei verschiedenen Punktwolken (Türkei und USA) wieder zu finden, ebenso die sechs aus Griechenland (Türkei und Iran).
Keines dieser Länder bildet somit eine eigene Gruppe, d.h. sie können nicht eindeutig von den drei Hauptanbaugebieten unterschieden werden. Dies bedeutet zum einen, dass die Fremdländer keine eigenen Gruppen bilden bzw. bei einer größeren Probenanzahl würden sich überschneidende Punktwolken ergeben, und zum anderen, dass sie nicht von den Hauptanbauländern unterschieden werden können.

7.

Ergebnisdiskussion

In dieser Arbeit wird mit Hilfe der Stabilisotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) der Elemente Sauerstoff, Kohlenstoff und Stickstoff in Kombination mit multivariater Statistik (Hauptkomponenten- und Diskriminanzanalyse) eine effiziente Methode zur Trennung von Pistazien nach ihren drei Haupterzeugerländern Iran, USA und Türkei vorgestellt. Eine derartige Methode fehlt zur Zeit in der Lebensmittelüberwachung, um die häufiger vorkommenden Verfälschungen von amerikanischen Handelspistazien durch Umetikettierung oder Untermischung iranischer Ware aufzudecken. Auch die EU wertet die Erstellung herkunftsnachweisender Methoden als sehr wichtig (inhaltlicher Bestandteil des 5. und 6. Rahmenprogramms, s. Kap. 1), um Verbraucher und Lebensmittel zu schützen.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden mit dem Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (IRMS) Messungen durchgeführt, die der Absicherung und Überprüfung der ^{13}C-, ^{15}N- und ^{18}O-Methode galten. Es sollte sichergestellt werden, dass die Messmethoden zuverlässig, alle verwendeten Materialien über den Messzeitraum von ca. einem Jahr stabil und die Auf- und Verarbeitungsschritte diskriminierungsfrei sind (s. Kapitel 4.1 und 4.2). Schwierigkeiten zeigten sich hier bei der TC/EA-Messung ($\delta^{18}O$-Bestimmung), da zum Zeitpunkt der praktischen Arbeiten zu dieser Dissertation noch kein zertifiziertes organisches Feststoff-Referenzmaterial zur Kalibrierung des Geräts oder eines Arbeitsstandards käuflich zu erwerben war. Daher musste gegen Wasserstandards kalibriert werden, die nicht den δ-Wertebereich des Arbeitsstandards und der Proben einschlossen. Durch das unterschiedliche Verhalten von Flüssigkeiten und Feststoffen bei der Verbrennung im TC/EA und die Extrapolation des δ-Werts wurde ein Fehler in die Kalibrierung eingetragen. Dies war jedoch die einzige Möglichkeit der Kalibrierung eines Standards und Messung des $\delta^{18}O$-Werts in Pistazien überhaupt.
Die Ergebnisse innerhalb dieser Arbeit bleiben dadurch aber trotzdem vergleichbar und anwendbar, da bei der IRMS nur Verhältnisse und keine Absolutwerte gemessen werden. Mit einem passenden Referenzmaterial (dies ist seit 2005 in Form von zwei Benzoesäuren bei der IAEA erhältlich) könnte der Arbeitsstand nachkalibriert werden und bei Bedarf alle Ergebnisse durch eine einfache Multiplikation mit einem Korrekturfaktor berichtigt werden.

Weitere Voraussetzungen, auf die bei der IRMS-Messung geachtet werden müssen um richtige Ergebnisse zu erzeugen, sind die vorherige Feststellung der Diskriminierungsfreiheit sowie Wiederholbarkeit der Aufarbeitung der Proben (s. Kap. 4.6: Prüfung der Öl-Extraktionsmethode) und die Überprüfung des linearen Arbeitsbereichs der Geräte (s. Kap. 4.3). Hier ergab sich eine Unstimmigkeit, weil die Signal-Messwert-Gerade entgegen der Herstellerdefinition um mehr als 0,06 ‰/V in dem Bereich von 2-7 Volt anstieg. Mit genauen Einwaagen und der Verwendung von Mikroliterspritzen statt der Mikrowaage beim Öl konnte die Messung im linearen Arbeitsbereich jedoch weitestgehend gewährleistet werden.

Außerdem hat sich gezeigt, dass eine Trocknung der Proben über Pentoxid für die $\delta^{18}O$-Bestimmung unbedingt erforderlich ist, um die Standardabweichung zu verringern.

Alle weiteren Voruntersuchungen der Methodik und Materialien (Kalibrierungen, Stabilität der Standards und Analyten) schlossen mit sehr zufrieden stellenden Ergebnissen ab, so dass die IRMS-Messmethoden In-House validiert werden konnten, um die Verwendbarkeit und Gültigkeit der Messergebnisse sicherzustellen (s. Kap. 4.5). Durch den Vergleich der erzielten Wiederhol- und Vergleichbarkeitsdaten (r, R) mit anderen, bereits validierten IRMS-Methoden in der Lebensmittelanalytik zeigte sich, dass mit der ^{13}C-, ^{15}N- und ^{18}O-Methode richtige, wiederholbare und vergleichbare Ergebnisse erzielt werden.
Die Validierung der drei Stabilisotopen-Methoden zur Vermessung von Pistazien ist sehr wichtig, da mit dieser Arbeit eine praktisch anwendbare Methodik erstellt werden sollte und sie erst nach der Ermittlung der wichtigen Kenndaten wie r und R auch in einem Handels- oder Überwachungslabor für z.B. Routineuntersuchungen etabliert werden kann.

Im Zuge der Validierung wurde eine weitere, wichtige Erkenntnis gewonnen, nämlich dass das Pistazienöl die beste Fraktion für die δ-Wertbestimmung ist, da die Flüssigkeit eine wesentlich homogenere Matrix darstellt. Gegenüber den Feststofffraktionen (Gesamtnuss, entfetteter Rückstand) konnte eine deutlich niedrigere Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung (s_r, s_R) festgestellt und auch später bei den Probenmessungen eine allgemein niedrigere Streubreite in den δ-Werten des Öls beobachtet werden. Diese Diskrepanz zwischen den Matrizes wird am deutlichsten beim Vergleich der $\delta^{13}C_{PDB}$-$\delta^{18}O_{VSMOW}$-Auftragung in einfachen x-y-Streudiagrammen: Mit den δ-Messwerten des Öls (s. Abb. 57 an späterer Stelle in diesem Kapitel) wird eine viel deutlichere Trennung der Länder erreicht als mit denen der Gesamtnuss (s. Abb. 43 in Kap. 6.1).
Entgegen Beschreibungen in der Literatur[216,228,293] kann jedoch keine Verschärfung der Messwertunterschiede in den hier untersuchten Pistazienfraktionen beobachtet werden. Durch den Sekundärstoffwechsel der Pflanzen kann derartiges hervorgerufen werden, jedoch ist dieses Phänomen eher in Produkten zu finden, die in der Stoffwechselkette weit ab von den Primärprodukten liegen oder zwischen Molekülen einer Stoffklasse, wie z.B. zwischen Fettsäuren.[302] In dieser Arbeit wurde nur eine grobe Fraktionierung der Pistazien in das Öl und den entfetteten Rückstand (Kohlenhydrate und Proteine) vorgenommen, welche nur die Primärverzweigungen der Biosynthese darstellen und daher auch untereinander hoch korrelieren. Es kann aber die in der Literatur[58,182,194] schon früh beschriebene Beobachtung bestätigt werden, dass der $\delta^{13}C$-Wert der Lipide um ca. 8 ‰ gegenüber den Primärprodukten der Photosynthese, den Kohlenhydraten, abgereichert ist. Die Kohlenhydrate befinden sich nach der Ölextraktion im entfetten Rückstand und machen dort inhaltlich den größten Anteil aus. Der in dieser Arbeit durchschnittlich gefun-

dene Unterschied zwischen dem Öl und dem entfetteten Rückstand beträgt ca. 6 ‰ (s. Kap. 5.2, Abb. 38). Er ist etwas niedriger, da im entfetten Rückstand auch noch die Proteine enthalten sind, die etwa 2-3 ‰ gegenüber den Kohlenhydraten abgereichert sind und dadurch den $\delta^{13}C$-Wertunterschied etwas erniedrigen.

Die sehr wichtige und unbedingt notwendige statistische Voruntersuchung des authentischen Pistaziendatensatzes zeigte, dass die Kriterien Normalverteilung, Varianzhomogenität, Gruppenunterschiede und Korrelation von diesem erfüllt werden und er daher bestens zur multivariaten Datenanalyse geeignet ist. Die Betrachtungen der δ-Werte in den Box-Plots und x-y-Streudiagrammen untermauert dies, da hier schon eine Anordnung der Werte nach Ländern zu erkennen ist (s. Abb. 38-40 in Kap. 5.2 und Abb. 41-43 in Kap. 6.1).

Der $\delta^{13}C_{PDB}$-Wert zeigt Trenneigenschaften hinsichtlich der geografischen Herkunft von Pistazien, jedoch schafft er es nicht, eines der drei betrachteten Länder vollständig von den anderen abzutrennen. Die am stärksten negativen Werte sind hier bei den Pistazienproben aus den USA zu finden. Eine Erklärung hierfür könnte zum einen der höhere Grad an industriellen Ansiedlungen und dem damit verbundenen vermehrten Ausstoß von Verbrennungsabgasen aus Kohle und Erdöl (stark negative δ-Werte) sein (s. Kap. 3.2.1). Zum anderen wurde in Kapitel 3.2.1 bereits erwähnt, dass vermehrter Regen das Absinken des $\delta^{13}C_{PDB}$-Werts bewirkt. Die modernen Pistazienfarmen in den USA werden bekanntermaßen ausnahmslos bewässert.
Verminderte Wasserverfügbarkeit führt im Gegenzug zu einer Erhöhung des $\delta^{13}C_{PDB}$-Werts (mehr positiv). Dies könnte in der Türkei und dem Iran der Fall sein, da hier teilweise noch traditionell bzw. mit weniger modernen Mitteln Pistazien angebaut werden. Die riesige Pistazienkultur im Iran ist u.a. auch aus Wasserknappheit in den fünfziger Jahren entstanden, weil andere Kulturpflanzen (z.B. Weizen, Baumwolle) in diesen Regionen nicht mehr angebaut werden konnten (s. Kap. 3.1.2).
Ein weiterer exogener Faktor, der sich auf das $^{13}C/^{12}C$-Verhältnis auswirkt, ist die Temperatur. Die Diskriminierungsrichtung wird zwar in der Literatur noch diskutiert, in neueren Artikeln beschreiben die Autoren[124,175] jedoch häufiger einen positiven Zusammenhang (s. Kap. 3.2.1). Laut den Klimatabellen der drei betrachteten Länder (s. Kap. 3.1.2, Abb. 3+4) sind die Jahresdurchschnittstemperaturen im Iran und in der Türkei höher als in den USA, d.h. auch hier stimmt die Theorie mit den in dieser Arbeit gefundenen $\delta^{13}C_{PDB}$-Ergebnissen überein. Überdies spiegelt sich auch der Höhenunterschied zwischen den Anbauflächen der beiden Pistazienhauptproduzenten Iran (>1000 m ü.d.M.) und USA (~100 m ü.d.M.) in den Messwerten wieder. Laut Literatur steigt mit zunehmender Höhe auch der $\delta^{13}C_{PDB}$-Wert (s. Kap. 3.2.1). Die Messwerte der Türkei folgen hier allerdings nicht der Theorie, da die $\delta^{13}C_{PDB}$-Werte dort am höchsten sind, das An-

baugebiet aber höhenmäßig zwischen dem Iran und den USA liegt. Dies ist jedoch nicht verwunderlich, denn der $\delta^{13}C_{PDB}$-Wert wird durch das Zusammenspiel aller umweltbedingten Faktoren bestimmt und kann daher niemals mit Sicherheit vorhergesagt werden. Vielleicht spielt bei den Werten der türkischen Pistazien noch die etwas nördlichere Lage eine Rolle, denn es wurde auch eine positive Abhängigkeit des $^{13}C/^{12}C$-Verhältnisses mit dem Breitengrad in der Literatur[158,175] beschrieben (s. Kap. 3.2.1).

Der $\delta^{14}N_{Air}$-Wert trennt dagegen sehr deutlich die Pistazienproben des Irans von denen der USA und Türkei ab (stärker positive δ-Werte). Für höhere Stabilisotopen-Messwerte können beim Element Stickstoff Faktoren wie verstärkter Einsatz von organischen Düngern, hohe Jahresdurchschnittstemperaturen oder landwirtschaftlich lange und intensiv genutzte Böden verantwortlich sein (s. Kap. 3.2.2). All diese Punkte könnten auf das $^{15}N/^{14}N$-Verhältnis der iranischen Pistazien Einfluss genommen haben. Die heutigen Anbauflächen des Irans werden z.B. schon seit den fünfziger Jahren intensiv landwirtschaftlich genutzt, während in den USA Pistazien erst seit den siebziger Jahren angebaut werden. Die Jahresdurchschnittstemperaturen liegen im Iran auch etwas höher als in den USA. Außerdem ist es in dem häufig noch traditionell bewirtschafteten Iran auch eher wahrscheinlich, dass mehr organische Dünger (Gülle, Stallmist) anstelle teurer Mineraldünger verwendet werden. Synthetische Dünger fördern das allmähliche Absinken des $\delta^{15}N_{Air}$-Werts im Pflanzenstickstoff und in den USA ist von einer derartigen Düngung auszugehen. Von der Türkei sind die Düngergewohnheiten für Pistazien leider nicht bekannt.
Ein weiterer, exogener Faktor, der die allgemein niedrigeren $\delta^{15}N_{Air}$-Werte in den amerikanischen und türkischen Pistazien bewirken könnte, ist die jahresdurchschnittliche Niederschlagsmenge. Zwar fällt im California Central Valley nicht unbedingt mehr Regen als im Iran, jedoch ist bekannt, dass die amerikanischen Pistazienfelder regelmäßig und ausreichend bewässert werden. In der Türkei fällt im Jahresdurchschnitt der meiste Regen, was die niedrigeren $\delta^{15}N_{Air}$-Werte gegenüber den iranischen Pistazien verursachen könnte (vgl. dazu die Klimadiagramme in Kap. 3.1.2, Abb. 3+4).
Eine Erklärung für die zudem beobachteten stark unterschiedlichen Streubreiten zwischen den $^{15}N/^{14}N$-Messwerten des Irans und der USA könnten Sortenunterschiede sein. In Kapitel 3.1 wurde bereits beschrieben, dass die Iraner eine breite Vielfalt von Pistaziensorten anbauen, während in den USA fast ausschließlich die Sorte *Kerman* kultiviert wird. Das Vorkommen signifikanter $\delta^{15}N_{Air}$-Variationen von bis zu 1,3 ‰ zwischen verschiedenen Genotypen wilder Gerste wurde in der Literatur[213] schon beschrieben.

Der $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Wert zeigt die größte Trennkraft hinsichtlich der geografischen Herkunft von Pistazien, was schon aus der Theorie zu erwarten gewesen ist (s. Kap. 3.2.3). Er trennt die beiden Hauptanbauländer Iran und USA vollständig und sehr deutlich voneinander (s. Kapitel 5.2), die

türkischen Proben liegen allerdings genau dazwischen und überschneiden sich mit den Proben der beiden anderen Ländern. Es lässt sich hier aber schon folgendes Ergebnis zur 100 %igen Unterscheidung von (ausschließlich) iranischen und amerikanischen Pistazien formulieren:

Werden bei einer Pistazienprobe $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte unterhalb von 30 ‰ gefunden, handelt es sich um eine amerikanische Pistazie; liegen die $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte dagegen oberhalb von 34 ‰, liegt eine iranische Ware vor. Beim Pistazienöl ist die Spannweite der $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte zwischen den beiden Ländern sogar noch etwas größer und bewegt sich zwischen 28 ‰ und 35 ‰.

Dies ist ein großartiger Erfolg und eines der Hauptziele, die in dieser Arbeit erreicht werden sollte. Durch die einfache Messung nur eines Isotopenverhältnisses können Pistazien aus dem Iran von denen der USA unterschieden werden und dadurch evtl. Umetikettierungen leicht und schnell erkannt werden. Dies ist auch eine erhebliche Verbesserung gegenüber der Methode von Anderson et al.[7] bei der zwei Parameter gemessen werden müssen ($\delta^{15}N$ und C/N-Verhältnis), um die beiden Haupterzeugerländer zu trennen. Außerdem ist die Herkunftsbestimmung von Pistazienproben mit dem Anderson-Modell nur optisch möglich, da keine statistische Abgrenzung der Punktwolken vorgenommen wurde. Es ist hier nicht klar, bei welchen Werten die Grenze zwischen den USA und dem Iran zu ziehen ist.

Weiterhin ist bei der Betrachtung der durchschnittlichen $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte der Pistazienproben der drei Länder zu erkennen, dass sie sich genau in der zu erwartenden Reihenfolge ihrer Niederschlagswerte (Iran → Türkei → USA) anordnen (s. Kap. 3.2.3, Tab. 5). In Kapitel 3.2.3 wurde bereits ausgeführt, dass das $^{18}O/^{16}O$-Verhältnis der Pflanzen mit dem des Wassers am Standort korreliert, welches als Boden- und Grundwasser das längerfristige Mittel der örtlichen Niederschläge widerspiegelt. Aus den Global Networt of Isotopes in Precipitation (GNIP)-Karten[142] Asiens und Nordamerikas (s. Kap. 3.2.3, Abb. 21+22) ist zu ersehen, dass von den drei Pistazienhauptproduzenten (Iran, USA, Türkei) im Iran der an ^{18}O angereicherteste Regen fällt. Es wurde dazu auch schon erklärt, dass dies von der etwas näheren Lage des Landes zum Äquator herrührt. Die Messergebnisse der iranischen Pistazien zeigen damit übereinstimmend auch die höchsten $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte von den drei betrachteten Ländern.
Weiterhin ist aus den GNIP-Karten abzulesen, dass die $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte der Türkei und Kaliforniens ähnlich sind. Auch dies war zu erwarten, da beide Gebiete fast auf dem gleichen Breitengrad liegen (s. Kap. 3.2.3, Tab. 6) und sich damit kein prinzipieller Unterschied in dem ^{18}O-Abreicherungsgrad der Wolken ergibt (der ^{18}O-Gehalt der Luftmassen nimmt vom Äquator zu den Polen hin ab). Es ist jedoch ein deutlicher Trend in den Messwerten der Pistazien zu erken-

nen: Die $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte der türkischen Pistazien sind höher als die amerikanischen und daher überlappen sich die Messwerte dieser beiden Länder nur und sind nicht homogen vermischt.
Die sog. „Höhen"- und „Kontinental"-Effekte (vgl. Kap. 3.2.3) können für die stärker positiven türkischen $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte nicht verantwortlich sein, denn hier besteht ein negativer Zusammenhang. Danach müsste das Verhältnis umgekehrt sein (türkische $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte niedriger als die amerikanischen), denn das Pistazienanbaugebiet der Türkei liegt höher über dem Meeresspiegel und mehr im Landesinneren als das California Central Valley in den USA. Es besteht aber ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen dem $^{18}O/^{16}O$-Verhältnis und der maximalen Temperatur und relativen Luftfeuchtigkeit an einem Ort (s. Kap. 3.2.3). Die Klimatabellen aus den Pistazienanbaugebieten dieser beiden Länder zeigen (s. Kap. 3.1.2, Abb. 4), dass die jahresdurchschnittliche Temperatur und Luftfeuchtigkeit tatsächlich in der Türkei höher ist als in dem Hauptanbaugebiet der USA (Kalifornien). Dies könnte die Erklärung für die gefundenen $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte in den Pistazien dieser beiden Herkunftsorte sein.

Weitergehend zur Arbeit von Anderson et al.[7] sollten auch die Pistazien aus der Türkei klar von den beiden anderen Ländern abgetrennt werden. Es besteht hier zwar keine Verfälschungsgefahr von amerikanischen mit türkischen Pistazien, aber türkische Pistazien können mit iranischen verwechselt bzw. bewusst vertauscht werden. Im Iran werden im Gegensatz zur USA (dort wird fast ausnahmslos nur die große, weitgespaltene Sorte *Kerman* kultiviert) sehr viele verschiedene Sorten angebaut und u.a. auch sehr kleine wie sie in der Türkei üblich sind. Aufgrund ihrer geschmacklichen Qualität und der Nachfrage vieler türkischer Konsumenten in Deutschland (in türkischen Supermärkten werden fast ausschließlich nur landeseigene Pistazien geführt) werden türkische Pistazien vermehrt importiert und auch sehr geschätzt. Sie sind sehr viel teurer als amerikanische oder iranische Pistazien (s. Kap. 3.1.4), da in der Türkei nur wenig produziert und noch weniger exportiert wird (~1 %, s. Kap. 3.1.3) und ihr Weltmarktanteil ist daher sehr gering. Die (Um-) Etikettierung (günstigerer) iranischer Pistazien als türkische ist somit wie bei den amerikanischen sehr lohnenswert und bei steigender Nachfrage nach türkischen Pistazien aber geringen oder gleich bleibenden Ernten ein potentiell wachsendes Problem.

Die Abtrennung der türkischen Pistazien von den iranischen ist jedoch nicht so einfach wie die der USA, da sich die beiden Länder in allen drei betrachteten Stabilisotopenverhältnissen überschneiden. Der $\delta^{18}O$-Wert ist auch hier wieder die stärkste Trennkomponente, jedoch erst im Zusammenspiel mit dem $\delta^{13}C$- oder $\delta^{15}N$-Wert kann eine deutliche Abtrennung der Punktwolke des Irans von der der Türkei in den x-y-Streudiagrammen erkannt werden (s. Kap. 6.1, Abb. 42+43). Aber wie bei der Darstellung von Anderson et al.[7] (hier wurde keine deutliche Trennung zwischen iranischen und türkischen Pistazien erreicht) ist es bei dieser einfachen, zweidi-

mensionalen Auftragung sehr schwer, die Herkunft einer unbekannten Probe zu bestimmen, vor allem wenn sie genau zwischen zwei Punktwolken liegt.

Dieses Problem und weitere Hauptziel dieser Arbeit wurde mit Hilfe der multivariaten Datenanalyse gelöst. Es konnte hier sowohl mit der Hauptkomponenten- als auch der Diskriminanzanalyse eine vollständige Trennung der drei Länder voneinander erreicht werden (s. Abb. 45 in Kap. 6.2.4 und Abb. 46+47 in Kap. 6.3.5).

Die Hauptkomponentenanalyse diente in diesem Fall nur zur Überprüfung der grundlegenden Fähigkeit der gemessenen Stabilisotopenvariablen nach Ländern zu trennen (s. Kap. 6.2). Bei der Betrachtung der Komponentenmatrizes (s. Tab. 42+43 in Kap. 6.2.3) stellte sich heraus, dass Komponente 1 die Variablen derjenigen beiden Bioelemente (O und N) vereinigt, die schon nach Pearson hoch miteinander korrelieren (s. Korrelationskoeffizienten-Tabelle 37 in Kap.5.3.5). Die Korrelation zwischen dem Stickstoff- und Sauerstoff-Isotopenverhältnis in den Pistazien könnte damit zusammenhängen, dass beide Elemente durch gleichartige exogene Faktoren beeinflusst werden. Hierfür würden nur zwei in Frage kommen: Niederschlag und Dünger (s. Kap. 3.2.2 und 3.2.3). Beide Faktoren können sowohl auf das $^{18}O/^{16}O$- als auch auf das $^{15}N/^{14}N$-Verhältnis diskriminierend einwirken. Außerdem ist beiden gemeinsam, dass sie fraktionierend auf das Isotopenverhältnis der Nährstoffe im Boden (z.B. Wasser, Nitrat) wirken bzw. dieses verändern bevor die Pflanze diese aufnimmt. Niederschlag und Dünger können standortspezifische Isotopenverhältnis-Unterschiede auf Pflanzen übertragen, die sich um mehrere ‰ unterscheiden.
Auf die Hauptkomponente 2 lädt dagegen dasjenige Bioelement hoch (C), welches die Pflanzen aus einem weitgehend homogenen Pool (Luft) aufnehmen. Das Isotopenverhältnis des Kohlenstoffs aus CO_2 wird vornehmlich nur durch den Primär- und Sekundärstoffwechsel der Pflanze selber beeinflusst und verändert. Pflanzeninterne Kohlenstoff-Diskriminierungen, die zu Standortunterschieden führen, können nur durch exogene Faktoren, die auf diese Pflanzenmetabolismen wirken (z.B. Klima, Höhe, Druck), hervorgerufen werden. Sie besitzen allerdings nur geringe Diskriminierungskräfte (2-3 ‰, s. Kap. 3.2.1).

Obwohl die Hauptkomponentenanalyse den authentischen Pistaziendatensatz vollständig nach Ländern zu trennen vermag, ist sie als strukturen-entdeckendes Verfahren nicht dazu geeignet, die Herkunft neuer, unbekannter Proben zu ermitteln. Dies liefert jedoch die Diskriminanzanalyse (s. Kap. 6.3), so dass auf die Erstellung des Diskriminanzmodells und die Auswahl der verwendeten Variablen die größte Sorgfalt gelegt und alle Prüfkriterien genaustes analysiert wurden. Die schrittweise Diskriminanzanalyse hat dabei eine nicht überraschende Elementauswahl der Variablen in der Reihenfolge Sauerstoff (Öl) → Kohlenstoff (Öl) → Stickstoff (entfetteter

Rückstand) getroffen (s. Kap. 6.3.1). Anders als bei der Hauptkomponentenanalyse lädt hier allerdings das Sauerstoffisotop alleinig auf der 1. kanonischen Diskriminanzfunktion und leistet den Hauptanteil zur Gruppentrennung. Die große Trennkraft des Sauerstoff-Isotopenverhältnisses hinsichtlich der Herkunft von Pistazien fiel bereits bei der Betrachtung der Box-Plots (s. Kap. 5.2) und der Darstellung der δ-Messwerte in einfachen x-y-Streudiagrammen (s. Kap. 6.1) auf.

Das Kohlenstoff-Isotopenverhältnis lädt auf der 2. kanonischen Diskriminanzfunktion. Es ist wie bei der Hauptkomponentenanalyse das zweitwichtigste Element für die Herkunftsbestimmung von Pistazien und ist für die Trennung zwischen den amerikanischen und türkischen Pistazien verantwortlich. Dies wurde auch bei den einfachen x-y-Streudiagrammen schon erkannt, denn das grafische Ergebnis der Auftragung des $\delta^{13}C_{PDB}$-Werts gegen das $^{18}O/^{16}O$-Verhältnis ist besser als das der $\delta^{15}N_{Air}$-$\delta^{18}O_{VSMOW}$-Auftragung (vgl. Abb. 43 mit Abb. 42 in Kap. 6.1).

Der $\delta^{15}N_{Air}$-Variable wurde von der schrittweisen Diskriminanzanalyse als letztes ausgewählt und lädt zusammen mit dem Kohlenstoffisotop auf der 2. Diskriminanzfunktion. Anders als bei der Hauptkomponentenanalyse, bei der das Stickstoffisotop aufgrund seiner Korrelation und dem Beitrag zur Abtrennung der iranischen Proben mit dem Sauerstoffisotop zu einer Komponente gebündelt wurde, hat die Diskriminanzanalyse das Stickstoffisotop hauptsächlich auf der gegensätzlichen Achse vom Sauerstoffisotop wirken lassen. Zusammen mit dem $\delta^{13}C$-Wert verschiebt das Stickstoff-Isotopenverhältnis die Punktwolke der Türkei in y-Richtung, also weiter weg von den iranischen Pistazien. Damit ist die Diskriminanzanalyse ihrem Grundprinzip gefolgt, nämlich die vorgegebenen Gruppen bestmöglich voneinander zu trennen. Im Gegensatz zur Diskriminanzanalyse kann die Hauptkomponentenanalyse dies nicht leisten, da sie ein *strukturenentdeckendes* Verfahren ist und keine Gruppen vorgegeben sind.

Um zu testen, ob die Stickstoffvariable wirklich einen relevanten Trennbeitrag leistet, wurden zwei Diskriminanzmodelle aufgestellt, einmal mit allen drei (den optimalen) Stabilisotopenvariablen und zum anderen nur mit der Sauerstoff- und Kohlenstoffvariable. Es stellte sich heraus, dass sowohl mit dem 3- als auch mit dem 2-Variablenmodell Klassifizierungsmodelle aufgestellt werden konnten (s. Kap. 6.3.2), welche in der Überprüfung der Sicherheit mit den drei einschlägigen Schätzverfahren (R-, L-, H-Methode) eine 100 %ig richtige Einordnung der Quasi-Proben erreichen (s. Kap. 6.3.3). Der Beitrag, den die Stickstoff-Isotopenverhältnisvariable „$\delta^{15}N$ Rückstand“ zur Trennung der drei Pistazienanbauländer leistet, ist daher nur sehr gering.

Der Vorteil der Diskriminanzanalyse gegenüber einer einfachen zweidimensionalen Auftragung der δ-Werte wird beim Vergleich mit einer $\delta^{13}C_{PDB}$-$\delta^{18}O_{VSMOW}$-Auftragung der Pistazienöldaten deutlich (vgl. nachfolgende Abb. 56+57).

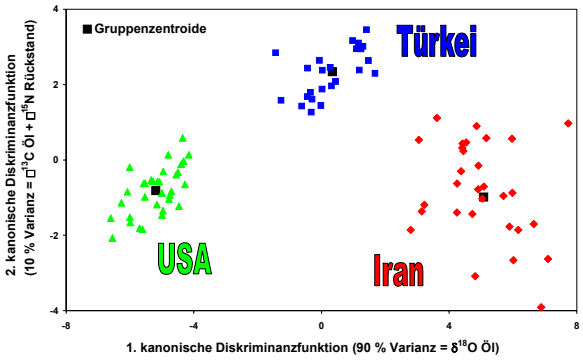


Abbildung 56:
Wiederholung der Abb. 46 aus Kap. 6.3.5 (Darstellung der Diskriminanzfunktionswerte)

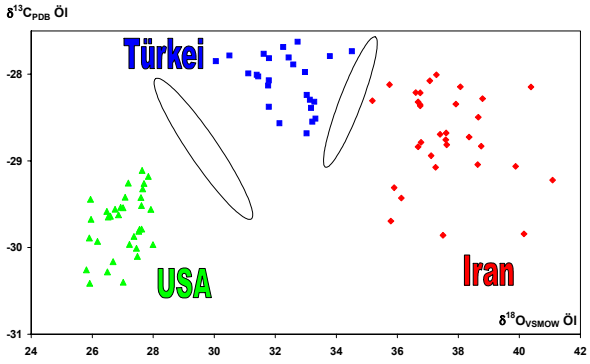


Abbildung 57:
Auftragung der $\delta^{13}C_{PDB}$- gegen die $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Messwerte der authentischen Pistazienöle

Die grundsätzlichen Strukturen des Datensatzes und dessen grafische Darstellung, d.h. die Lage und das Aussehen der Punktwolken, ähneln sich zwar sehr, aber bei genauerer Betrachtung der Abbildungen 56 sind doch kleine Unterschiede zu dem in Abbildung 57 gezeigten einfachen Vergleichsstreudiagramm festzustellen: Die Punktwolken der grafischen Darstellung der Diskriminanzfunktionswerte (s. auch Abb. 46+47 in Kap. 6.3.5) sind in sich dichter und dazwischen besser voneinander abgetrennt und vor allem die Punktwolke der türkischen Proben ist in y-Richtung etwas weiter nach oben verschoben. Durch die Anwendung der Diskriminanzanalyse auf das authentische Datenmaterial der Pistazien wurde das Ziel, eine 100 %ige Trennung der Pistazien nach ihren Herkunftsländern, erreicht und vor allem durch das Klassifizierungsmodell die Möglichkeit gegeben, unbekannte Proben statistisch abgesichert einem der drei Hauptanbauländer zuzuordnen. Dies ist mit einem einfachen x-y-Streudiagramm nicht möglich, denn wenn sich unbekannte Proben genau in dem Bereich zwischen zwei Punktwolken anordnen (gekennzeichnet durch Ellipsen in Abb. 57), kann nicht entschieden werden, zu welchem Land die Probe gehört.

Hiermit ist der Lebensmittelüberwachung erstmals eine leistungsfähige und bei gegebener Gerätevoraussetzung auch einfache und schnelle Methode an die Hand gegeben, die Herkunft von Pistazien nachzuweisen. Da sich außerdem gezeigt hat, dass auch die linearen Klassifizierungsfunktionen nach Fisher anwendbar sind (s. Kap. 6.3.4), ist dies wirklich eine praktikable Labormethode, mit der ganz ohne den authentischen Lerndatensatz und statistischer Computersoftware die Prüfung der Herkunft einer Pistazienprobe mit Hilfe des Taschenrechners erfolgen kann.

Dem Klassifizierungsmodell sind jedoch auch deutliche Grenzen gesetzt, die bei der Anwendung beachtet werden müssen. So können Pistazien anderer Länder generell mit der Diskriminanzanalyse nicht erkannt werden, da sie als strukturen-prüfendes Verfahren jede Probe in eine der vom Lerndatensatz vorgegebenen Gruppen einordnen muss. Eine Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Stabilisotopenvariablen mit einigen „exotischen" Pistazienproben aus kleineren Anbauländern durch eine erneute Hauptkomponentenanalyse hat gezeigt, dass diese anderen Länder keine separaten Gruppen bilden (s. Kap. 6.4.5). In der Praxis stellen Pistazien aus anderen Ländern als dem Iran, der USA und der Türkei auf dem deutschen und europäischen Markt kaum ein Problem dar, da nach den Importstatistiken der UN[261] zu über 95 % nur aus den drei Hauptanbauländern importiert wird.
Eine weitere Grenze des hier erstellen Diskriminanzmodells liegt in der Erkennung von Pistazienmischungen aus verschiedenen Ländern (s. Kap. 6.4.3). Auch hier ist die zwangsweise Einordnung von allen Proben in eine der drei Gruppen durch das Klassifizierungsmodell hinderlich. Im Versuch konnten Beimischungen von iranischen Pistazien zu amerikanischen ab ca. 30 % optisch im Streudiagramm erkannt werden, jedoch wurde die USA-Iran-Mischung im Verhältnis von 70:30 statistisch vom Modell noch zu den amerikanischen Proben geordnet und wäre damit nicht auffällig. Hilfestellung kann das System hier nur durch die Abfrage der Wahrscheinlichkeit der Gruppenzugehörigkeit geben, die in der Statistiksoftware SPSS 12.0 für jede Entscheidung/Probe abgerufen werden kann.

Eine weitere Schwierigkeit im Zusammenhang mit falschen Klassifizierungen wurde bei der Betrachtung der Ausreißer im authentischen Pistaziendatensatz aufgedeckt. Fünf amerikanische Proben sind wegen ihrer auffälligen $\delta^{15}N_{Air}$- und $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werte von drei verschiedenen Ausreißertests als solche identifiziert worden, obwohl ihre amerikanische Authentizität kaum anzuzweifeln ist. Auffällig war hier der Verpackungsvermerk „USDA organic" (= biologischer Anbau) bei den Proben Nr. 61 und 69. Durch diese besondere Produktion ist das Stickstoff- und Sauerstoff-Isotopenverhältnis dieser Proben ganz offensichtlich gegenüber herkömmlich produzierten Pistazien verändert worden, denn sieben weitere, in dieser Arbeit untersuchte Proben der gleichen Herstellerfirma ohne diesen Vermerk sind unauffällig (Nr. 58-60, 65-68, vgl. Probenliste in Kap. 9.1). Im biologischen Anbau dürfen nur organische Dünger anstelle von kommerziellen Mineraldüngern verwendet werden, was sich sicherlich auf den $\delta^{15}N_{Air}$-Wert der Proben Nr. 61 und 69 ausgewirkt bzw. diesen erhöht (s. Kap. 3.2.2) hat.
Der Einfluss von Dünger wäre auch eine denkbare Erklärung für die Erhöhung im Stickstoff-Isotopenverhältnis der beiden Ausreißerproben Nr. 34 und 35, bei denen es sich um Pistazien handelt, die direkt von einer kleineren Farm bezogen wurden. Eventuell kultiviert und verarbeitet

diese Farm ihre Pistazien nicht großtechnisch bzw. baut „biologisch“ an, da sie nur für ihren direkten Eigenverkauf produziert.
Der Einfluss von Dünger ist schon in mehreren Veröffentlichungen beschrieben worden[49,234,244,299], denn organische Dünger wie Stallmist oder Gülle haben wesentlich höhere $\delta^{15}N_{Air}$-Werte als synthetische Mineraldünger (häufiger verwendete Düngerart in der Landwirtschaft) und erhöhen bei Aufbringung den ^{15}N-Gehalt im Boden und somit auch in den Pflanzen. Zudem scheint organischer Dünger auch Einfluss auf das $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Verhältnis zu nehmen, was so noch nicht in der Literatur beschrieben wurde, jedoch an diesen Proben beobachtet werden konnte, da sie häufig gleichzeitig in diesem Element als Ausreißer gekennzeichnet werden. Über den $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Wert von organischen Düngern ist in der Literatur nur wenig zu finden, es wurde nur das Sauerstoff-Isotopenverhältnis von Gülle als wesentlich niedriger als das von synthetischen Mineraldüngern beschrieben (s. Abb. 25, Kap. 3.2.3).[4,269] Es gibt jedoch noch viele andere organische Dünger (die auch nach der VO (EWG) Nr. 2092/91 im ökologischen Landbau zugelassen sind),[270] denen zwar eine $\delta^{15}N_{Air}$-erhöhende Wirkung in Pflanzen nachgewiesen wurde,[15,244] aber das $^{18}O/^{16}O$-Verhältnis ist nicht bestimmt worden. Eventuell ist der prozentuale Stickstoffanteil in organischen Düngern geringer und der Sauerstoffanteil höher als bei Mineraldüngern und es wird dadurch insgesamt bei der Düngung mit z.B. Gülle mehr Sauerstoff auf die Felder aufgebracht. Somit könnte auch mehr Fremdsauerstoff in die Pflanzen gelangen und auf das Isotopenverhältnis in der Pflanze Einfluss nehmen.

Unter der hypothetischen Annahme, dass es organische Dünger mit hohen $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werten gibt, müsste sich der Sauerstoff des Düngers außerdem noch mit dem Bodenwasser equilibrieren oder darin lösen, denn das $^{18}O/^{16}O$-Verhältnis der Pflanzen ist streng mit dem lokalen Grundwasser und daher nicht mit den Düngemitteln korreliert. Einen Hinweis, dass sich der Sauerstoff von Düngemitteln tatsächlich mit dem Bodenwasser equilibriert, gibt die Korrelationsanalyse in Kap. 5.3.5. Hiermit wurde statistisch klar bewiesen, dass das $^{15}N/^{14}N$-Verhältnis der Pistazien immer hoch mit dem des Sauerstoffs korreliert, d.h. ungedüngte wie durch Dünger beeinflusste Pistazien korrelieren über das lokale Bodenwasser mit ihrer Sauerstoff- und Stickstoffquelle. Es ist außerdem anzunehmen, dass Pistazienplantagen generell mit irgendeiner Art von Dünger behandelt werden, d.h. alle untersuchten Pistazienproben sind gedüngt. Diese Vermutungen sind jedoch rein hypothetisch und da die genauen Umstände und Behandlungen der Pistazienpflanzen im biologischen Anbau der USA nicht genau bekannt sind, könnten auch andere, äußere Faktoren als die organische Düngung das $^{18}O/^{16}O$-Verhältnis beeinflusst haben.

Wiedererwartend hat sich das erhöhte Stickstoff-Isotopenverhältnis bei den amerikanischen Ausreißerproben bei der Diskriminanzanalyse nicht als problematisch herausgestellt, denn sie wer-

den trotzdem ihrer Gruppe richtig zugeordnet. Nur die Erhöhung des $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werts bewirkt eine optisch auffällige Lage solcher Proben rechts neben der amerikanischen Punktwolke.
Der Versuch mit USA-Iran Mischproben (s. Kap. 6.4.3) hat außerdem gezeigt, dass erst ab einem Mischungsverhältnis von 50 % amerikanischen und 50 % iranischen Pistazien die Probe in die iranische Gruppe klassifiziert wurde. Da das $^{18}O/^{16}O$-Verhältnis die ausschlaggebende Trennvariable im Pistazienklassifizierungsmodell ist, führen Erhöhungen in diesem Wert zu einer Verschiebung in Richtung der iranischen Punktwolke, denn iranische Pistazien haben die höchsten $\delta^{18}O$-Werte von allen drei untersuchten Ländern. Biologisch angebaute, amerikanische Pistazien werden somit zwar nicht vom System falsch klassifiziert, können grafisch aber wie Mischproben aussehen und daher im äußersten Fall zu einer falsch positiven Beanstandung führen.
Die Punktwolke der türkischen Proben hat in diesem Fall keine Probleme gemacht, da sie in der grafischen Darstellung des Diskriminanzmodells (s. Kap. 6.3.5, Abb. 46+47) oberhalb der amerikanischen und iranischen liegt, so dass keine Fehlklassifizierungen von amerikanischen Proben in diese Gruppe vorkommen können. Es ist damit festzustellen, dass es mit der Diskriminanzanalyse zu keiner Verwechslung von Proben der USA mit denen aus dem Iran (und umgekehrt) kommen kann. Diese beiden Gruppen sind aufgrund des Sauerstoff-Isotopenverhältnisses sehr weit voneinander getrennt.

Die fünfte amerikanische Ausreißerprobe (Nr. 33), die ebenfalls direkt von einer kalifornischen Farm bezogen wurde, hat dagegen ein erniedrigtes $^{15}N/^{14}N$-Verhälnis und das $^{18}O/^{16}O$-Verhältnis ist alleinig beim Öl erhöht. Von dieser speziellen Farm ist bekannt, dass sie anders als der Großteil der Pistazienbauern in Kalifornien nicht die übliche Pistaziensorte *Kerman* sondern *Arya* und *Kaleghuchi* anbaut. Vielleicht ist der Sortenunterschied eine Erklärung für das Ausreißen dieser Probe. Literaturstellen, die sich mit der Auswirkung der Sorte auf die Isotopenverhältnisse beschäftigen, konnten bisher nur für das $^{15}N/^{14}N$-Verhältnis gefunden werden[213] (s. Kap. 3.2.2).

Fast alle Ausreißer des authentisch-türkischen Datensatzes finden sich (wie bei den amerikanischen Ausreißerproben) nur bei den $\delta^{15}N_{Air}$- und $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werten, welche auch hier immer erhöht gegenüber den Durchschnittswerten sind. Hier könnte wie bei den organisch produzierten Proben im amerikanischen Datensatz ein Zusammenhang mit der landwirtschaftlichen Produktion bestehen.
Biologisch angebaute türkische Pistazien können jedoch nicht wie die amerikanischen von iranischen Pistazien unterschieden werden und Mischungen ebenfalls nicht. Eine Erhöhung des $\delta^{15}N_{Air}$- und/oder des $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Werts verschiebt die Proben zwangsläufig in die iranische Punktwolke und daher würden türkische „Bio-“ Pistazien immer zu falsch positiven Beanstandungen führen. Allerdings ist der ökologische Anbau etwas Besonderes und wird vom Konsumenten sogar mit höheren Preisen bezahlt, daher werden derartig angebaute Pistazien in der Pra-

xis sicherlich immer mit dieser Besonderheit beworben. So kann bei der Beurteilung einer türkisch etikettierten Probe, welche vom Klassifizierungsmodell als iranische erkannt wird, dieser Umstand in Betracht gezogen werden.

Die Messung des $^{15}N/^{14}N$-Verhältnisses zur Herkunftsbestimmung von Pistazien hat sich somit in dieser Arbeit als generell weniger wichtig erwiesen. Der $\delta^{15}N_{Air}$-Wert wurde von der schrittweisen Diskriminanzanalyse zwar als dritte und letzte Variable ins System mit aufgenommen, er leistet aber nur einen geringen Trennbeitrag und es konnte gezeigt werden, dass die Klassifikation genauso gut ohne die Einbeziehung der Stickstoffvariable funktioniert. Das Stickstoffisotop wird auch in der Literatur nicht häufig zur Herkunftsbestimmung herangezogen sondern eher zur Bestimmung der primären Stickstoffquelle genutzt. Da das Stickstoff-Isotopenverhältnis von Pflanzen direkt von dem des Bodens abhängt, schlagen sich exogene Einträge in den Boden wie Düngemittel auch sofort in den Pflanzen nieder. Das Stickstoff-Isotopenverhältnis kann in der Lebensmittelanalytik daher kaum lokale Gegebenheiten mit Sicherheit widerspiegeln und ist somit wenig aussagekräftig bzw. kann schlimmsten Falls zu Falschaussagen bei Authentizitätsprüfungen wie im Falle der Düngung führen.
Die Aussagekraft einfacherer Modelle zur Herkunftsbestimmung von Pistazien, wie die zweidimensionale Auftragung des $\delta^{15}N_{Air}$-Werts gegen das C/N-Verhältnis von Anderson et al.[7], sind durch die Anfälligkeit des Stickstoff-Isotopenverhältnisses gegenüber Fremdeinflüssen im Boden noch gefährdeter. Eine biologisch angebaute amerikanische Pistazienprobe würde z.B. im Anderson-Modell weit über der amerikanischen Punktwolke platziert werden, so dass sie zwar sehr auffällig, jedoch überhaupt nicht mehr interpretierbar ist. Evtl. würde sie aufgrund des C/N-Verhältnisses sogar zur iranischen Punktwolke hin verschoben und dann als „falsch deklariert“ beurteilt werden.

Die hier vorgestellte, validierte ^{13}C-, ^{15}N- und ^{18}O-Methode zur IRMS-Vermessung von Pistazien und das mit Hilfe der Diskriminanzanalyse aufgestellte Modell zu ihrer Klassifizierung ist trotz der zuvor diskutierten Limitierungen des Modells eine durchaus für die Praxis einsetzbare und geeignete Methode, um die Authentizität von etikettierten Pistazien zu überprüfen oder die geografische Herkunft von unbekannten Pistazienproben zu ermitteln. Die Wahl der IRMS als Messtechnik ist eine wesentliche Verbesserung der bisher in der Literatur[7,73,74,241] beschriebenen Versuche, die Herkunft von Pistazien nachzuweisen, da sie viel schneller, sicherer und einfacher zum Ergebnis führt. Durch den ausreichend groß gewählten authentischen Datensatz (>25 Proben pro Land) und die Überprüfung der Modellgüte mit der **R**esubstitutions-, **L**eaving-one-out- und **H**old-out-Methode, ist das erstellte Diskriminanzmodell auch so gut statistisch abgesi-

chert, dass dem Klassifizierungsergebnis vertraut und ein Lasso-Effekt ausgeschlossen werden kann.

Natürlich ist die Methode noch verbesserungsfähig, da z.B. andere Länder als die drei Hauptproduzenten nicht erkannt werden können. Zur Verbesserung müssten zum einen mehr authentische Proben von anderen Ländern gesammelt und zum anderen noch andere herkunftsspezifische Variablen gefunden werden. Erst dann könnte ein aussagekräftigeres Modell erstellt werden, denn die hier gemachten Vorversuche mit der Hauptkomponentenanalyse haben gezeigt, dass mit den drei Stabilisotopenvariablen allein keine neue Gruppe durch eines der „exotischen" Länder gebildet wird. Das D/H-, $^{34}S/^{32}S$-, oder $^{87}Sr/^{86}Sr$-Verhältnis, NMR- oder ICP-MS-Daten könnten hier z.B. hilfreiche Ergänzungen sein. Außerdem sollte auch der Jahrgangseinfluss untersucht werden, um die evtl. dadurch eingebrachte höhere Streuung in den Werten berücksichtigen und bewerten zu können.
Nähere Untersuchungen des Einflusses verschiedener organischer Dünger auf den $\delta^{15}N_{Air}$- und $\delta^{18}O_{VSMOW}$-Wert der Pflanzen im Labor- oder Feldversuch würden mehr Klarheit über die Richtung der Beeinflussung geben. Außerdem wäre es noch sehr interessant, das Pistazienöl mit einer GC-IRMS-Kombination zu vermessen, um den $\delta^{13}C_{PDB}$-, $\delta^{18}O_{VSMOW}$- und $\delta^{2}H_{VSMOW}$-Wert der einzelnen Fettsäuren zu ermitteln, da hier eine Verschärfung der Trennung zu erwarten ist und dadurch eine Erleichterung bei der Erweiterung des Klassifizierungsmodells auf mehr als die drei Hauptanbauländer erreicht werden könnte.

8.

Zusammenfassung

Im weltweiten Pistazienhandel kommt es immer wieder zu Verfälschungen, weil iranische Pistazien umetikettiert und als teurere, amerikanische Ware verkauft oder amerikanischen Pistazien beigemischt werden. Dadurch wird der Verbraucher nicht nur gemäß §17 des LFGB's getäuscht, sondern evtl. sogar gesundheitlich gefährdet. Iranische und auch türkische Pistazien müssen per Gesetz vor dem Import in die EU auf ihre Aflatoxinbelastung hin untersucht werden, weil diese häufig zu hoch ist, während amerikanische Pistazien keiner Vorführpflicht unterliegen. Es steht der Lebensmittelüberwachung jedoch bisher noch keine Methode zur Verfügung, mit der die Herkunft von Pistazien eindeutig bestimmt und die Etikettierung überprüft werden kann.

In dieser Arbeit wird nun ein Diskriminanzmodell vorgestellt, welches mit Hilfe der IRMS-Messtechnik eine eindeutige Authentizitätsbestimmung von Pistazien aus den drei Hauptproduktionsländern Iran, USA und Türkei leistet.
Zur Erstellung dieser Methode wurde zuerst die Messmethodik sehr genau überprüft, um die Gültigkeit und Verwendbarkeit der Ergebnisse abzusichern. So sind Feststoffarbeitsstandards für alle gemessenen Isotope und die Referenzgase gegen zertifizierte Referenzmaterialien kalibriert und ihre Eignung und die Beherrschung der Messmethode durch den positiv ausgefallenen Vergleich mit den Herstellerangaben der Gerätepräzisionen überprüft worden.
Durch die Führung von Qualitätsregelkarten mit in jeder Sequenz vermessene Gerätekontrollproben konnte jederzeit kontrolliert werden, dass die Stabilität der Referenzgase und aller verwendeten Materialen und Chemikalien über den Messzeitraum hinweg (ca. ein Jahr) gegeben war. Durch eine Alterungsstudie konnte außerdem der Beweis erbracht werden, dass sich auch die Stabilisotopenverhältnisse des Analyten selber, der Pistazienproben, nicht veränderten sondern stabil blieben. Da mit der ^{13}C-, ^{15}N- und ^{18}O-Methode richtige, wiederholbare und vergleichbare Ergebnisse produziert wurden, konnten sie im Zuge dieser Untersuchung auch validiert werden. Weitere Voruntersuchungen ergaben, dass eine Vermahlung von 20 g Pistazienkernen mit Haut pro Probe (Handelsverpackung) statistisch ausreichend ist und auch aus den kleinsten Handelspackungen (50 g) noch gewonnen werden kann. Die Verwendung der Pistazienschale als Probenmaterial entfiel aufgrund fehlenden Stickstoffvorkommens, ihrer extremen Härte und weil im Handel auch schalenlose Pistazien angeboten werden. Die biologische Streubreite einer Pistazienhandelsverpackung wurde zufrieden stellend zu <1 ‰ ermittelt.

Des Weiteren hat sich gezeigt, dass sowohl die Soxhlet-Extraktion als auch die ASE zur Gewinnung des Pistazienöls und des entfetteten Rückstands diskriminierungsfrei arbeiten und die Verwendung des Pistazienöls für die IRMS-Messung sehr vorteilhaft ist, da die Flüssigkeit eine wesentlich homogenere Matrix darstellt und dadurch kleinere Standardabweichungen resultieren. Auch für die Verarbeitungsschritte „Röstung" und „Salzung" kann Diskriminierungsfreiheit an-

genommen werden, da der Betrag der Diskriminierung, der durch die Röstung und/oder Salzung eingebracht wird, vernachlässigbar klein im Vergleich zur biologischen Streubreite ist.

Nach der Absicherung der Methodik wurden 101 authentischen Pistazienproben mit der IRMS vermessen. Es wurde jeweils das $^{13}C/^{12}C$-, $^{15}N/^{14}N$- und $^{18}O/^{16}O$-Verhältnis der vermahlenen Probe, des daraus gewonnenen Pistazienöls und des verbleibenden entfetteten Rückstands bestimmt und die δ-Wertergebnisse danach eingehend statistisch untersucht. Ihre Betrachtung in Box-Plot-Darstellungen und x-y-Streudiagrammen zeigte schon das sehr gute Potential der gewählten Stabilisotopenvariablen, den authentischen Pistaziendatensatz nach Ländern zu trennen. Mit Hilfe von drei verschiedenen Tests wurde dieser anschließend von Ausreißern bereinigt, sowie die Daten auf ihre Normalverteilung, Varianzhomogenität, Gruppenunterschiede und Korrelation hin analysiert. Erst nachdem all diese Punkte zur Zufriedenheit überprüft wurden, ist der authentische Datensatz zur multivariaten Datenanalyse zugelassen worden.

Zur multivariaten Untersuchung des authentischen Datensatzes wurde zuerst die Hauptkomponentenanalyse herangezogen, um dessen Struktur zu überprüfen. Mit ihr kann getestet und sichergestellt werden, dass die gemessenen Variablen ohne jegliche Vorgabe der Herkunft das Datenmaterial nach Ländern trennen und somit zur Herkunftsbestimmung geeignet sind. Das Ergebnis war eine vollständige Trennung der drei Länder voneinander, so dass der authentische Datensatz weiter mit einem strukturen-prüfenden Verfahren untersucht werden konnte. Aufgrund der Art der Daten kam als Klassifikationsmodell nur die Diskriminanzanalyse in Frage. Auch hier wurde eine vollständige Trennung der drei Länder erreicht und somit konnte ein Klassifizierungsmodell erstellt werden, mit dem die Herkunft neuer, zweifelhafter oder unbekannter Pistazienproben festgestellt werden kann. Das System hat die Variablen „$\delta^{18}O$ Öl“, „$\delta^{13}C$ Öl“ und „$\delta^{15}N$ Rückstand“ als aussagekräftigste Variablen zur Erstellung des Diskriminanzmodells ausgewählt, jedoch zeigte die Prüfung der Sicherheit des Modells mit den drei einschlägigen Schätzverfahren (R-, L- und H-Methode), dass die Stickstoffvariable nicht unbedingt mit einbezogen werden muss. Eine echte Laboranwendbarkeit ist außerdem gegeben, da die linearen Klassifikationsfunktionen nach Fisher anwendbar sind.

Mit 63 weiteren Proben wurden durch Anwendungsbeispiele die Stärken und Schwächen der Methode aufgezeigt.

9.

Material und Methoden

9.1 Probenliste

authentisch iranische Pistazienproben					
Proben-Nr.	**grün**	**geröstet**	**gesalzen**	**Erntejahr**	**Bereitgestellt von:**
1		✓		2001	Gastgeschenk einer iranischen Delegation
2		✓		2002	Ministry of Health & Medical Education Food & Drug Control Labs / Tehran
3		✓		2002	Ministry of Health & Medical Education Food & Drug Control Labs / Tehran
4		✓		2002	Ministry of Health & Medical Education Food & Drug Control Labs / Tehran
5		✓		2002	Ministry of Health & Medical Education Food & Drug Control Labs / Tehran
6		✓		2002	Ministry of Health & Medical Education Food & Drug Control Labs / Tehran
7		✓		2002	Ministry of Health & Medical Education Food & Drug Control Labs / Tehran
8		✓		2002	Ministry of Health & Medical Education Food & Drug Control Labs / Tehran
9		✓		2002	Ministry of Health & Medical Education Food & Drug Control Labs / Tehran
10		✓		2002	Ministry of Health & Medical Education Food & Drug Control Labs / Tehran
11		✓		2002	Ministry of Health & Medical Education Food & Drug Control Labs / Tehran
12		✓		2002	Wierts/Eggert/Jörissen GmbH Hamburg Handels- und Umweltschutzlaboratorium
13		✓		2002	Wierts/Eggert/Jörissen GmbH Hamburg Handels- und Umweltschutzlaboratorium
14	✓			2002	Wierts/Eggert/Jörissen GmbH Hamburg Handels- und Umweltschutzlaboratorium
15		✓		2002	Khatam Lab / Tehran
16		✓		2002	Khatam Lab / Tehran
17		✓		2002	Khatam Lab / Tehran
18		✓		2002	Khatam Lab / Tehran

authentisch iranische Pistazienproben (Forts.)					
Proben-Nr.	**grün**	**geröstet**	**gesalzen**	**Erntejahr**	**Bereitgestellt von:**
19		✓		2002	Khatam Lab / Tehran
20		✓		2002	Khatam Lab / Tehran
21		✓		2002	Khatam Lab / Tehran
22		✓		2002	Khatam Lab / Tehran
23		✓		2002	Khatam Lab / Tehran
24		✓		2002	Khatam Lab / Tehran
25		✓		2002	Khatam Lab / Tehran
26		✓		2002	Khatam Lab / Tehran
27		✓		2002	Khatam Lab / Tehran
28		✓		2002	Khatam Lab / Tehran
29		✓		2002	Khatam Lab / Tehran
30		✓	✓	2002	Orlux Import-Export GmbH / Frankfurt am Main
31	✓			2002	KaDeWe / Berlin
32		✓	✓	2002	KaDeWe / Berlin

authentisch US amerikanische Pistazienproben							
Proben-Nr.	**roh**	**geröstet**	**gesalzen**	**lose Ware**	**ohne Schale**	**Erntejahr**	**Bereitgestellt / Bezogen von:**
33		✓	✓			2002	Orandi Farms / Kalifornien
34		✓				2002	Van Mourik Farms / Kalifornien
35		✓	✓	✓		2002	Van Mourik Farms / Kalifornien
36		✓				2002	Wierts/Eggert/Jörissen GmbH
37		✓				2002	Wierts/Eggert/Jörissen GmbH
38		✓	✓			2002	California Pistachio Commission
39		✓	✓			2002	California Pistachio Commission
40		✓	✓			2002	California Pistachio Commission
41		✓	✓			2002	California Pistachio Commission
42		✓	✓			2002	California Pistachio Commission
43		✓	✓			2002	California Pistachio Commission
44		✓	✓			2002	California Pistachio Commission
45		✓	✓			2002	California Pistachio Commission
46		✓	✓			2002	California Pistachio Commission
47		✓	✓			2002	California Pistachio Commission
48	✓					2002	Supermarkt in San Diego / Kalifornien
49		✓				2002	Supermarkt in San Diego / Kalifornien
50		✓	✓	✓		2002	Supermarkt in San Diego / Kalifornien
51		✓	✓		✓	2002	Supermarkt in San Diego / Kalifornien

authentisch US amerikanische Pistazienproben (Forts.)							
Proben-Nr.	**roh**	**geröstet**	**gesalzen**	**lose Ware**	**ohne Schale**	**Erntejahr**	**Bereitgestellt / Bezogen von:**
52		✓	✓			2002	Supermarkt in San Diego / Kalifornien
53		✓	✓			2002	Supermarkt in San Diego / Kalifornien
54		✓				2002	Supermarkt in San Diego / Kalifornien
55		✓				2002	Supermarkt in San Diego / Kalifornien
56		✓	✓	✓		2002	Supermarkt in San Diego / Kalifornien
57		✓	✓	✓		2002	Supermarkt in San Diego / Kalifornien
58	✓					2002	Supermarkt in San Diego / Kalifornien
59		✓				2002	Supermarkt in San Diego / Kalifornien
60		✓	½			2002	Supermarkt in San Diego / Kalifornien
61		✓	✓			2002	Supermarkt in San Diego / Kalifornien → biologischer Anbau
62		✓	✓			2002	Supermarkt in Los Angeles / Kalifornien
63		✓	✓		✓	2002	Supermarkt in Los Angeles / Kalifornien
64	✓					2002	Supermarkt in Los Angeles / Kalifornien
65		✓				2002	Supermarkt in Los Angeles / Kalifornien
66		✓	½			2002	Supermarkt in Los Angeles / Kalifornien
67		✓	½			2002	Supermarkt in Los Angeles / Kalifornien
68		✓	✓			2002	Supermarkt in Los Angeles / Kalifornien
69		✓	✓			2002	Supermarkt in Los Angeles / Kalifornien → biologischer Anbau
70		✓				2002	Supermarkt in Los Angeles / Kalifornien

authentisch türkische Pistazienproben						
Proben-Nr.	**geröstet**	**gesalzen**	**lose Ware**	**ohne Schale**	**Erntejahr**	**Bereitgestellt / Bezogen von:**
71	✓	✓	✓		2001	Markt in der Türkei
72	✓	✓			2001	Naturkostladen, Berlin, biol. Anbau
73	✓	✓			2002	Türkischer Supermarkt, Berlin
74	✓	✓			2002	Türkischer Supermarkt, Berlin
75	✓	✓	✓		2002	Türkischer Supermarkt, Berlin
76	✓	✓			2002	Türkischer Supermarkt, Berlin
77	✓	✓			2002	Türkischer Supermarkt, Berlin
78	✓	✓	✓		2002	Großhandel
79	✓	✓	✓		2002	Großhandel
80	✓	✓			2002	Türkischer Supermarkt, Berlin
81	✓	✓			2002	Türkischer Supermarkt, Berlin
82	✓		✓	✓	2002	Türkischer Marktstand in Berlin
83	✓	✓	✓		2002	Türkischer Marktstand in Berlin
84	✓	✓			2002	Türkischer Supermarkt, Berlin
85	✓	✓			2002	Türkischer Supermarkt, Berlin
86	✓			✓	2002	Türkischer Supermarkt, Berlin
87	✓	✓			2002	Türkischer Supermarkt, Berlin
88	✓	✓			1998	Türkischer Supermarkt, Berlin
89	✓	✓			1998	Türkischer Supermarkt, Berlin

authentisch türkische Pistazienproben (Forts.)						
Proben-Nr.	**geröstet**	**gesalzen**	**lose Ware**	**ohne Schale**	**Erntejahr**	**Bereitgestellt / Bezogen von:**
90	✓	✓	✓		2002	Türkischer Supermarkt, Berlin
91	✓	✓			2002	Türkischer Supermarkt, Berlin
92	✓	✓			2003	Türkischer Supermarkt, Berlin
93	✓	✓			2003	Türkischer Supermarkt, Berlin
94	✓	✓			2002	Türkischer Supermarkt, Berlin
95	✓	✓	✓		2003	Türkischer Marktstand in Berlin
96	✓	✓			2002	Türkischer Supermarkt, Berlin
97	✓	✓			2002	Türkischer Supermarkt, Berlin
98	✓	✓			2003	Türkischer Supermarkt, Berlin
99	✓	✓	✓		2003	Türkischer Supermarkt, Berlin
100	✓	✓			2003	Türkischer Supermarkt, Berlin
101	✓	✓	✓		2003	Türkischer Supermarkt, Berlin

Handelsproben mit Herkunftsdeklaration								
Proben-Nr.	**grün**	**geröstet**	**gesalzen**	**lose Ware**	**ohne Schale**	**Erntejahr**	**Deklarierte Herkunft:**	**Bezogen aus / von:**
102		✓		✓		2001	Iran	Supermarkt, Berlin
103		✓	✓	✓		2001	Iran	Supermarkt, Wiesbaden
104	✓					2001	Iran	Supermarkt, Wiesbaden
105		✓		✓		2001	Iran	Privatperson
106		✓	✓			2002	Iran	Supermarkt, Berlin
107		✓	✓			2002	Iran	Supermarkt, Spanien
108		✓	✓			2001	Iran	Supermarkt, Berlin
109		✓	✓			1999	Kalifornien	Supermarkt, Berlin
110		✓	✓			2001	Kalifornien	Supermarkt, Berlin
111		✓	✓			2001	Kalifornien	Supermarkt, Berlin
112		✓	✓			2001	Kalifornien	Supermarkt, Berlin
113		✓	✓			2001	Kalifornien	Supermarkt, Berlin
114		✓	✓			2001	Kalifornien	Supermarkt, Berlin
115		✓	✓			2001	Kalifornien	Privatperson
116		✓	✓			2001	Kalifornien	Privatperson
117		✓	✓			2001	Kalifornien	Privatperson
118		✓	✓			2002	Kalifornien	Supermarkt, Berlin
119		✓	✓			1998	Kalifornien	Restbestand FB 222
120		✓	✓			2001	Kalifornien	Supermarkt, New York

Handelsproben mit Herkunftsdeklaration (Forts.)								
Proben-Nr.	**grün**	**geröstet**	**gesalzen**	**lose Ware**	**ohne Schale**	**Erntejahr**	**Deklarierte Herkunft:**	**Bezogen aus / von:**
121		✓	✓			2001	USA	Supermarkt, New York
122		✓	✓			2001	USA	Supermarkt, Berlin
123		✓	✓	✓		2002	USA	Supermarkt, Canada
124		✓	✓			2001	USA	Supermarkt, Berlin
125		✓	✓			2002	USA	Supermarkt, Berlin
126		✓	✓			2001	USA	Supermarkt, Berlin
127		✓	✓			2000	Griechenland	Supermarkt, Griechenland
128		✓	✓			2000	Griechenland	Supermarkt, Griechenland
129		✓	✓	✓		2001	Griechenland	Markt in Griechenland
130		✓	✓			2001	Griechenland	Supermarkt, Griechenland
131		✓	✓	✓		2001	Griechenland	Markt in Griechenland
132		✓	✓	✓		2001	Griechenland	Markt in Griechenland
133		✓	✓	✓		2001	Syrien	Markt in Syrien
134				✓		2002	Syrien	Grüne Woche, Berlin
135		✓	✓	✓		2002	Syrien	Grüne Woche, Berlin
136		✓	✓	✓		2002	Marokko	Grüne Woche, Berlin
137				✓		2002	Usbekistan	Grüne Woche, Berlin
138	✓					2002	Italien	Wierts/Eggert/Jörissen GmbH

Handelsproben ohne Herkunftsdeklaration							
Proben-Nr.	**grün**	**geröstet**	**gesalzen**	**lose Ware**	**ohne Schale**	**Erntejahr**	**Bezogen aus / von:**
139		✓	✓			2001	Privatperson
140		✓	✓			2002	Supermarkt, Berlin
141		✓	✓			1999	Supermarkt, Berlin
142	✓					2000	Supermarkt, Berlin
143		✓	✓			2001	Supermarkt, Berlin
144		✓	✓			2001	Supermarkt, Berlin (biologischer Anbau)
145		✓	✓			2001	Supermarkt, Berlin
146		✓	✓			2001	Supermarkt, Berlin
147		✓	✓			2001	Supermarkt, Berlin
148		✓	✓			2000	Supermarkt, Berlin
149		✓	✓		✓	2001	Supermarkt, Berlin
150		✓	✓			2000	Supermarkt, Berlin
151		✓	✓			2001	Supermarkt, Berlin
152		✓	✓		✓	2001	Supermarkt, Berlin
153		✓	✓			2001	Supermarkt, Berlin
154	✓					2001	Supermarkt, Berlin
155		✓	✓			2001	Supermarkt, Kaarst
156		✓	✓			2001	Supermarkt, Kaarst
157		✓	✓			2002	Supermarkt, Wiesbaden

Handelsproben ohne Herkunftsdeklaration (Forts.)							
Proben-Nr.	**grün**	**geröstet**	**gesalzen**	**lose Ware**	**ohne Schale**	**Erntejahr**	**Bezogen aus / von:**
158		✓	✓			2001	Supermarkt, Wiesbaden
159		✓	✓			2001	Supermarkt, Wiesbaden
160		✓	✓			2001	Supermarkt, Berlin
161		✓	✓			2002	Supermarkt, Berlin
162		✓	✓			2002	Supermarkt, Berlin
163		✓	✓			2002	Supermarkt, Spanien
164		✓	✓			1997	Supermarkt, Berlin (Restbestand FB222)

9.2 Standards und Referenzmaterialien

9.2.1 Referenzmaterialien der IAEA

Folgende Referenzmaterialien der IAEA mit feststehenden δ-Werten standen zur Kalibrierung der C-, N- und O-Messung während der Anfertigung dieser Arbeit im Labor zur Verfügung:

IAEA-Name	Material	Isotopenverhältnis	Bezugsstd.	δ-Wert
VSMOW	Wasser	$^{18}O/^{16}O$	VSMOW	0,0 ‰
GISP	Wasser	$^{18}O/^{16}O$	VSMOW	-24,8 ‰
PE-Folie	Polyethylenfolie	$^{13}C/^{12}C$	PDB	-31,8 ‰
NBS 22	Öl	$^{13}C/^{12}C$	PDB	-29,7 ‰
NO-3	Kaliumnitrat	$^{15}N/^{14}N$	Air	+4,7 ‰
N-1	Ammoniumsulfat	$^{15}N/^{14}N$	Air	+0,4 ‰

9.2.2 In-House kalibrierte Arbeitsstandards

Folgende Materialien wurden gegen die IAEA-Referenzmaterialien zum täglichen Gebrauch und zur Qualitätskontrolle der C-, N- und O-Messungen als Arbeitsstandards kalibriert:

Labor-Name	Material	Isotopenverhältnis	Bezugsstd.	δ-Wert
Std. 4	Wasser	$^{18}O/^{16}O$	VSMOW	+14,5 ‰
Std. 9	Cellulose	$^{18}O/^{16}O$	VSMOW	+31,3 ‰
Std. 11	Acetanilid	$^{13}C/^{12}C$	PDB	-25,0 ‰
Std. 11	Acetanilid	$^{15}N/^{14}N$	Air	-8,6 ‰

Folgende Gase, die als Referenzgase bei der IRMS-Messung dienen und vor und nach jeder Probe vermessen werden, wurden gegen die Arbeitsstandards zur Berechnung der Proben kalibriert:

Gas	Zeitspanne	Isotopenverhältnis	Bezugsstd.	δ-Wert
CO	Aug.-Okt. ´03	$^{18}O/^{16}O$	VSMOW	-2,6 ‰
CO	Apr.-Jun. ´04	$^{18}O/^{16}O$	VSMOW	-3,0 ‰
CO_2	Apr.-Jul. ´03	$^{13}C/^{12}C$	PDB	-28,3 ‰
CO_2	Okt. ´03	$^{13}C/^{12}C$	PDB	-28,5 ‰
CO_2	Feb.-Mrz. ´04	$^{13}C/^{12}C$	PDB	-33,0 ‰
N2	Apr.-Okt. ´03	$^{15}N/^{14}N$	Air	-5,7 ‰
N2	Feb.-Mrz. ´04	$^{15}N/^{14}N$	Air	-13,7 ‰

9.2.3 Gerätekontrollproben

Folgende Materialien wurden gegen die Arbeitsstandards kalibriert und zum täglichen Gebrauch als Qualitätskontrollproben bei den C-, N- und O-Messungen verwendet:

Labor-Name	Material	Isotopenverhältnis	Bezugsstd.	δ-Wert
GKP-H_2O	Wasser	$^{18}O/^{16}O$	VSMOW	-8,1 ‰
GKP 2	Fruktose	$^{13}C/^{12}C$	PDB	-24,5 ‰
GKP 3	Atropin	$^{13}C/^{12}C$	PDB	-29,1 ‰
GKP 3	Atropin	$^{15}N/^{14}N$	Air	-18,0 ‰
GKP 4	Benzoesäure	$^{18}O/^{16}O$	VSMOW	+24,9 ‰

9.3 Geräteeinstellungen und Probenvorbereitung

9.3.1 Isotopenmassenspektrometer

Hersteller:	ThermoQuest Finnigan
Gerätename:	Delta^{plus}
Softwarepaket:	ISODAT NT 1.5 mit ServicePack 1.6
Pumpen:	Pfeiffer Duo 005M Drehschiebervakuumpumpe
	Pfeiffer TMH 064 Turbomolekular-Drag-Pumpe
	Pfeiffer TMH 260-005 Turbomolekular-Drag-Pumpe
Kollektor:	3-fach Faraday Cups
Ziehspannung:	~ 700 (EA)
	~ 650 (TC/EA)
Interface:	ConFlo II Finnigan MAT
Gasversorgung:	Helium 5.0 mit Agilent Mass Spectrometer Gas Purifier
	Kohlendioxid 4.5
	Kohlenmonoxid
	Sauerstoff 4.5
	Stickstoff 6.0
	2 % Wasserstoff in Helium 5.0 (Auxiliary Gas für TC/EA)

9.3.2 Elementaranalysator (EA)

Hersteller:	CE Instruments, ThermoQuest Italia S.p.A.
Gerätename:	EA 1110 CHN
Autosampler:	AS 200 für 50 Proben
Eingangs-O_2-druck:	150 kPa (~ 1,5 bar)
Eingangs-He-druck:	150 kPa (~ 1,5 bar)
Heliumfluß:	80 ml/min.

Einstellungen am EA:

Zyklus Probenzufuhr (cycle time):	60 s
Sauerstoffzufuhr (oxy time):	59 s
Probeneinwurf (start sample):	17 s
Autosamplerdrehung (stop sample):	40 s

Druckeinstellungen am ConFlo II:

Helium-Dilution:	~ 1,30 bar
Kohlendioxid:	~ 1,15 bar
Stickstoff:	~ 1,60 bar

Oxidationsrohr (Quarz):

Temperatur:	1040 °C
Packung:	Quarzwolle
	Chrom(III)-oxid, gekörnt
	versilbertes Kobaltoxid, Granulat

Reduktionsrohr (Quarz):

Temperatur:	650 °C
Packung:	Quarzwolle
	reduziertes Kupfer, 0,5mm
	Kupfer(II)-oxid, 0,5mm

GC-Säule:

Temperatur:	50 °C
Material:	Porapak

Wasserfalle:

Temperatur:	Raumtemperatur, nicht beheizbar
Packung:	Magnesiumperchlorat, Granulat

Verbrauchsmaterialienzulieferer:	IVA Analysentechnik e.K.
	Meerbusch, Deutschland

9.3.3 Pyrolyseeinheit (TC/EA)

Hersteller:	ThermoQuest Finnigan
Gerätename:	TC/EA
Autosampler:	AS 200 für 50 Proben

He-druck (Purge):	1,0 bar
He-druck (Carrier):	0,7 bar
Auxiliarygasdruck:	0,8 bar (2 % H_2 in He)
Heliumfluß:	90 ml/min.

Druckeinstellungen am ConFlo II:

Helium-Dilution:	~ 1,30 bar
Kohlendioxid:	~ 1,15 bar
Kohlenmonoxid:	~ 1,60 bar

Reaktor (Glassy Carbon Rohr in Aluminiumoxidrohr):

Temperatur:	1350 °C
Packung:	Graphitcrucibles, rund
	Glassy Carbon Granulat
	Quarzwolle
	Silberwolle

GC-Säule:

Temperatur:	70 °C
Material:	Molecular Sieve 5a, 80-100 mesh

Verbrauchsmaterialienzulieferer:	IVA Analysentechnik e.K.
	Meerbusch, Deutschland

9.3.4 Probenvorbereitung für die IRMS

Mühle:

Hersteller/Name:	Retsch „Grindomix GM200“
Einwaage:	~ 20 g Pistazien (ohne Schale)

Mikrowaage:

Hersteller/Name:	Mettler Toledo „Comparator“	
Einwaagen für den EA:	Acetanilid:	0,5 – 0,6 mg (Arbeitsstandard)
	Atropin:	0,9 – 1,0 mg (Gerätekontrollprobe)
	Pistazie:	1,0 – 1,1 mg
	Pistazienhaut:	1,5 – 1,7 mg
	Rückstand:	0,7 – 0,9 mg
	Pistazienöl:	0,75 µl
Einwaagen für den TC/EA:	Cellulose:	80 – 100 µg (Arbeitsstandard)
	Benzoesäure:	140 – 160 µg (Gerätekontrollprobe)
	Pistazie:	120 – 160 µg
	Pistazienhaut:	110 – 140 µg
	Rückstand:	100 – 130 µg
	Pistazienöl:	0,40 µl

Einwaagegefäße:

Zinnkapseln für Feststoffe (0,02 ml):	3,2×4 mm, Zinnreinheit 97,5 %
Zinnkapseln für Flüssigkeiten (0,012 ml):	∅ 2,00 mm, Höhe 5,0 mm, Zinnreinheit 99,9 %
Zinnkapseln für Flüssigkeiten (0,003 ml):	∅ 1,06 mm, Höhe 5,5 mm, Zinnreinheit 99,9 %

Lagerung:

gemahlene Pistazien:	Kühlschrank, Plastikgefäße (Naglene)
Pistazienöl:	Kühlschrank, 1,5 ml-Glas-Vials (Wheaton)
entfetteter Pistazienrückstand:	Raumtemperatur, Plastikgefäße in evakuiertem Exsikkator
Pistazien:	Raumtemperatur, eingeschweißt in Tüten

Anmerkung:

Alle Proben für die TC/EA-Messungen wurden mindestens einen Tag lang über di-Phosphorpentoxid p.A. (Merck) im evakuierten Exsikkator getrocknet.

Verbrauchsmaterialienzulieferer: IVA Analysentechnik e.K., Meerbusch, Deutschland

9.3.5 Gewinnung des Pistazienöls

Soxhlet-Extraktion:

Gerät:	Soxhlet-Apparatur[209]
Einwaage:	5-10 g gemahlene Pistazien, ausgestrichen auf Faltenfilter
Extraktionsmittel:	Petroleumbenzin p.A., Siedebereich 40-60 °C (Merck)
Extraktionsdauer:	4-6 Stunden

ASE-Extraktion:

Hersteller:	Dionex	
Gerätename:	ASE 300	
Kartuschengröße:	10 ml	
Einwaage:	~ 1 g gemahlene Pistazien, ausgestrichen auf Faltenfilter ∅ 90 mm (Schleicher & Schüll 595½)	
Extraktionsmittel:	Petroleumbenzin p.A., Siedebereich 40-60 °C (Merck)	
Geräteeinstellungen:	Preheating Time:	5 min.
	Heating Time:	6 min.
	Static Time:	5 min.
	Flush Volume:	130 %
	Purge Time:	100 s
	Cycles:	1
	Pressure:	140 bar
	Temperature:	110 °C

Anzahl der Wiederholungen pro Kartusche: 3×

Vakuumrotationsverdampfer:

Hersteller:	Büchi
Gerätenamen:	Waterbath B-480
	Rotavapor R-114
	Vakuum System B-172
	Vakuum/Destillation Controller B-168
Wasserbadtemperatur:	40 – 60 °C
Druck:	500 – 550 mbar

Trockenschrank:

Hersteller:	Heraeus
Temperatur:	~ 105 °C
Trocknungsdauer:	~ 6 Stunden
Trocknungsgefäße:	Pistazienöl im Spitzkolben
	entfetteter Pistazienrückstand auf Filterpapier und Uhrglas

9.3.6 Röstung und Salzung im Laborversuch

Im Laborversuch sollte der Einfluss der Röstung und Salzung auf das Isotopenverhältnis untersucht werden. Dazu wurde eine vorhandene amerikanische Handelsware, die als „roh" gekennzeichnet war, als Probe gewählt und nach dem Rezeptvorschlag der „California Pistachio Commission", welcher auf deren Internetseite[42] abrufbar ist, zubereitet.

Versuch 1: Röstung

Menge:	1 Cup (~250 ml) Pistazien	
Temperatur:	120 °C	
Röstdauer:	1½ h und 1¾ h	→ alle 30 Minuten wenden

Versuch 2: Röstung und Salzung

Menge:	1 Cup (~250 ml) Pistazien
Salzlösung:	7 g NaCl (Merck) in 40 ml Wasser

→ Pistazien mit der Salzlösung vermengen und eindampfen, danach folgt die Röstung wie in Versuch 1 beschrieben.

9.3.7 Statistik

Die statistischen Auswertungen und Tests in Kapitel 4, 5 und 6 wurden mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS 12.0 auf dem 95 %-Wahrscheinlichkeitsniveau durchgeführt. Abweichungen davon sind im Text erwähnt. Für die Berechnungen der Hauptkomponenten- und Diskriminanzanalyse wurde ausschließlich der um die Ausreißer verminderten Datensatz der authentischen Pistazien verwendet.

10.

Literaturverzeichnis

[1] "Vielseitige Nüsse - Pistazien". *Warenverkaufskunde in Lebensmittel Praxis,* **2000,** 24, S. 1-6

[2] Abelson, P. H.; Hoering, T. C.: "Carbon isotope fractionation in formation of amino acids by photosynthetic organisms". *Proceedings of the National Academy of Sciences,* **1961,** 47, S. 623-632

[3] Aguilar-Cisneros, B. O.; Lopez, M. G.; Richling, E.; Heckel, F.; Schreier, P.: "Tequila authenticity assessment by headspace SPME-HRGC-IRMS analysis of C-13/C-12 and O-18/O-16 ratios of ethanol". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2002,** 50 (26), S. 7520-7523

[4] Amberger, A.; Schmidt, H. L.: "The Natural Isotope Content of Nitrate As An Indicator of Its Origin". *Geochimica et Cosmochimica Acta,* **1987,** 51 (10), S. 2699-2705

[5] Amundson, R.; Austin, A. T.; Schuur, E. A. G.; Yoo, K.; Matzek, V.; Kendall, C.; Uebersax, A.; Brenner, D.; Baisden, W. T.: "Global patterns of the isotopic composition of soil and plant nitrogen". *Global Biogeochemical Cycles,* **2003,** 17 (1), S. 1031

[6] Anderson, K. A.; Smith, B. W.: "Chemical profiling to differentiate geographic growing origins of coffee". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2002,** 50 (7), S. 2068-2075

[7] Anderson, K. A.; Smith, B. W.: "Use of chemical profiling to differentiate geographic growing origin of raw Pistachios". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2005,** 53 (2), S. 410-418

[8] AOAC method 2004.01: "Carbon Stable Isotope Ratio of Ethanol derived from Fruit Juices and Maple Syrups". **2004**

[9] AOAC Official Method 991.41: "C-4 Plant Sugars in Honey". *AOAC Official Methods of Analysis (1995),* **1997**, S. 29-30

[10] Araus, J. L.; Slafer, G. A.; Buxo, R.; Romagosa, I.: "Productivity in prehistoric agriculture: physiological models for the quantification of cereal yields as an alternative to traditional approaches". *Journal of Archaeological Science,* **2003,** 30 (6), S. 681-693

[11] Avak, H.: "Persönliche Mitteilung während der IRMS-Schulung bei ThermoFinnigan in Bremen". **2003**

[12] Avak, H.; Hilkert, A.; Pesch, R.: "Forensic studies by EA-IRMS". *Isotopes in Environmental and Health Studies,* **1996,** 32 (2-3), S. 285-288

[13] Backhaus, K.; Erichson, B.; Plinke, W.; Weiber, R.: "Multivariate Analysenmethoden: Eine anwendungsorientierte Einführung". *Springer-Verlag,* **2000**

[14] Barbour, M. M.; Cernusak, L. A.; Farquhar, G. D.: "Factors Affecting the Oxygen Isotope Ratio of Plant Organic Material". In: Stable Isotopes and Biosphere-Atmosphere Interactions: Processes and Biological Controls (Hrsg. Flanagan, L. B.; Ehleringer, J. R.; Pataki, D. E.), *Elsevier Academic Press*, **2005**, S. 9-28

[15] Bateman, A. S.; Kelly, S. D.; Jickells, T. D.: "Nitrogen isotope relationships between crops and fertilizer: Implications for using nitrogen isotope analysis as an indicator of agricultural regime". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2005,** 53 (14), S. 5760-5765

[16] Bauer-Christoph, C.; Christoph, N.; Aguilar-Cisneros, B. O.; Lopez, M. G.; Richling, E.; Rossmann, A.; Schreier, P.: "Authentication of tequila by gas chromatography and stable isotope ratio analyses". *European Food Research and Technology,* **2003,** 217 (5), S. 438-443

[17] Begley, I. S.; Scrimgeour, C. M.: "High-precision delta H-2 and delta O-18 measurement for water and volatile organic compounds by continuous-flow pyrolysis isotope ratio mass spectrometry". *Analytical Chemistry,* **1997,** 69 (8), S. 1530-1535

[18] Belcher, R.; Ingram, G.; Majer, J. R.: "Direct Determination of Oxygen in Organic Materials. I. A Study of Carbon Reduction Method". *Talanta,* **1969,** 16 (7), S. 881

[19] Bensaid, F. F.; Wietzerbin, K.; Martin, G. J.: "Authentication of natural vanilla flavorings: Isotopic characterization using degradation of vanillin into guaiacol". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2002,** 50 (22), S. 6271-6275

[20] Bilke, S.; Mosandl, A.: "H-2/H-1 and C-13/C-12 isotope ratios of trans-anethole using gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2002,** 50 (14), S. 3935-3937

[21] Blackmer, A. M.; Bremner, J. M.: "Nitrogen Isotope Discrimination in Denitrification of Nitrate in Soils". *Soil Biology & Biochemistry,* **1977,** 9 (2), S. 73-77

[22] Boner, M.; Forstel, H.: "Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef". *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* **2004,** 378 (2), S. 301-310

[23] Boner, M.; Förstel, H.: "Überprüfung der $^{13}C/^{12}C$-Isotope im Schaum- und Perlwein". *Der Deutsche Weinbau,* **2001,** 15, S. 18-23

[24] Bottinga, Y.; Craig, H.: "Oxygen Isotope Fractionation Between CO2 and Water and Isotopic Composition of Marine Atmospheric CO2". *Earth and Planetary Science Letters,* **1969,** 5 (5), S. 285

[25] Brand, W. A.: "Mass Spectrometer Hardware for Analyzing Stable Isotope Ratios". In: Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques, Volume I (Hrsg. De Groot, P. A.), *Elsevier B.V.*, **2004**, S. 835-856

[26] Brand, W. A.: "Isotope Ratio Mass Spectrometry: Precision from Transient Signals". In: Advances in Mass Spectrometry (Hrsg. Karjalainen, E. J.; Hesso, J. E.; Karjalainen, U. P.), *Elsevier Science Publishers*, **1998**, S. 655-679

[27] Braunsdorf, R.; Hener, U.; Mosandl, A.: "Analytical Differentiation Between Naturally Grown, Fermentatively Produced and Synthetic (Nature-Identical) Aroma Compounds. 2. GC-C-Irms Analysis of Important Flavor Aldehydes Fundamentals and Applications". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1992,** 194 (5), S. 426-430

[28] Braunsdorf, R.; Hener, U.; Przibilla, G.; Piecha, S.; Mosandl, A.: "The Influence of Analytical and Technological Procedures on the 13C/12C Isotope Ratio of Orange Oil Compounds". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1993,** 197 (1), S. 24-28

[29] Braunsdorf, R.; Hener, U.; Stein, S.; Mosandl, A.: "Comprehensive C-GC-Irms Analysis in the Authenticity Control of Flavors and Essential Oils. 1. Lemon Oil". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1993,** 197 (2), S. 137-141

[30] Breas, O.; Reniero, F.; Serrini, G.: "Isotope Ratio Mass-Spectrometry - Analysis of Wines from Different European Countries". *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* **1994,** 8 (12), S. 967-970

[31] Brenna, J. T.; Corso, T. N.; Tobias, H. J.; Caimi, R. J.: "High-precision continuous-flow isotope ratio mass spectrometry". *Mass Spectrometry Reviews,* **1997,** 16, S. 227-258

[32] Bricout, J.: "Control of Authenticity of Fruit Juices by Isotopic Analysis". *Journal of the Association of Official Analytical Chemists,* **1973,** 56 (3), S. 739-742

[33] Bricout, J.; Fontes, J. Ch.; Merlivat, L.: "Detection of Synthetic Vanillin in Vanilla Extracts by Isotopic Analysis". *Journal of the Association of Official Analytical Chemists,* **1974,** 57 (3), S. 713-715

[34] Bricout, J.; Koziet, J.: "Control of the Authenticity of Orange Juice by Isotopic Analysis". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1987,** 35 (5), S. 758-760

[35] Brockhaus: "Die Enzyklopädie Peru-Rag.". *F.A. Brockhaus GmbH,* **1998**

[36] Brosius, F.: "SPSS 11". *mitp Verlag,* **2002**

[37] Bühl, A.; Zöfel, P.: "SPSS 11, Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows". *Pearson Studium,* **2002**

[38] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL): "Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG″. **2004**

[39] Bundesministerium der Finanzen, Zoll online: "Vorführpflichten nach § 55 Abs. 1 Nr. 3 LFBG", *http://www.zoll-d.de/e0_downloads/f0_dont_show/vorfuehrpflichten.pdf*, letzter Aufruf der Website: **11.5.2006**

[40] Butzenlechner, M.: "Isotopenverteilungen in Phenylpropan-Abkömmlingen, Spiegel ihrer Biosynthese und Grundlagen für ihre Herkunftsbestimmung (Dissertation)". *Technische Universität München,* **1990**

[41] Calderone, G.; Naulet, N.; Guillou, C.; Reniero, F.: "Characterization of European wine glycerol: Stable carbon isotope approach". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2004,** 52 (19), S. 5902-5906

[42] California Pistachio Commission, *http://www.pistachios.org*, letzter Aufruf der Website: **11.5.2006**

[43] California Pistachio Commission: "Good Agricultural Practices Manual - Guidelines for California Pistachio Growers". **2000**

[44] California Pistachio Commission: "Good Processing Practices Manual - Guidelines for California Pistachio Processors". **2000**

[45] Calvin, M.; Bassham, J. A.: "The Photosynthesis of Carbon Compounds". *Benjamin,* **1962**

[46] Casabianca, H.; Graff, J. B.: "Enantiomeric and Isotopic Analysis of Flavor Compounds of Some Raspberry Cultivars". *Journal of Chromatography A,* **1994,** 684 (2), S. 360-365

[47] Cernusak, L. A.; Wong, S. C.; Farquhar, G. D.: "Oxygen isotope composition of phloem sap in relation to leaf water in Ricinus communis". *Functional Plant Biology,* **2003,** 30 (10), S. 1059-1070

[48] Craig, H.: "Isotopic Standards for Carbon and Oxygen and Correction Factors for Mass-Spectrometric Analysis of Carbon Dioxide". *Geochimica et Cosmochimica Acta,* **1957,** 12 (1-2), S. 133-149

[49] Curt, M. D.; Aguado, P.; Sanchez, G.; Bigeriego, M.; Fernandez, J.: "Nitrogen isotope ratios of synthetic and organic sources of nitrate water contamination in Spain". *Water Air and Soil Pollution,* **2004,** 151 (1-4), S. 135-142

[50] CVUA Karlsruhe (Jahresbericht 2002): "3.1.4 Mykotoxine: Gefährliche Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen", *http://www.cvua-karlsruhe.de/seiten/jahresbericht2002/pdf/kapitel3.pdf*, letzter Aufruf der Website: **4.5.2005**

[51] Da Silveira, L.; Sternberg, L.; Deniro, M. J.: "Biogeochemical implications of the isotopic equilibrium fractionation factor between the oxygen atoms of acetone and water". *Geochimica et Cosmochimica Acta,* **1983,** 47, S. 2271-2274

[52] Danho, D.; Naulet, N.; Martin, G. J.: "Deuterium, Carbon and Nitrogen Isotopic Analysis of Natural and Synthetic Caffeines - Authentication of Coffees and Coffee Extracts". *Analusis,* **1992,** 20 (3), S. 179-184

[53] Dansgaard, W.: "Stable Isotopes in Precipitation". *Tellus,* **1964,** 16 (4), S. 436-468

[54] Dautraix, S.; Gerola, K.; Guilluy, R.; Brazier, J. L.; Chateau, A.; Guichard, E.; Etievant, P.: "Test of Isotopic Fractionation During Liquid-Liquid-Extraction of Volatile Components from Fruits". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1995,** 43 (4), S. 981-983

[55] Day, M. P.; Zhang, B. L.; Martin, G. J.: "Determination of the Geographical Origin of Wine Using Joint Analysis of Elemental and Isotopic Composition. 2. Differentiation of the Principal Production Zones in France for the 1990 Vintage". *Journal of the Science of Food and Agriculture,* **1995,** 67 (1), S. 113-123

[56] Deichsel, D.; Trampisch, H. J.: "Clusteranalyse und Diskriminanzanalyse". *G. Fischer Verlag,* **1985**

[57] Delwiche, C. C.; Steyn, P. L.: "Nitrogen Isotope Fractionation in Soils and Microbial Reactions". *Environmental Science & Technology,* **1970,** 4 (11), S. 929

[58] Deniro, M. J.; Epstein, S.: "Mechanism of Carbon Isotope Fractionation Associated with Lipid-Synthesis". *Science,* **1977,** 197 (4300), S. 261-263

[59] Deniro, M. J.; Epstein, S.: "Relationship Between the Oxygen Isotope Ratios of Terrestrial Plant Cellulose, Carbon-Dioxide, and Water". *Science,* **1979,** 204 (4388), S. 51-53

[60] DIN V ENV 12140:1996 - Frucht- und Gemüsesäfte: "Bestimmung des Verhältnisses der stabilen Kohlenstoff-Isotope (13C/12C) im Zuckeranteil von Fruchsäften - Verfahren unter Verwendung der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie″. **1996**

[61] DIN V ENV 12141:1996 - Frucht- und Gemüsesäfte: "Bestimmung des Verhältnisses der stabilen Sauerstoff-Isotope (18O/16O) im Wasseranteil von Fruchsäften - Verfahren unter Verwendung der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie″. **1996**

[62] DIN V ENV 12142:1996 - Frucht- und Gemüsesäfte: "Bestimmung des Verhältnisses der stabilen Wasserstoff-Isotope (2H/1H) im Wasseranteil von Fruchsäften - Verfahren unter Verwendung der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie″. **1996**

[63] DIN V ENV 13070:1998 - Frucht- und Gemüsesäfte: "Bestimmung des Verhältnisses der stabilen Kohlenstoff-Isotope (13C/12C) in der Pulpe von Fruchsäften - Verfahren unter Verwendung der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie″. **1998**

[64] Doerffel, K.: "Statistik in der analytischen Chemie". *Wiley-VCH,* **1990**

[65] Dole, M.; Lane, G. A.; Rudd, D. P.; Zaukelies, D. A.: "Isotopic Composition of Atmospheric Oxygen and Nitrogen". *Geochimica et Cosmochimica Acta,* **1954,** 6 (2-3), S. 65-78

[66] Doner, L. W.: "Application of Natural Variations in 13C/12C Ratios to Detect Adulteration of Orange, Lemon, and Apple Juices″. In: Adulteration of fruit juice beverages, **1987**, S. 125-138

[67] Doner, L. W.: "Carbon Isotope Ratios in Natural and Synthetic Citric-Acid As Indicators of Lemon Juice Adulteration". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1985,** 33 (4), S. 770-772

[68] Doner, L. W.; Ajie, H. O.; Sternberg, L. D. L.; Milburn, J. M.; Deniro, M. J.; Hicks, K. B.: "Detecting Sugar-Beet Syrups in Orange Juice by D/H and O-18/O-16 Analysis of Sucrose". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1987,** 35 (4), S. 610-612

[69] Doner, L. W.; Brause, A. R.; Petrus, D. R.: "Delta-O-18 Measurements in Water for Detection of Sugar Beet-Derived Syrups in Frozen Concentrated Orange Juice - Collaborative Study". *Journal of AOAC International,* **1992,** 75 (6), S. 1107-1111

[70] Douthitt, C. B.: "Hyphenation of gas chromatographic techniques with isotope ratio mass spectrometry: Present status and future". *Analusis,* **1999,** 27 (3), S. 197-199

[71] Dunbar, J.: "Use of C-13/C-12 Ratios for Studying the Origin of CO2 in Sparkling Wines". *Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie,* **1982,** 311 (6), S. 578-580

[72] Dunbar, J.; Wilson, A. T.: "Determination of Geographic Origin of Caffeine by Stable Isotope Analysis". *Analytical Chemistry,* **1982,** 54 (3), S. 590-592

[73] Dyszel, S. M.; Petit, B. C.: "Determination of the Country of Origin of Pistachio Nuts by DSC and HPLC". *Journal of the American Oil Chemists Society,* **1990,** 67 (12), S. 947-951

[74] Dyszel, S. M.; Pettitt, B. C.; Schwartz, R. S.; Hecking, L. T.: "Determination of the country of origin of pistachio nuts". *Customs Laboratory Bulletin,* **1989,** 1 (1), S. 36-44

[75] Ehleringer, J. R.: "The Influence of Atmospheric CO_2, Temperature, and Water on the Abundace of C_3/C_4 Taxa″. In: A History of Atmospheric CO_2 and its Effects on Plants, Animals and Ecosystems (Hrsg. Ehleringer, J. R.; Carling; Dearing), *Springer*, **2005**, S. 214-231

[76] Ehleringer, J. R.; Osmond, C. B.: "Stable Isotopes″. In: Plant Physiological Ecology - Field methods and instrumentation (Hrsg. Pearcy, R. W.; Ehleringer, J. R.; Moony, H. A.; Rundel, PW.), *Chapman and Hall*, **1989**, S. 281-300

[77] Epstein, S.; Mayeda, T.: "Variation of O-18 Content of Waters from Natural Sources". *Geochimica et Cosmochimica Acta,* **1953,** 4 (5), S. 213-224

[78] Epstein, S.; Thompson, P.; Yapp, C. J.: "Oxygen and Hydrogen Isotopic Ratios in Plant Cellulose". *Science,* **1977,** 198 (4323), S. 1209-1215

[79] Eschricht, M.; Leitzmann, C.: "Handbuch Bio-Lebensmittel". *Behr´s Verlag,* **2003**

[80] Farquhar, G. D.; Ehleringer, J. R.; Hubick, K. T.: "Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,* **1989,** 40, S. 503-537

[81] Farquhar, G. D.; Henry, B. K.; Styles, J. M.: "A rapid on-line technique for determination of oxygen isotope composition of nitrogen-containing organic matter and water". *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* **1997,** 11 (14), S. 1554-1560

[82] Farquhar, G. D.; Lloyd, J.; Taylor, J. A.; Flanagan, L. B.; Syvertsen, J. P.; Hubick, K. T.; Wong, S. C.; Ehleringer, J. R.: "Vegetation Effects on the Isotope Composition of Oxygen in Atmospheric CO2". *Nature,* **1993,** 363 (6428), S. 439-443

[83] Farquhar, G. D.; O´Leary, M. H.; Berry, J. A.: "On the Relationship between Carbon Isotope Discrimination and the Intercellular Carbon Dioxide Concentration in Leaves". *Australian Journal of Plant Physiology,* **1982,** 9, S. 121-137

[84] Fauhl, C.; Reniero, F.; Guillou, C.: "H-1 NMR as a tool for the analysis of mixtures of virgin olive oil with oils of different botanical origin". *Magnetic Resonance in Chemistry,* **2000,** 38 (6), S. 436-443

[85] Faulhaber, S.: "Isotopenmassenspektrometrie und enantioselektive Analyse zur Authentizitätskontrolle ätherischer Öle (Dissertation)". *Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main,* **1998**

[86] Ferhi, A.; Létolle, R.: "Transpiration and Evaporation As Principal Factors in Oxygen Isotope Variations of Organic-Matter in Land Plants". *Physiologie Vegetale,* **1977,** 15 (2), S. 363-370

[87] Fernandez-Caceres, P. L.; Martin, M. J.; Pablos, F.; Gonzalez, A. G.: "Differentiation of tea (*Camellia sinensis*) varieties and their geographical origin according to their metal content". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2001,** 49 (10), S. 4775-4779

[88] Finnigan MAT: "Delta^{plus} - The Stable Isotope Engine". *Finnigan MAT Brochüre,* **1996**

[89] Finnigan MAT: "TC/EA - High Temperature Conversion / Elemental Analyzer". *Finnigan MAT Brochüre,* **1999**

[90] Foreign Agricultural Service, Official USDA Estimates: "Pistachios: Production, Supply and Distribution in Selected Countries", *http://www.fas.usda.gov/psd/complete_tables/HTP-table6-117.htm*, letzter Aufruf der Website: **11.5.2006**

[91] Förstel, H.: "Die natürliche Fraktionierung der stabilen Sauerstoff-Isotope als Indikator für Reinheit und Herkunft von Wein". *Naturwissenschaften,* **1985,** 72, S. 449-455

[92] Förstel, H.: "Elemente und Isotope". *Flüssiges Obst,* **1994,** 61 (1), S. 15-19

[93] Förstel, H.; Hützen, H.: "Variation des Verhältnisses der stabilen Sauerstoff-Isotope im Grundwasser der Bundesrepublik Deutschland". *gwf-wasser/abwasser,* **1984,** 125, S. 21-25

[94] Förstel, H.; Hützen, H.: "Stabile Sauerstoff-Isotope als natürliche Markierung von Weinen". *Die Weinwirtschaft,* **1984,** 3, S. 71-76

[95] Fotografie Ulla Kimmig: "Eine Reportage von Dierk Jensen, erschienen in WELTBILD 3/01", *http://www.ullakimmig.de/portframe.html*, letzter Aufruf der Website: **4.5.2005**

[96] Franke, W.: "Nutzpflanzenkunde". *Thieme-Verlag,* **1989**

[97] Freyer, H. D.; Aly, A. I. M.: "Nitrogen-15 studies on identifying fertilizer excess in environmental systems". *IAEA-SM-191/9,* **1974**, S. 21-33

[98] Freyer, H. D.; Aly, A. I. M.: "Nitrogen-15 Variations in Fertilizer Nitrogen". *Journal of Environmental Quality,* **1974,** 3 (4), S. 405-406

[99] Fronza, G.; Fuganti, C.; Grasselli, P.; Reiero, F.; Guillou, C.; Breas, O.; Sada, E.; Rossmann, A.; Hermann, A.: "Determination of the C-13 content of glycerol samples of different origin". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1998,** 46 (2), S. 477-480

[100] Fronza, G.; Fuganti, C.; Grasselli, P.; Serra, S.; Reniero, F.; Guillou, C.: "$\delta^{13}C$- and $\delta^{18}O$-Values of glycerol of food fats". *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* **2001,** 15, S. 763-766

[101] Fruit & Nut Research Information Center, University of California: "Pistachios Processing Procedures", http://fruitsandnuts.ucdavis.edu/crops/pistachprocess.shtml, letzter Aufruf der Website: **11.5.2006**

[102] Funk, W.; Dammann, V.; Donnevert, G.: "Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie". *VCH Weinheim,* **1992**

[103] Galimov, E. M.; Kodina, L. A.; Generalova, V. N.: "Experimental Investigation of Intra- and Intermolecular Isotopic Effects in Biogenic Aromatic Compounds". *Geochemistry International,* **1975**, S. 9-13

[104] Gensler, M.; Roßmann, A.; Schmidt, H. L.: "Die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie als Analysenverfahren zum Authentizitätsnachweis bei Fruchsäften, gezeigt an verschiedenen Inhaltsstoffen". *Lebensmittelchemie,* **1993,** 48 (6), S. 129-130

[105] Gensler, M.; Rossmann, A.; Schmidt, H. L.: "Detection of Added L-Ascorbic-Acid in Fruit Juices by Isotope Ratio Mass-Spectrometry". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1995,** 43 (10), S. 2662-2666

[106] Gensler, M.; Schmidt, H. L.: "Isolation of the main organic acids from fruit juices and nectars for carbon isotope ratio measurements". *Analytica Chimica Acta,* **1994,** 299, S. 231-237

[107] Gertz, Ch.: "Methodenvalidierung und Bewertung von Analysenergebnissen". In: Qualität im analytischen Labor (Hrsg. Kromidas, St.), *VCH Weinheim*, **1995**, S. 181-207

[108] Giesemann, A.; Jager, H. J.; Norman, A. L.; Krouse, H. P.; Brand, W. A.: "Online Sulfur-Isotope Determination Using An Elemental Analyzer Coupled to A Mass-Spectrometer". *Analytical Chemistry,* **1994,** 66 (18), S. 2816-2819

[109] Gimenez-Miralles, J. E.; Salazar, D. M.; Solana, I.: "Regional origin assignment of red wines from Valencia (Spain) by H-2 NMR and C-13 IRMS stable isotope analysis of fermentative ethanol". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1999,** 47 (7), S. 2645-2652

[110] Gleixner, G.; Danier, H.-J.; Werner, R. A.; Schmidt, H. L.: "Correlations between the ^{13}C Content of Primary and Secondary Plant Products in Different Cell Compartments and That in Decomposing Basidiomycetes". *Plant Physiology,* **1993,** 102, S. 1287-1290

[111] Gleixner, G.; Schmidt, H. L.: "Carbon isotope effects on the fructose-1,6-bisphosphate aldolase reaction, origin for non-statistical C-13 distributions in carbohydrates". *Journal of Biological Chemistry,* **1997,** 272 (9), S. 5382-5387

[112] Gonzalez, J.; Remaud, G.; Jamin, E.; Naulet, N.; Martin, G. G.: "Specific natural isotope profile studied by isotope ratio mass spectrometry (SNIP-IRMS): C-13/C-12 ratios of fructose, glucose, and sucrose for improved detection of sugar addition to pineapple juices and concentrates". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1999,** 47 (6), S. 2316-2321

[113] Gray, J.; Thompson, P.: "Climatic Information from O-18/O-16 Analysis of Cellulose, Lignin and Whole Wood from Tree Rings". *Nature,* **1977,** 270 (5639), S. 708-709

[114] Gremaud, G.; Pfammatter, E.; Piantini, U.; Quaile, S.: "Classifiation of Swiss Wines on a Regional Scale by Means of a Multi-Isotopic Analysis Combined with Chemometric Methods". *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene,* **2002,** 93, S. 44-56

[115] Gremaud, G.; Quaile, S.; Piantini, U.; Pfammatter, E.; Corvi, C.: "Characterization of Swiss vineyards using isotopic data in combination with trace elements and classical parameters". *European Food Research and Technology,* **2004,** 219 (1), S. 97-104

[116] Gucek, M.; Marsel, J.; Ogrinc, N.; Lojen, S.: "Stable Isotopes Determinations in some Fruit Juices to Detect Added Sugar". *Acta Chimica Slovenica,* **1998,** 45 (3), S. 217-228

[117] Guillou, C.; Jamin, E.; Martin, G. J.; Reniero, F.; Wittkowski, R.; Wood, R.: "Isotopic analyses of wine and of products derived from grape". *Bulletin O.I.V.,* **2001,** 74 (839-840), S. 26-36

[118] Guillou, C.; Lipp, M.; Radovic, B.; Reniero, F.; Schmidt, M.; Anklam, E.: "Use of pyrolysis mass spectrometry in food analysis: applications in the food analysis laboratory of the European Commissions' Joint Research Centre". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis,* **1999,** 49 (1-2), S. 329-335

[119] Handley, L. L.; Raven, J. A.: "The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology". *Plant, Cell and Environment,* **1992,** 15 (9), S. 965-985

[120] Handley, L. L.; Robinson, D.; Forster, B. P.; Ellis, R. P.; Scrimgeour, C. M.; Gordon, D. C.; Nevo, E.; Raven, J. A.: "Shoot $\delta^{15}N$ correlates with genotype and salt stress in barley". *Planta,* **1997,** 201, S. 100-102

[121] Hartung, J.; Elpelt, B.: "Multivariate Statistik - Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik". *Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH,* **1999**

[122] Hartwig, G.; Wendling, K.: "Statistische Qualitätskontrolle - Praktische Anwendung in der Lebensmittelproduktion und im Labor". *B. Behr´s Verlag,* **2000**

[123] Hatch, M. D.; Slack, C. R.: "Photosynthetic CO_2-Fixation Pathways". *Annual Review of Plant Physiology,* **1970,** 21, S. 141-162

[124] Heaton, T. H. E.: "Spatial, Species, and Temporal Variations in the $^{13}C/^{12}C$ Ratios of C_3 Plants: Implications for Palaeodiet Studies". *Journal of Archaeological Science,* **1999,** 26, S. 637-649

[125] Hener, U.; Brand, W. A.; Hilkert, A. W.; Juchelka, D.; Mosandl, A.; Podebrad, F.: "Simultaneous on-line analysis of O-18/O-16 and C-13/C-12 ratios of organic compounds using GC-pyrolysis-IRMS". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1998,** 206 (3), S. 230-232

[126] Hener, U.; Faulhaber, S.; Kreis, P.; Mosandl, A.: "On the Authenticity Evaluation of Balm-Oil (*Melissa-Officinalis L*)". *Pharmazie,* **1995,** 50 (1), S. 60-62

[127] Hener, U.; Mosandl, A.; Hagenauer-Hener, U.; Dietrich.H.: "Stabil-Isotopenanalyse mittles Headspace-GC-IRMS - ein Beitrag zur Analytik alkoholhaltiger Getränke". *Vitic. Enol. Sci.,* **1995,** 50 (4), S. 113-117

[128] Hener, U.; Mosandl, A.; Hilkert, A.; Bahrs-Windsberger, J.; Großmann, M.; Sponholz, W.: "(Headspace-) GC-IRMS zur $^{13}C/^{12}C$- und $^{18}O/^{16}O$-Analyse von Ethanol aus alkoholhaltigen Getränken und Destillaten". *Vitic.Enol.Sci.,* **1998,** 53 (2), S. 49-53

[129] Henrion, R.; Henrion, G.: "Multivariate Datenanalyse: Methodik und Anwendung in der Chemie und verwandten Gebieten". *Springer-Verlag,* **1995**

[130] Hermes, P.: "Pistazien". *Öko-Test,* **1999,** 11

[131] Hillaire-Marcel, G.: "Isotopes and Food″. In: Handbook of Enviromental Isotope Geochemistry, Volume 2 - The Terrestrial Environment, B (Hrsg. Fritz, P.; Fontes, J. Ch.), *Elsevier*, **1986**, S. 507-548

[132] Hiller, E.: "Fortbildungslehrgang am BgVV: Biostatistik/Biometrie mit Bezug auf die Anwendung der statistischen Software SPSS für Windows″. **2000**

[133] Hoering, T.: "Variations of Nitrogen-15 Abundance in Naturally Occurring Substances". *Science,* **1955,** 122 (3182), S. 1233-1234

[134] Hoffman, G.; Jouzel, J.; Masson, V.: "Stable water isotopes in atmospheric general circulation models". *Hydrological Processes,* **2000,** 14, S. 1385-1406

[135] Hoffman, P. G.; Salb, M.: "Isolation and Stable Isotope Ratio Analysis of Vanillin". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1979,** 27 (2), S. 352-355

[136] Holbach, B.; Förstel, H.: "Das Verhältnis der Stabilisotopen ^{18}O und ^{16}O zur Herkunftsbestimmung von Wein″. In: Niederschrift über die Tagung des Bundesausschusses für Weinforschung in Oberscheißheim vom 24. bis 26. Mai 1994, **1994**, S. 169-185

[137] Houerou, G.; Kelly, S. D.; Dennis, M. J.: "Determination of the oxygen-18/oxygen-16 isotope ratios of sugar, citric acid and water from single strength orange juice". *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* **1999,** 13 (13), S. 1257-1262

[138] Hübner, H.: "Isotope Effects of Nitrogen in the Soil and Biosphere″. In: Handbook of Enviromental Isotope Geochemistry, Volume 2 - The Terrestrial Environment, B (Hrsg. Fritz, P.; Fontes, J. Ch.), *Elsevier*, **1986**, S. 361-506

[139] International Atomic Energy Agency: "Analytical Quality Control Services - Database of Reference Materials", *http://www.iaea.org/programmes/aqcs/index.shtml*, letzter Aufruf der Website: **11.5.2006**

[140] ISO 5725-2: 1994(E): "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2″. **1994**

[141] ISO 5725-6: 1994(E): "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 6″. **1994**

[142] Isotope Hydrology Section of the IAEA: "GNIP Maps and Animations (2001)", *http://isohis.iaea.org*, letzter Aufruf der Website: **11.5.2006**

[143] Jamin, E.; Gonzalez, J.; Bengoechea, L.; Kerneur, G.; Remaud, G.; Naulet, N.; Martin, G. G.: "Measurement of C-13/C-12 ratios of sugars, malic acid, and citric acid as authenticity probes of citrus juices and concentrates". *Journal of AOAC International,* **1998,** 81 (3), S. 604-609

[144] Jamin, E.; Gonzalez, J.; Remaud, G.; Naulet, N.; Martin, G. G.: "Detection of exogenous sugars or organic acids addition in pineapple juices and concentrates by C-13 IRMS analysis". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1997,** 45 (10), S. 3961-3967

[145] Jamin, E.; Gonzalez, J.; Remaud, G.; Naulet, N.; Martin, G. G.; Weber, D.; Rossmann, A.; Schmidt, H. L.: "Improved detection of sugar addition to apple juices and concentrates using internal standard C-13 IRMS". *Analytica Chimica Acta,* **1997,** 347 (3), S. 359-368

[146] Jamin, E.; Guerin, R.; Retif, M.; Lees, M.; Martin, G. J.: "Improved detection of added water in orange juice by simultaneous determination of the oxygen-18/oxygen-16 isotope ratios of water and ethanol derived from sugars". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2003,** 51 (18), S. 5202-5206

[147] Jamin, E.; Martin, F.; Martin, G. G.; Blanch-Cortes, A. I.; Christoph, N.; Ciambotti, A.; Giraudon, S.; Guerin, R.; Guillou, C.; Kelly, S.; Lamoureux, C.; Mazac, J.; Naulet, N.; Pavanello, F.; Retif, M.; Rossmann, A.; Versini, G.: "Determination of the C-13/C-12 ratio of ethanol derived from fruit juices and maple syrup by isotope ratio mass spectrometry: Collaborative study". *Journal of AOAC International,* **2004,** 87 (3), S. 621-631

[148] Juchelka, D.; Beck, T.; Hener, U.; Dettmar, F.; Mosandl, A.: "Multidimensional gas chromatography coupled on-line with isotope ratio mass spectrometry (MDGC-IRMS): Progress in the analytical authentication of genuine flavor components". *Journal of High Resolution Chromatography,* **1998,** 21 (3), S. 145-151

[149] Karamanos, R. E.; Rennie, D. A.: "Variations in Natural N-15 Abundance As An Aid in Tracing Fertilizer Nitrogen Transformations". *Soil Science Society of America Journal,* **1980,** 44 (1), S. 57-62

[150] Kaufmann, A.: "Multivariate statistics as a classification tool in the food laboratory". *Journal of AOAC International,* **1997,** 80 (3), S. 665-675

[151] Kaunzinger, A.; Juchelka, D.; Mosandl, A.: "Progress in the authenticity assessment of vanilla. 1. Initiation of authenticity profiles". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1997,** 45 (5), S. 1752-1757

[152] Keeling, C. D.: "The concentration and isotopic abundances of carbon dioxide in rural and marine air". *Geochimica et Cosmochimica Acta,* **1961,** 24, S. 277-298

[153] Kelly, S.; Parker, I.; Sharman, M.; Dennis, J.; Goodall, I.: "Assessing the authenticity of single seed vegetable oils using fatty acid stable carbon isotope ratios (C-13/C-12)". *Food Chemistry,* **1997,** 59 (2), S. 181-186

[154] Kelly, S. D.; Rhodes, C.: "Emerging techniques in vegetable oil analysis using stable isotope ratio mass spectrometry". *Grasas y Aceites,* **2002,** 53 (1), S. 34-44

[155] Keppler, F.; Kalin, R. M.; Harper, D. B.; McRoberts, W. C.; Hamilton, J. T. G.: "Carbon isotope anomaly in the major plant C_1 pool and its global biogeochemical implications". *Biogeosciences,* **2004,** 1, S. 123-131

[156] Kohl, D. H.; Shearer, G.: "Isotopic Fractionation Associated with Symbiotic N-2 Fixation and Uptake of NO3 - by Plants". *Plant Physiology,* **1980,** 66 (1), S. 51-56

[157] Kohl, D. H.; Shearer, G. B.; Commoner, B.: "Variation of N-15 in Corn and Soil Following Application of Fertilizer Nitrogen". *Soil Science Society of America Journal,* **1973,** 37 (6), S. 888-892

[158] Körner, Ch.; Farquhar, G. D.; Wong, S. C.: "Carbon isotope discrimination by plants follows latitudinal and altitudinal trends". *Oecologia,* **1991,** 88, S. 30-40

[159] Kornexl, B.: "Multi-Element-Isotopenanalyse zu Fragen der Stickstoff-Bilanzierung und der Lebensmittelauthentizitätsprüfung (Dissertation)". *Technische Universität München, Freising-Weihenstephan,* **1997**

[160] Kornexl, B. E.; Gehre, M.; Hofling, R.; Werner, R. A.: "On-line delta O-18 measurement of organic and inorganic substances". *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* **1999,** 13 (16), S. 1685-1693

[161] Kornexl, B. E.; Rossmann, A.; Schmidt, H. L.: "Improving fruit juice origin assignment by combined carbon and nitrogen isotope ratio determination in pulps". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1996,** 202 (1), S. 55-59

[162] Kornexl, B. E.; Werner, R. A.; Gehre, M.: "Standardization for oxygen isotope ratio measurement - Still an unsolved problem". *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* **1999,** 13 (13), S. 1248-1251

[163] Kornexl, B. E.; Werner, T.; Rossmann, A.; Schmidt, H. L.: "Measurement of stable isotope abundances in milk and milk ingredients - A possible tool for origin assignment and quality control". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1997,** 205 (1), S. 19-24

[164] Kosir, I. J.; Kocjancic, M.; Ogrinc, N.; Kidric, J.: "Use of SNIF-NMR and IRMS in combination with chemometric methods for the determination of chaptalisation and geographical origin of wines (the example of Slovenian wines)". *Analytica Chimica Acta,* **2001,** 429 (2), S. 195-206

[165] Koziet, J.: "Isotope ratio mass spectrometric method for the on-line determination of oxygen-18 in organic matter". *Journal of Mass Spectrometry,* **1997,** 32 (1), S. 103-108

[166] Kromidas, S.: "Validierung in der Analytik". *Wiley-VCH,* **1999**

[167] Kroopnic, P.; Craig, H.: "Atmospheric Oxygen - Isotopic Composition and Solubility Fractionation". *Science,* **1972,** 175 (4017), S. 54

[168] Krueger, D. A.: "Stable Carbon Isotope Ratio Method for Detection of Corn-Derived Acetic-Acid in Apple Cider Vinegar - Collaborative Study". *Journal of AOAC International,* **1992,** 75 (4), S. 725-728

[169] Krueger, D. A.: "Applications of Stable Isotope Ratio Analysis to Problems of Fruit Juice Adulteration″. In: Adulteration of fruit juice beverages, **1987**, S. 109-124

[170] Krueger, D. A.; Krueger, H. W.: "Carbon Isotopes in Vanillin and the Detection of Falsified Natural Vanillin". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1983,** 31 (6), S. 1265-1268

[171] Krueger, D. A.; Krueger, H. W.: "Detection of Fraudulent Vanillin Labeled with C-13 in the Carbonyl Carbon". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1985,** 33 (3), S. 323-325

[172] Le Gall, G.; Colquhoun, I. J.; Defernez, M.: "Metabolite profiling using H-1 NMR spectroscopy for quality assessment of green tea, *Camellia sinensis* (L.)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2004,** 52 (4), S. 692-700

[173] Ledgard, S. F.; Woo, K. C.; Bergersen, F. J.: "Isotopic fractionation during reduction of nitrate and nitrite by extracts of spinach leaves". *Australian Journal of Plant Physiology,* **1985,** 12, S. 631-640

[174] Létolle, R.: "Nitrogen-15 in the Natural Environment″. In: Handbook of Enviromental Isotope Geochemistry, Volume 1 - The Terrestrial Environment, A (Hrsg. Fritz, P.; Fontes, J. Ch.), *Elsevier*, **1980**, S. 407-433

[175] Ma, J.-Y.; Chen, T.; Qiang, W.-Y.; Wang, G.: "Correlations Between Foliar Stable Carbon Isotope Composition and Environmental Factors in Desert Plant *Reaumuria soongorica* (Pall.) Maxim.". *Journal of Integrative Plant Biology,* **2005,** 47 (9), S. 1065-1073

[176] Macko, S. A.; Estep, M. L. F.; Engel, M. H.; Hare, P. E.: "Kinetic Fractionation of Stable Nitrogen Isotopes During Amino-Acid Transamination". *Geochimica et Cosmochimica Acta,* **1986,** 50 (10), S. 2143-2146

[177] Manca, G.; Camin, F.; Coloru, G. C.; Del Caro, A.; Depentori, D.; Franco, M. A.; Versini, G.: "Characterization of the geographical origin of pecorino sardo cheese by casein stable isotope (C-13/C-12 and N-15/N-14) ratios and free amino acid ratios". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2001,** 49 (3), S. 1404-1409

[178] Mannina, L.; Patumi, M.; Proietti, N.; Bassi, D.; Segre, A. L.: "Geographical characterization of Italian extra virgin olive oils using high-field H-1 NMR spectroscopy". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2001,** 49 (6), S. 2687-2696

[179] Mc Kinney, C. R.; Mc Crea, J. M.; Epstein, S.; Allen, H. A.; Urey, H. C.: "Improvements in Mass Spectrometers for the Measurement of Small Differences in Isotope Abundance Ratios". *Review of Scientific Instruments,* **1950,** 21 (8), S. 724-730

[180] Medina, R.; Schmidt, H. L.: "Nitrogen Isotope Ratio Variations in Biological Material, Indicator for Metabolic Correlations?". In: Stable Isotopes (Hrsg. Schmidt, H. L.; Förstel, H.; Heinzinger, K.), *Elsevier Schientific Publishing Company*, **1982**, S. 465-473

[181] Meier-Augenstein, W.: "Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry". *Journal of Chromatography A,* **1999,** 842 (1-2), S. 351-371

[182] Melzer, E.; Schmidt, H. L.: "Carbon Isotope Effects on the Pyruvate-Dehydrogenase Reaction and Their Importance for Relative C-13 Depletion in Lipids". *Journal of Biological Chemistry,* **1987,** 262 (17), S. 8159-8164

[183] Monetti, A.; Versini, G.; Reniero, F.: "Classification of Italian wines on a regional scale by means of a multi-isotopic analysis". In: Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence (Hrsg. Charalambous, G.), *Elsevier*, **1995**, S. 1723-1730

[184] Moore, D. J.; Nowak, R. S.; Tausch, R. J.: "Gas exchange and carbon isotope discrimination of *Juniperus oestosperma* and *Juniperus occidentalis* across environmental gradients in the Great Basin of western North America". *Tree Physiology,* **1999,** 19, S. 421-433

[185] Mühr, B., *http://www.klimadiagramme.de*, letzter Aufruf der Website: **11.5.2006**

[186] Nier, A. O.: "A Mass Spectrometer for Isotope and Gas Analysis". *Review of Scientific Instruments,* **1947,** 18 (6), S. 398-411

[187] Oeßelmann, J.; Hilkert, A.; Douthitt, C. B.: "Delta^{plus}, MAT 252 - Trends in Stable Isotope Analyses and Applications". *ThermoFinnigan Application Presentation,* **2001**

[188] Oeßelmann, J., Juchelka, D., Hilkert, A., Avak, H., Douthitt, and C.: "Isotope Ratio Mass Spectrometry - Authenticity Control by Multiple Element Isotope Ratio Determination (Präsentation)". *ThermoFinnigan, Finnigan MAT GmbH, Bremen,* **2001**

[189] Osmond, C. B.; Ziegler, H.: "Schwere Pflanzen und leichte Pflanzen: Stabile Isotope im Photosynthesestoffwechsel und in der biochemischen Ökologie". *Naturwissenschaftliche Rundschau,* **1975,** 28, S. 323-328

[190] O´Leary, M. H.: "Carbon Isotope Fractionation in Plants". *Phytochemistry,* **1981,** 20 (4), S. 553-567

[191] O´Leary, M. H.: "Environmental effects on carbon isotope fractionation in terrestrial plants". In: Stable Isotopes in the Biosphere (Hrsg. Wada, E.; Yoneyama, T.; Minagawa, M.; Ando, T.; Fry, B. D.), *Kyoto University Press*, **1995**, S. 78-91

[192] Paleofood.de - PK Webdesigns: "Aflatoxine in Nüssen sorgen für Schlagzeilen", *http://www.paleofood.de/Ernahrung/Ern5ab/ern5ab.html*, letzter Aufruf der Website: **11.5.2006**

[193] Park, R.; Epstein, S.: "Carbon isotope fractionation during photosynthesis". *Geochimica et Cosmochimica Acta,* **1961,** 21, S. 110-126

[194] Park, R.; Epstein, S.: "Methabolic Fractionation of C^{13} & C^{12} in Plants". *Plant Physiology,* **1961,** 36 (2), S. 133-138

[195] Parker, I. G.; Kelly, S. D.; Sharman, M.; Dennis, M. J.; Howie, D.: "Investigation into the use of carbon isotope ratios (C-13/C-12) of Scotch whisky congeners to establish brand authenticity using gas chromatography combusiton-isotope ratio mass spectrometry". *Food Chemistry,* **1998,** 63 (3), S. 423-428

[196] Pataki, D. E.; Bush, S. E.; Ehleringer, J. R.: "Stable Isotopes as a Tool in Urban Ecology". In: Stable Isotopes and Biosphere-Atmosphere Interactions: Processes and Biological Controls (Hrsg. Flanagan, L. B.; Ehleringer, J. R.; Pataki, D. E.), *Elsevier*, **2005**, S. 199-214

[197] Pella, E.; Colombo, B.: "Study of Carbon, Hydrogen and Nitrogen Determination by Combustion Gas Chromatography". *Mikrochimica Acta,* **1973** (5), S. 697-719

[198] Pérez-Trujillo, J.-P.; Barbaste, M.; Medina, B.: "Chemometric Study of Bottled Wines with Denomination of Origin from the Canary Islands (Spain) Based on Ultra-Trace Elemental Content Determined by ICP-MS". *Analytical Letters,* **2003,** 36 (3), S. 679-697

[199] Peterson, B. J.; Fry, B.: "Stable Isotopes in Ecosystem Studies". *Annual Review of Ecology and Systematics,* **1997,** 18, S. 293-320

[200] Piasentier, E.; Valusso, R.; Camin, F.; Versini, G.: "Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat". *Meat Science,* **2003,** 64 (3), S. 239-247

[201] Pichlmayer, F.; Blochberger, K.: "Isotopic Abundance Analysis of Carbon, Nitrogen and Sulfur with A Combined Elemental Analyzer-Mass Spectrometer System". *Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie,* **1988,** 331 (2), S. 196-201

[202] Pillonel, L.; Badertscher, R.; Casey, M.; Meyer, J.; Rossmann, A.; Schlichtherle-Cerny, H.; Tabacchi, R.; Bosset, J. O.: "Geographic origin of European Emmental cheese: Characterisation and descriptive statistics". *International Dairy Journal,* **2005,** 15 (6-9), S. 547-556

[203] Preston, T.; Owens, N. J. P.: "Preliminary C-13 Measurements Using A Gas-Chromatograph Interfaced to An Isotope Ratio Mass-Spectrometer". *Biomedical Mass Spectrometry,* **1985,** 12 (9), S. 510-513

[204] Preston, T.; Owens, N. J. P.: "Interfacing An Automatic Elemental Analyzer with An Isotope Ratio Mass-Spectrometer - the Potential for Fully Automated Total Nitrogen and N-15 Analysis". *Analyst,* **1983,** 108 (1289), S. 971-977

[205] Pupin, A. M.; Dennis, M. J.; Parker, I.; Kelly, S.; Bigwood, T.; Toledo, M. C. F.: "Use of isotopic analyses to determine the authenticity of Brazilian orange juice (*Citrus sinensis*)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1998,** 46 (4), S. 1369-1373

[206] Radmacher, W.; Hoverath, A.: "Die Direkte Bestimmung des Sauerstoffs Organischer Substanzen". *Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie,* **1959,** 167 (5), S. 336-342

[207] Rajagopalan, G.; Ramesh, R.; Sukumar, R.: "Climatic implications of $\delta^{13}C$ and $\delta^{18}O$ ratios from C3 and C4 plants growing in a tropical montane habitat in southern India". *Journal of Biosciences,* **1999,** 24 (4), S. 491-498

[208] Rauschenbach, P.; Simon, H.; Stichler, W.; Moser, H.: "Comparison of the Deuterium and C-13 Contents of Ethanol Obtained by Fermentation and Chemical Synthesis". *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences,* **1979,** 34 (1-2), S. 1-4

[209] Rauscher, K.; Engst, R.; Freimuth, U.: "Untersuchung von Lebensmitteln". *VEB Fachbuchverlag Leipzig,* **1986**

[210] Remaud, G.; Guillou, C.; Vallet, C.; Martin, G. J.: "A Coupled NMR and MS Isotopic Method for the Authentication of Natural Vinegars". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry,* **1992,** 342 (4-5), S. 457-461

[211] Richling, E.; Hohn, C.; Weckerle, B.; Heckel, F.; Schreier, P.: "Authentication analysis of caffeine-containing foods via elemental analysis combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (EA-C/P-IRMS)". *European Food Research and Technology,* **2003,** 216 (6), S. 544-548

[212] Rittenberg, D.; Ponticorvo, L.: "A Method for the Determination of the O^{18} Concentration of the Oxygen of Organic Compounds". *International Journal of Applied Radiation and Isotopes,* **1956,** 1, S. 208-214

[213] Robinson, D.; Handley, L. L.; Scrimgeour, C. M.; Gordon, D. C.; Forster, B. P.; Ellis, R. P.: "Using stable isotope natural abundances (δ15N and δ13C) to integrate the stress responses of wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) genotypes". *Journal of Experimental Botany,* **2000,** 51 (342), S. 41-50

[214] Rönne, P. Pressestelle der Finanzbehörde: "Pistazien aus dem Iran - Verschärfte Kontrollen", *http://www.hamburg.de/Behoerden/Pressestelle/Meldungen/tagesmeldungen/1998/okt/w43/mo/news.htm*, letzter Aufruf der Website: **11.5.2006**

[215] Rosengarten, F.: "The Book of Edible Nuts". *Walker Publishing Company,* **1984**

[216] Roßmann, A.: "Stabil-Isotopenanalyse an Naturstoffen als Routinemethode für die Qualitätskontrolle bei Lebensmitteln (Habilitation)". *Technische Universität München,* **1997**

[217] Rossmann, A.; Butzenlechner, M.; Schmidt, H. L.: "Evidence for A Nonstatistical Carbon Isotope Distribution in Natural Glucose". *Plant Physiology,* **1991,** 96 (2), S. 609-614

[218] Rossmann, A.; Lullmann, C.; Schmidt, H. L.: "Mass-Spectrometric Determination of Carbon and Hydrogen Isotope Ratios for Honey Authenticity Control". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1992,** 195 (4), S. 307-311

[219] Rossmann, A.; Rieth, W.; Schmidt, H. L.: "Possibilities and Results of the Combination of Hydrogen and Carbon Stable Isotope Ratio Determination with Results of Conventional Analyses (RSK-Values) for the Proof of Sugar Addition to Fruit Juices". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1990,** 191 (4-5), S. 259-264

[220] Rossmann, A.; Schmidt, H. L.: "Assignment of Ethanol Origin and Proof of Sugar Addition to Wine Through Positional H-2 and C-13 Isotope Ratio Measurement". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1989,** 188 (5), S. 434-438

[221] Rossmann, A.; Schmidt, H. L.; Hermann, A.; Ristow, R.: "Multielement stable isotope ratio analysis of glycerol to determine its origin in wine". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1998,** 207 (3), S. 237-243

[222] Rossmann, A.; Schmidt, H. L.; Reniero, F.; Versini, G.; Moussa, I.; Merle, M. H.: "Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1996,** 203 (3), S. 293-301

[223] Rossmann, A.; Trimborn, P.: "Oxygen stable isotope content in water from apple juice concentrate as a criterion for the proof of sugar addition". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1996,** 203 (3), S. 277-282

[224] Sachs, L.: "Angewandte Statistik". *Springer-Verlag,* **1999**

[225] Scharrer, A.; Mosandl, A.: "Progress in the authenticity assessment of vanilla. 2. delta C-13(V-PDB) correlations and methodical optimisations". *Deutsche Lebensmittel-Rundschau,* **2002,** 98 (4), S. 117-121

[226] Schmid, E. R.; Fogy, I.; Schwarz, P.: "Method for Differentiating Between Vinegar Produced by Fermentation and Vinegar Made from Synthetic Acetic-Acid Based on Determination of C-13/C-12 Isotope Ratio by Mass-Spectrometry". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1978,** 166 (2), S. 89-92

[227] Schmidt, H. L.: "Fundamentals and systematics of the non-statistical distributions of isotopes in natural compounds". *Naturwissenschaften,* **2003,** 90 (12), S. 537-552

[228] Schmidt, H. L.: "Isotope discriminations upon biosynthesis in natural systems: General causes and individual factors of the different bioelements". *Isotopes in Environmental and Health Studies,* **1999,** 35 (1-2), S. 11-18

[229] Schmidt, H. L.: "Food quality control and studies on human nutrition by mass spectrometric and nuclear magnetic resonance isotope ratio determination". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry,* **1986,** 324, S. 760-766

[230] Schmidt, H. L.; Butzenlechner, M.; Rossmann, A.; Schwarz, S.; Kexel, H.; Kempe, K.: "Inter- and intramolecular isotope correlations in organic compounds as a criterion for authenticity identification and origin assignment". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1993,** 196, S. 105-110

[231] Schmidt, H. L.; Kexel, H.; Butzenlechner, M.; Schwarz, S.; Gleixner, G.; Thimet, S.; Werner, R. A.; Gensler, M.: "Non-statistical isotope distribution in natural compounds: Mirror of their biosynthesis and key for their origin assignment″. In: Stable isotopes in the biosphere (Hrsg. Wada, E.; Yoneyama, T.; Minagawa, M.; Ando, T.; Fry, B. D.), *Kyoto University Press*, **1995**, S. 17-35

[232] Schmidt, H. L.; Medina, R.: "Possibilities and Scope of the Double Isotope Effect Method in the Elucidation of Mechanisms of Enzyme Catalyzed-Reactions". *Isotopenpraxis,* **1991,** 27 (1), S. 1-4

[233] Schmidt, H. L.; Rossmann, A.; Stockigt, D.; Christoph, N.: "Stable isotope analysis. Origin and authenticity of foodstuffs". *Chemie in Unserer Zeit,* **2005,** 39 (2), S. 90-99

[234] Schmidt, H. L.; Voerkelius, S.; Amberger, A.: "Nitrogen and Oxygen Isotopes as Indicators for Nitrification and Denitrification″. In: Progress in Hydrogeochemistry (Hrsg. Matthess, G.; Frimmel, F. H.; Hirsch, P.; Schulz, H. D.; Usdowski, E.), *Springer-Verlag*, **1992**, S. 212-219

[235] Schmidt, H. L.; Werner, R. A.; Rossmann, A.: "O-18 pattern and biosynthesis of natural plant products". *Phytochemistry,* **2001,** 58 (1), S. 9-32

[236] Schmidt, H. L.; Winkler, F. J.: "Einige Ursachen der Variationsbreite von $\delta^{13}C$-Werten bei C_3- und C_4-Pflanzen". *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft,* **1979,** 92, S. 185-191

[237] Schmidt, H. L.; Winkler, F. J.; Latzko, E.; Wirth, E.: "Kinetic-C-13 Isotope Effects in Photosynthetic Carboxylation Reactions and Delta-C-13-Values of Plant Material". *Israel Journal of Chemistry,* **1978,** 17 (3), S. 223-224

[238] Schmidt, O.; Quilter, J. M.; Bahar, B.; Moloney, A. P.; Scrimgeour, C. M.; Begley, I. S.; Monahan, F. J.: "Inferring the origin and dietary history of beef from C, N and S stable isotope ratio analysis". *Food Chemistry,* **2005,** 91 (3), S. 545-549

[239] Schumacher, E.: "Vergleich von mehr als zwei Parametern". *Saphir-Verlag,* **2003**

[240] Schütze, M.: "Ein neues Verfahren zur direkten Sauerstoffbestimmung in organischen Substanzen". *Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie,* **1939,** 118, S. 241-244

[241] Schwartz, R. S.; Hecking, L. T.: "Determination of Geographic Origin of Agricultural Products by Multivariate-Analysis of Trace-Element Composition". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry,* **1991,** 6 (8), S. 637-642

[242] Shearer, G.; Kohl, D. H.: "N_2-Fixation in Field Settings: Estimations Based on Natural ^{15}N Abundance". *Australian Journal of Plant Physiology,* **1986,** 13, S. 699-756

[243] Shearer, G.; Legg, J. O.: "Variations in Natural Abundance of N-15 of Wheat Plants in Relation to Fertilizer Nitrogen Applications". *Soil Science Society of America Journal,* **1975,** 39 (5), S. 896-901

[244] Shearer, G. B.; Kohl, D. H.; Commoner, B.: "Precision of Determinations of Natural Abundance of Nitrogen-15 in Soils, Fertilizers, and Shelf Chemicals". *Soil Science,* **1974,** 118 (5), S. 308-316

[245] Simpkins, W. A.; Patel, G.; Collins, P.; Harrison, M.; Goldberg, D.: "Oxygen isotope ratios of juice water in Australian oranges and concentrates". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1999,** 47 (7), S. 2606-2612

[246] Smith, B. N.; Epstein, S.: "Two categories of $^{13}C/^{12}C$ ratios for higher plants". *Plant Physiology,* **1971,** 47, S. 380-384

[247] Smith, B. N.; Oliver, J.; Mcmillan, C.: "Influence of Carbon Source, Oxygen Concentration, Light-Intensity, and Temperature on C-13/C-12 Ratios in Plant-Tissues". *Botanical Gazette,* **1976,** 137 (2), S. 99-104

[248] Souci, S. W.; Fachmann, W.; Kraut, H.: "Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen". *CRC Press, medpharm Scientific Publishers,* **2000**

[249] Spangenberg, J. E.; Macko, S. A.; Hunziker, J.: "Characterization of olive oil by carbon isotope analysis of individual fatty acids: Implications for authentication". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1998,** 46 (10), S. 4179-4184

[250] Spangenberg, J. E.; Ogrinc, N.: "Authentication of vegetable oils by bulk and molecular carbon isotope analyses with emphasis on olive oil and pumpkin seed oil". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2001,** 49 (3), S. 1534-1540

[251] SPSS GmbH Software: "SPSS Base 9.0 Benutzerhandbuch". *SPSS Inc.,* **1999**

[252] Stadt Hamburg - Publikationen, *http://fhh.hamburg.de/stadt/Aktuell/behoerden/wissenschaft-gesundheit/hygiene-umwelt/publikationen/jahresbericht/jahresbericht-2003-b-pdf,property=source.pdf*, letzter Aufruf der Website: **4.5.2005**

[253] Sternberg, L.: "Oxygen and Hydrogen Isotope Ratios in Plant Cellulose: Mechanisms and Applications". In: Stable Isotopes in Ecological Research (Hrsg. Rundel, PW.; Ehleringer, J. R.; Nagy, K. A.), *Springer-Verlag*, **1989**, S. 124-141

[254] Sternberg, L.; Deniro, M. J.; Keeley, J. E.: "Hydrogen, Oxygen, and Carbon Isotope Ratios of Cellulose from Submerged Aquatic Crassulacean Acid Metabolism and Non-Crassulacean Acid Metabolism Plants". *Plant Physiology,* **1984,** 76 (1), S. 68-70

[255] Sternberg, L. D. L.; Deniro, M. J.; Savidge, R. A.: "Oxygen Isotope Exchange Between Metabolites and Water During Biochemical Reactions Leading to Cellulose Synthesis". *Plant Physiology,* **1986,** 82 (2), S. 423-427

[256] Sumpf, D.; Moll, E.: "Schätzen eines Parameters und Vergleich von bis zu zwei Parametern". *Saphir-Verlag,* **2003**

[257] Tabachnick, B. G.; Fidell, L. S.: "Using Multivariate Statistics". *Harper & Row,* **1989**

[258] Talaie, A.: "Pistachio Production and Development in Iran". *The Clipper - The Journal for the International Trade in Processed Food, Dried Fruit and Nuts,* **1998,** 3, S. 24-30

[259] Taylor, J. W.; Chen, I. J.: "Variables in Oxygen-18 Isotopic Analysis by Mass Spectrometry". *Analytical Chemistry,* **1970,** 42 (2), S. 224

[260] Tcherkez, G.; Farquhar, G.; Badeck, F.; Ghashghaie, J.: "Theoretical considerations about carbon isotope distribution in glucose of C-3 plants". *Functional Plant Biology,* **2004,** 31 (9), S. 857-877

[261] The United Nations Statistics Division, *http://www.unstats.un.org*, letzter Aufruf der Website: **23.12.2004**

[262] ThermoQuest Finnigan: "ConFlo II Interface". *Operating Manual,* **2000**

[263] ThermoQuest Finnigan: "TC/EA - High Temperature Conversion / Elemental Analyzer". *Operating Manual,* **1999**

[264] Thompson, M.; Wood, R.: "International Harmonized Protocol for Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories". *Journal of AOAC International,* **1993,** 76 (4), S. 926-940

[265] Trader Joe's Company, *http://www.traderjoes.com/products/index.asp*, letzter Aufruf der Website: **11.5.2006**

[266] Troughton, J. H.; Card, K. A.: "Temperature Effects on Carbon-Isotope Ratio of C3, C4 and Crassulacean-Acid-Metabolism (Cam) Plants". *Planta,* **1975,** 123 (2), S. 185-190

[267] Unterzaucher, J.: "The Direct Micro-Determination of Oxygen in Organic Substances". *Analyst,* **1952,** 77 (920), S. 584

[268] Virginia, R. A.; Delwiche, C. C.: "Natural N-15 Abundance of Presumed N-2-Fixing and Non-N-2-Fixing Plants from Selected Ecosystems". *Oecologia,* **1982,** 54 (3), S. 317-325

[269] Vitoria, L.; Otero, N.; Soler, A.; Canals, A.: "Fertilizer characterization: Isotopic data (N, S, O, C, and Sr)". *Environmental Science & Technology,* **2004,** 38 (12), S. 3254-3262

[270] VO (EG) Nr.223/2003 zur Änderung der VO (EWG) Nr.2091/92: "EWG-Verordnung über den ökologischen Landbau / die biologische Landwirtschaft und die entsprechende Kennzeichnung der landwirtschaftlichen Erzeugnisse und Lebensmittel (Öko-VO)″. **1991**

[271] VO(EG) Nr.440/2003 zur Änderung der VO(EWG) Nr.2676/90: "Anhang II: 45. Bestimmung des Isotopenverhältnisses $^{13}C/^{12}C$ durch Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IR-MS) von Weinethanol oder Ethanol aus der Vergärung von Traubenmost, konzentriertem Traubenmost und rektifiziertem Traubenmostkonzentrat″. **2003**

[272] VO(EG) Nr.822/97 zur Änderung der VO(EWG) Nr.2676/90: "Annex: 43. Determination of the isotopic ratio $^{18}O/^{16}O$ of the water content in wines″. **1997**

[273] Wagner and B.: "Untersuchungen zur Nutzung des $\delta^{15}N$-Werte verschiedenenr Stickstoffquellen zur Aufklärung von Stickstoffflüssen in Winterweizenbeständen (Disserta-tion)". *Technische Universität München,* **1997**

[274] Weber, D.; Kexel, H.; Schmidt, H. L.: "C-13-pattern of natural glycerol: Origin and practical importance". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1997,** 45 (6), S. 2042-2046

[275] Weber, D.; Roßmann, A.; Schwarz, S.; Schmidt, H. L.: "Correlations of carbon isotope ratios of wine ingredients for the improved detection of adulterations .1. Organic acids and ethanol". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1997,** 205 (2), S. 158-164

[276] Weckerle, B.; Richling, E.; Heinrich, S.; Schreier, P.: "Origin assessment of green coffee (*Coffea arabica*) by multi-element stable isotope analysis of caffeine". *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* **2002,** 374 (5), S. 886-890

[277] Weckerle, B.; Richling, E.; Schreier, P.: "Authenticity assessment of guarana products (*Paullinia cupana*) by caffeine isotope analysis". *Deutsche Lebensmittel-Rundschau,* **2002,** 98 (4), S. 122-124

[278] Weilacher, T.; Gleixner, G.; Schmidt, H. L.: "Carbon isotope pattern in purine alkaloids a key to isotope discriminations in C-1 compounds". *Phytochemistry,* **1996,** 41 (4), S. 1073-1077

[279] Weinert, B.: "Zur Authentizitätsbewertung von Tee - Isotopenmassenspektrometrische und enantioselektive Verfahren (Dissertation)". *Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main,* **1998**

[280] Weinert, B.; Ulrich, M.; Mosandl, A.: "GC-IRMS analysis of black Ceylon, Assam and Darjeeling teas". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1999,** 208 (4), S. 277-281

[281] Werner, R. A.: "Entwicklung neuer Verfahren für die on-line $^{18}O/^{16}O$- und $^{2}H/^{1}H$-Isotopenverhältnismessung und ihre Anwendung zur Authentizitäts- und Herkunftsbestimmung bei Naturstoffen (Dissertation)". *Technische Universität München,* **1998**

[282] Werner, R. A.: "The Online $^{18}O/^{16}O$ Analysis: Development and Application". *Isotopes in Environmental and Health Studies,* **2003,** 39 (2), S. 85-104

[283] Werner, R. A.; Brand, W. A.: "Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis". *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* **2001,** 15 (7), S. 501-519

[284] Werner, R. A.; Kornexl, B. E.; Rossmann, A.; Schmidt, H. L.: "On-line determination of delta O-18 values of organic substances". *Analytica Chimica Acta,* **1996,** 319 (1-2), S. 159-164

[285] Werner, R. A.; Schmidt, H. L.: "The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds". *Phytochemistry,* **2002,** 61, S. 465-484

[286] WetterOnline Meteorologische Dienstleistungen GmbH, *http://www.wetteronline.de*, letzter Aufruf der Website: **11.5.2006**

[287] Whelan, T.; Sackett, W. M.; Benedict, C. R.: "Carbon Isotope Discrimination in A Plant Possessing C4 Dicarboxylic Acid Pathway". *Biochemical and Biophysical Research Communications,* **1970,** 41 (5), S. 1205

[288] White, J. W.: "Internal Standard Stable Carbon Isotope Ratio Method for Determination of C-4 Plant Sugars in Honey - Collaborative Study, and Evaluation of Improved Protein Preparation Procedure". *Journal of AOAC International,* **1992,** 75 (3), S. 543-548

[289] White, J. W.; Doner, L. W.: "C-13-C-12 Ratio in Honey". *Journal of Apicultural Research,* **1978,** 17 (2), S. 94-99

[290] White, J. W.; Doner, L. W.: "Mass-Spectrometric Detection of High-Fructose Corn Sirup in Honey by Use of C-13-C-12-Ratio - Collaborative Study". *Journal of the Association of Official Analytical Chemists,* **1978,** 61 (3), S. 746-750

[291] White, J. W.; Winters, K.: "Honey Protein As Internal Standard for Stable Carbon Isotope Ratio Detection of Adulteration of Honey". *Journal of the Association of Official Analytical Chemists,* **1989,** 72 (6), S. 907-911

[292] White, J. W.; Winters, K.; Martin, P.; Rossmann, A.: "Stable carbon isotope ratio analysis of honey: Validation of internal standard procedure for worldwide application". *Journal of AOAC International,* **1998,** 81 (3), S. 610-619

[293] Winkler, F. J.: "Application of Natural Abundance Stable Isotope Mass Spectrometry in Food Control″. In: Chromatography and Mass Spectrometry in Nutrition Science and Food Safety (Hrsg. Frigerio, A.; Milon, H.), *Elsevier Science Publishers*, **1984**, S. 173-190

[294] Winkler, F. J.; Schmidt, H. L.: "Scope of the Application of C-13 Isotope Mass-Spectrometry in Food Analysis". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung,* **1980,** 171 (2), S. 85-94

[295] Woodbury, S. E.; Evershed, R. P.; Rossell, J. B.; Griffith, R. E.; Farnell, P.: "Detection of Vegetable Oil Adulteration Using Gas-Chromatography Combustion Isotope Ratio Mass-Spectrometry". *Analytical Chemistry,* **1995,** 67 (15), S. 2685-2690

[296] Yeh, H. W.; Epstein, S.: "Hydrogen and Carbon Isotopes of Petroleum and Related Organic-Matter". *Geochimica et Cosmochimica Acta,* **1981,** 45 (5), S. 753-762

[297] Yoneyama, T.; Kamachi, K.; Yamaya, T.; Mae, T.: "Fractionation of Nitrogen Isotopes by Glutamine-Synthetase Isolated from Spinach Leaves". *Plant and Cell Physiology,* **1993,** 34 (3), S. 489-491

[298] Yoneyama, T.; Kaneko, A.: "Variations in the Natural Abundance of N-15 in Nitrogenous Fractions of Komatsuna Plants Supplied with Nitrate". *Plant and Cell Physiology,* **1989,** 30 (7), S. 957-962

[299] Yoneyama, T.; Kouno, K.; Yazaki, J.: "Variation of natural ^{15}N abundance of crops and soils in Japan with special reference to the effcts of soil conditions and fertilizer application". *Soil Science and Plant Nutrition,* **1990,** 36, S. 667-675

[300] Yunianta; Zhang, B. L.; Lees, M.; Martin, G. J.: "Stable-Isotope Fractionation in Fruit Juice Concentrates - Application to the Authentication of Grape and Orange Products". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **1995,** 43 (9), S. 2411-2417

[301] Ziegler, H.; Stichler, W.; Maurizio, A.; Vorwohl, G.: "Use of Stable Isotopes for Characterization of Honeys, Their Origin and Adulteration". *Apidologie,* **1977,** 8 (4), S. 337-347

[302] Zur, K.: "Authentizitätsprüfung von Pistazien mittels ^{1}H-NMR und ^{13}C-NMR Spektroskopie und multivariater Statistik (Diplomarbeit)". *Technische Universität Berlin,* **2004**

Anhang

Anhang I: Formelverzeichnis

Berechnung des δ-Werts

Allgemeine Formel:

$$\delta^{\text{Probe}}_{\text{int. Bezugsgröße}} = \left[\frac{(I_{\text{schweres Isotop}} / I_{\text{Hauptisotop}})_{\text{Probe}}}{(I_{\text{schweres Isotop}} / I_{\text{Hauptisotop}})_{\text{int. Bezugsgröße}}} - 1 \right] \cdot 1000$$

mit: $\delta^{\text{Probe}}_{\text{int. Bezugsgröße}}$ = delta-Wert der Probe in [‰]; Abweichung des Isotopenverhältnisses der Probe zur internationalen Bezugsgröße

$I_{\text{schweres Isotop}}/I_{\text{Hauptisotop}}$ = Verhältnis der Ionenströme

Bestimmung des δ-Werts einer Probe mittels Ein-Punkt-Kalibrierung:

Die Probe und der jeweilige Standard (z.B. Referenzmaterial, Arbeitsstandard) werden gegen das Referenzgas (Ref.gas) vermessen und somit ihre δ-Werte gegen dieses Referenzgas ermittelt. Der δ-Wert des Standards gegenüber der internationalen Bezugsgröße ist bekannt. Für die Berechnung des relativen Isotopenverhältnisses der Probe gegen die internationale Bezugsgröße gelten dann nach Umstellen der allgemeinen Gleichung (s.o.) folgende Relationen:

$$\delta^{\text{Probe}}_{\text{int. Bezugsgröße}} = \delta^{\text{Probe}}_{\text{Ref.gas}} + \delta^{\text{Ref.gas}}_{\text{int. Bezugsgröße}} + \frac{\delta^{\text{Probe}}_{\text{Ref.gas}} \cdot \delta^{\text{Ref.gas}}_{\text{int. Bezugsgröße}}}{1000}$$

$$\delta^{\text{Ref.gas}}_{\text{int. Bezugsgröße}} = \frac{\delta^{\text{Std.}}_{\text{int. Bezugsgröße}} - \delta^{\text{Std.}}_{\text{Ref.gas}}}{1 + \frac{\delta^{\text{Std}}_{\text{Ref.gas}}}{1000}}$$

mit:
- $\delta^{\text{Probe}}_{\text{int. Bezugsgröße}}$ = δ-Wert der Probe (gesuchte Größe)
- $\delta^{\text{Probe}}_{\text{Ref.gas}}$ = δ-Wert der Probe gegenüber dem Referenzgas (Messwert)
- $\delta^{\text{Ref.gas}}_{\text{int. Bezugsgröße}}$ = δ-Wert des Referenzgases gegenüber dem Standard (unbekannt)
- $\delta^{\text{Std.}}_{\text{Ref.gas}}$ = δ-Wert des Standards gegenüber dem Referenzgas (Messwert)
- $\delta^{\text{Std.}}_{\text{int. Bezugsgröße}}$ = δ-Wert des Standards gegenüber der int. Bezugsgröße (bekannt)

Kalibrierung der EA-Arbeitsstandards mittels Ein-Punkt-Kalibrierung:

Die Kalibrierung des Acetanilids als Arbeitsstandard für die ^{13}C- und ^{15}N-Messung erfolgte nach obigen Formeln, wobei das Acetanilid wie eine Probe behandelt wurde und das IAEA-Referenzmaterial als Standard diente.

Kalibrierung des TC/EA-Arbeitsstandards mittels Normierung:

Zur Ermittlung des Sauerstoffisotopenverhältnisses des Arbeitsstandards wird dessen δ-Wert nach obigen Formeln mittels eines IAEA-Referenzmaterials berechnet und durch einen Korrekturfaktor F normiert. Dieser wird mit Hilfe von einem zweiten, mitgemessenen Standard bekannten δ-Werts ermittelt. Dies ist nötig, da beim TC/EA eine Linearität über weite δ-Bereiche nicht gegeben ist und die verfügbaren Standards für die Kalibrierung (SMOW-Wasser und Wasser-Arbeitstandard der Gasbench) ca. 20‰ unter der zu kalibrierenden Cellulose lagen.

$$\delta^{\text{Arbeitsstd.}}_{\text{int. Bezugsgröße}}(\text{normiert}) = F \cdot \delta^{\text{Arbeitsstd.}}_{\text{int. Bezugsgröße}}$$

und

$$F = \frac{\delta^{\text{Std.}}_{\text{int. Bezugsgröße}}(\text{theoretisch})}{\delta^{\text{Std.}}_{\text{int. Bezugsgröße}}(\text{gemessen})}$$

mit: F = Korrekturfaktor

$\delta^{\text{Std.}}_{\text{int. Bezugsgröße}} = \delta^{\text{Arbeitsstd. Wasser}}_{\text{VSMOW}} = 14{,}53$ ‰

Arbeitsstd. Wasser: ausreichend geprüfter Arbeitsstandard aus dem IRMS-Labor

$\delta^{\text{IAEA-Std.}}_{\text{int. Bezugsgröße}} = \delta^{\text{SMOW-Wasser}}_{\text{VSMOW}} = 0{,}00$ ‰

Statistische Grundformeln

Mittelwert:[38]

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum x$$

mit: n = Anzahl der Messwerte
x = Messwert

Standardabweichung einer Mehrfachbestimmung:[38,140]

$$s_{einzel} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum (x - \bar{x}_{einzel})^2}$$

mit: x_{einzel} = Mittelwert

Standardabweichung innerhalb der Serien (Wiederholstandardabweichung s_r):[38,140]

$$s_{innerhalb} = \sqrt{\frac{1}{\sum (n-1)} \cdot \sum ((n-1) \cdot s^2_{einzel})} = s_r$$

Standardabweichung zwischen den Serien:[38,140]

$$s_{zwischen} = \sqrt{\frac{\frac{1}{N-1} \cdot \sum n \cdot (\bar{x}_{einzel} - \bar{\bar{X}}_{gesamt})^2 - s^2_{innerhalb}}{\bar{n}_{zwischen}}} \qquad \bar{n}_{zwischen} = \frac{1}{N} \sum n$$

mit: N = Anzahl der Serien
X_{gesamt} = Mittelwert der Mittelwerte x_{einzel}

Gesamtstandardabweichung (Vergleichsstandardabweichung s_R):[38,140]

$$s_{gesamt} = s_{innerhalb} + s_{zwischen} = s_R$$

Wiederholbarkeit r:[38,141]

$r = 2{,}8 \times s_r$

Vergleichbarkeit R:[38,141]

$R = 2{,}8 \times s_R$

Kritische Grenze CD (**c**ritical **d**ifference):[38,141]
Werden in einem Labor Mittelwerte(y_1, y_2) aus n_1 bzw. n_2 Mehrfachmessungen unter Wiederholbedingungen gemessen, gilt für die maximale Differenz zwischen den beiden Mittelwerten nicht mehr r als Grenzwert, sondern die kritische Grenze CD auf dem 95%-Wahrscheinlichkeitsniveau:[107]

$$CD_{|y_1 - y_2|} = r \cdot \sqrt{\frac{1}{2n_1} + \frac{1}{2n_2}}$$

Korrelationskoeffizient nach Pearson:[37]

$$\varsigma = \frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{(n-1) \cdot s_x \cdot s_y}$$

mit: ς = Korrelationskoeffizient
x_i, y_i = Werte der Variablen
$\bar{x}, \bar{y}$ = Mittelwerte der Variablen
s_x, s_y = Standardabweichungen der Variablen
n = Anzahl der Wertepaare

Z-score:[264]

$z = (x-X)/\sigma$

mit: z = Z-score
x = Messwert
X = wahrer Wert / Zielwert
σ = Ziel-Standardabweichung

Statistische Tests

Sollwert-*t*-Test:[166]

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s}\sqrt{n}$$

mit: t = Prüfgröße
$\bar{x}$ = Mittelwert
μ = Sollwert: z.B. zertifiziertes IAEA-Referenzmaterial
$|\bar{x} - \mu|$ = Messunsicherheit (systematischer Fehler)
s = Standardabweichung
n = Anzahl der Wiederholmessungen
$t_{Tabelle}$ = Wert aus der *t*-Tabelle (P = 95%, f = n-1)

Doerffel-Test:[166]

$$|\bar{x} - \mu| < \frac{1{,}5 \cdot s}{\sqrt{n}}$$

mit: $\bar{x}$ = Mittelwert
μ = Sollwert: zertifiziertes IAEA-Referenzmaterial
$|\bar{x} - \mu|$ = Messunsicherheit (systematischer Fehler)
s = Standardabweichung
n = Anzahl der Wiederholmessungen

F-Test:[64]

$$\frac{s^2}{s_r^2} < \frac{\chi^2(P,f)}{f}$$

mit: s^2 = Standardabweichung der Messung
s_r^2 = Wiederholstandardabweichung der Methode
f = Freiheitsgrade (= n-1)
$\chi^2(P,f)$ = Wert aus der χ^2-Tabelle (P = 95%, f = n-1)

Ausreißertest nach Grubbs:[38,166]

$$Q = \frac{\bar{x} - x^*}{s}$$

mit: Q = Prüfgröße (P = 0,95)
$\bar{x}$ = Mittelwert
x^* = ausreißerverdächtiger Wert

Ausreißertest nach Nalimov:[122]

$$r = \left| \frac{x_A - \bar{x}_{mA}}{s_{mA}} \right| \cdot \sqrt{\frac{n}{n-1}}$$

mit: r = Prüfgröße (P = 0,99)
x_A = ausreißerverdächtiger Wert
$\bar{x}_{mA}$ = Mittelwert der gesamten Messreihe
s_{mA} = Standardabweichung der gesamten Messreihe (inklusive x_A)
n = Anzahl der Messwerte

Anhang II: Weiterführende Erläuterungen zur mulitvariaten Statistik

Einteilung multivariater Analysenmethoden

Aufgrund der Vielzahl multivariater Analysenmethoden, werden sie oft nach ihren Fragestellungen in primär „strukturen-entdeckende Verfahren“ und primär „strukturen-prüfende Verfahren“ eingeteilt. Diese beiden Kriterien werden folgendermaßen verstanden:

1. *Strukturen-entdeckende Verfahren* sind multivariate Verfahren, deren primäres Ziel die Entdeckung von Zusammenhängen zwischen Variablen oder zwischen Objekten ist. Der Anwender besitzt zu Beginn der Analyse noch keine Vorstellungen darüber, welche Beziehungszusammenhänge in einem Datensatz existieren. Derartige Verfahren sind z.B. die Faktorenanalyse oder die Clusteranalyse.

2. *Strukturen-prüfende Verfahren* sind multivariate Verfahren, deren primäres Ziel in der Überprüfung von Zusammenhängen zwischen Variablen liegt. Der Anwender besitzt eine auf sachlogischen oder theoretischen Überlegungen basierende Vorstellung über die Kausalzusammenhänge zwischen den Variablen und möchte diese mit Hilfe multivariater Verfahren überprüfen, d.h. er weiß oder vermutet, welche der Variablen auf andere Variablen einwirken. Er muss also in der Regel die von ihm betrachteten Variablen in abhängige und unabhängige Variablen einteilen können. Verfahren, die diesem Bereich der multivariaten Datenanalyse zugeordnet werden können, sind z.B. die Regressions-, Diskriminanz- oder Varianzanalyse.[13]

Durchführung einer Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse ist eine multivariate Analysenmethode und dient zur Entdeckung der Strukturen eines Datensatzes. Sie wird üblicher Weise in folgenden vier Schritten durchgeführt:

1. Berechnung der Korrelationsmatrizen

Zur Ermittlung der Faktoren ist es erforderlich, die Zusammenhänge zwischen den Ausgangsvariablen messbar zu machen. Als methodisches Hilfsmittel wird hierzu die Korrelationsanalyse herangezogen. Durch die Berechnung der Korrelationen zwischen den beteiligten Variablen mit Hilfe der Pearson-Korrelationskoeffizienten lässt sich erkennen, ob Zusammenhänge zwischen Paaren von Variablen bestehen (Korrelationsmatrix). Besteht ein solcher Zusammenhang, können diese Variablen als voneinander abhängig und damit als „bündelungsfähig" angesehen werden. An der so erstellten Korrelationsmatrix kann dann auch abgelesen werden, welche Variablen möglicherweise unberücksichtigt bleiben sollten, weil sie mit den übrigen Variablen nur sehr geringe Korrelationen aufweisen.[13,37]

2. Extraktion der Faktoren

Die Hauptkomponentenanalyse ist das gebräuchlichste Verfahren zur Extraktion der Faktoren. Wie bei anderen Verfahren auch (z.B. Maximum-Likelihood-Methode, kanonische Faktorenanalyse, Hauptachsen-Faktorenanalyse), wird zu diesem Zweck eine Ladungsmatrix konstruiert, welche die Korrelationen der beobachteten Merkmale mit den künstlichen Faktoren enthält. Im Speziellen geht die Hauptkomponentenanalyse davon aus, dass die Varianz einer Ausgangsvariablen vollständig durch die Extraktion von Faktoren erklärt werden kann, d.h. sie unterstellt, dass keine Einzelrestvarianz (= spezifische Varianz + Messfehlervarianz) in den Variablen existiert. Es werden dazu lineare Kombinationen der Variablen gebildet. Das Ziel der Hauptkomponentenanalyse liegt in der möglichst umfassenden Reproduktion der Datenstruktur durch möglichst wenige Faktoren.[13,36,37,121,129]

3. Rotation

Die gefundenen Faktoren sind häufig zunächst schwierig zu interpretieren. Zur Erleichterung macht man sich den Umstand zu nutze, dass die Faktoren Kunstgebilde sind, die verzerrungsfrei unterschiedlichen Transformationen unterworfen werden können. Dadurch gelingt es häufig, die Verbindung zu den Beobachtungsvariablen deutlicher aufzuzeigen und damit die Interpretation der Faktoren zu erleichtern. Dieser Schritt wird als Rotation bezeichnet, da hierbei (wenn man sich die Faktoren in einem Koordinatenkreuz angeordnet vorstellt) die Koordinatenachsen in gewisser Weise gedreht werden. Es wird zwischen orthogonalen/rechtwinkligen (z.B. Variamx-,

Quartimax-Methode) und schiefwinkligen (z.B. direkte Oblimin-, Promax-Rotation) Rotationsverfahren unterschieden.[36] Speziell bei der Hauptkomponentenanalyse wird meistens von einer Rotation abgesehen, da in der Regel nicht die Konstruktion interpretierbarer Komponenten im Vordergrund steht, sondern die Reduzierung komplizierter Datenbeziehungen auf eine einfache Form.[121]

4. Berechnung der Faktorwerte:

Für eine Vielzahl von Fragestellungen ist es von großem Interesse, nicht nur die Variablen auf eine geringere Anzahl von Faktoren zu reduzieren, sondern danach zu erfahren, welche Werte die Objekte hinsichtlich der extrahierten Faktoren annehmen, um sie z.B. als Variablen in weiteren Untersuchungen zu verwenden oder grafisch darstellen zu können. Im Gegensatz zu anderen Extraktionsverfahren lassen sich die Faktorwerte im Falle der Hauptkomponentenanalyse recht einfach anhand einer linearen Gleichung berechnen.[13,36]

Nähere Erläuterungen zur Diskriminanzanalyse

Die Diskriminanzanalyse ist eine der klassischen Techniken der mulitvariaten Datenanalyse und dient zur Trennung gegebener Gruppen und zur Einordnung neuer, unbekannter Objekte. Dazu wird zunächst in der sog. Lernphase das Klassifikationsmodell aufgestellt, wobei von den Variablenmustern einer bestimmten Menge von gruppierten (Lern-) Objekten ausgegangen wird. Hinter dem Klassifikationsmodell verbergen sich bestimmte Rechengrößen (Vektoren), die später die Klassifikation neuer Objekte erlauben.[129]

Im vorliegenden Fall der Zuordnung von Pistazien nach ihrer Herkunft liegen drei Gruppen (Iran, USA, Türkei) vor, d.h. es werden zwei Diskriminanzfunktionen gebildet. Dies ist sehr vorteilhaft, da sich die Ergebnisse dann in einem zweidimensionalen Streudiagramm grafisch darstellen und dadurch leichter interpretieren lassen. Es muss bei der Diskriminanzanalyse allerdings darauf geachtet werden, dass die Anzahl der Diskriminanzfunktionen nicht größer sein darf als die Anzahl der Merkmalsvariablen, d.h. es dürfen nicht mehr Gruppen als gemessene Variablen vorliegen.[13,36,37]

Die Gruppengröße darf auch nicht zu klein gewählt werden, da sonst der sog. „Lasso-Effekt“ auftritt. Die Diskriminanzanalyse hat als strukturen-prüfendes Verfahren nämlich den großen Nachteil, dass prinzipiell alle Proben in eine der vorgegebenen Gruppen eingeordnet werden müssen. Daher werden auch Ausreißer und Proben mit einer Gruppenzugehörigkeit, die nicht im Klassifikationsmodell enthalten ist, nicht erkannt. Aufgrund dessen muss auf die Auswahl der Daten für den Lerndatensatz die größte Sorgfalt gelegt werden und Ausreißer sind vorher über

angemessene Tests zu eliminieren. Die Diskriminanzanalyse liefert auch schlechte bzw. instabile Ergebnisse, wenn miteinander hoch korrelierende Variablen in die Berechnung des Modells einbezogen werden.[13,150,257]

Auch die Anzahl der zur Erstellung des Diskriminanzmodells verwendeten Variablen ist nicht beliebig. Die Einbeziehung zahlreicher Variablen in das Klassifikationsmodell erhöht nur die Gefahr, dass unnötige und eigentlich nichts zur Separation der Gruppen beitragende Variablen in das Modell einbezogen werden, die die zu erwartende Fehlerrate sogar negativ beeinflussen können. Die meisten Statistik-Programme bieten daher die *schrittweise Diskriminanzanalyse* an, wobei der Algorithmus automatisch nur diejenigen Variablen auswählt, die signifikant zur Verbesserung der Diskriminanzanalyse beitragen und zu einer minimalen Fehlerrate führen. Aus der Rangfolge, mit der die Variablen in die Diskriminanzfunktion(en) aufgenommen werden, lässt sich deren relative Wichtigkeit erkennen.[13,36]

Das Endziel der Diskriminanzanalyse ist die Klassifizierung neuer, unbekannter Proben anhand des mit dem Lerndatensatz erstellten Modells. Als Zuordnungsregel wird die Bayessche Klassifikation verwendet, die eine Normalverteilung der Werte voraussetzt. Ein Element wird danach in diejenige Gruppe eingeordnet, der es am nächsten liegt, d.h. bezüglich derer die Distanz zwischen Element und Gruppenmittel (Zentroid) minimal wird. Üblicherweise werden die quadrierten Mahalanobis-Distanzen verwendet, daher spricht man auch von *quadratischer* Diskriminanzfunktion (QDF). Daraus ergeben sich daraus gekrümmte Trennflächen zwischen den Gruppen.
Liegen gleiche Streuungen in den Gruppen vor, d.h. sind die Kovarianzmatrizen der Gruppen annähernd gleich (Prüfung mit dem Box´s M-Test), so minimiert sich die Bayessche Entscheidungsregel von quadratischen zu nur noch linearen Abhängigkeiten der Testobjekte. In diesem Fall liegt dann nur noch eine *lineare* Diskriminanzfunktion (LDF) vor, bei der zwischen den Gruppen lineare Trennflächen bzw. -linien erscheinen. Dies hat den Vorteil einer einfachen und gut interpretierbaren grafische Darstellungsmöglichkeit der Ergebnisse, jedoch wird die Voraussetzung der Gleichheit der Kovarianzmatrizen in praktischen Anwendungen meist nie erfüllt. R.A. Fisher hat 1936 aus den linearen Diskriminanzfunktionen die nach ihm benannten „Klassifizierungsfunktionen“ entwickelt, die ein einfaches und praktisches Hilfsmittel zur Klassifizierung von unbekannten Proben direkt auf Basis der Merkmalswerte bilden, d.h. ohne die Verwendung von Diskriminanzfunktionen. Die Fisher´schen Klassifikationsfunktionen ähneln den Diskriminanzfunktionen, jedoch wird hier für jede Gruppe eine gesonderte Klassifizierungsfunktion F bestimmt:

$F_1 = b_{01} + b_{11}x_1 + ... + b_{n1}x_n$
$F_2 = b_{02} + b_{12}x_1 + ... + b_{n2}x_n$
...

Ein unbekanntes Element ist hierbei derjenigen Gruppe g zuzuordnen, für die der Funktionswert F_g maximal ist. Wenn die Koeffizienten der Fisher´schen Klassifizierungsfunktionen erst einmal mit einem Computerprogramm bestimmt sind, wird die Zuordnung neuer Fälle relativ einfach und ist sogar mit einem Taschenrechner möglich, was z.B. für die Anwendung in einem Labor bei Routineuntersuchungen sehr vorteilhaft sein kann.[13,56,129]

Die bloße Einordnung von Testobjekten in vorgegebene Klassen ist jedoch relativ wertlos, solange unbekannt ist, mit welcher Sicherheit bzw. Irrtumswahrscheinlichkeit die getroffenen Entscheidungen (Klassifikationsfehlerrate) behaftet sind. Das Problem hierbei ist, dass zur Erprobung des Erfolgs der Zuordnungsregel nur Objekte bekannter Herkunft, also keine echten Testobjekte (unbekannte Proben) herangezogen werden können. Alle Objekte bekannter Herkunft werden im Allgemeinen als Lernobjekte definiert, um das aufzustellende Klassifikationsmodell mit möglichst viel Eingangsinformation zu versorgen. Als Konsequenz müssen daher die Lernobjekte im Sinne von Pseudo-Testobjekten benutzt werden, um die Fehlerrate zu schätzen.[129] Hier stehen mehrere Methoden zur Verfügung, auf die in Kapitel 6.2.3 näher eingegangen wird. Wenn der Stichprobenumfang ausreichend groß ist, werden alle Methoden zur Schätzung der Fehlerrate dasselbe Ergebnis hervorbringen. Je kleiner der Stichprobenumfang ist, desto größer sind die Unterschiede zwischen den Schätzverfahren.[56]

Anhang III: Probenliste mit δ-Wert-Messergebnissen

authentisch iranische Pistazienproben Mittelwerte der δ-Messung nach Grubbs-Ausreißertest									
Probennr.	**Verarbeitung**	**$\delta^{13}C_{VPDB}$ Pistazie**	**$\delta^{15}N_{Air}$ Pistazie**	**$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Pistazie**	**$\delta^{13}C_{VPDB}$ Rückstand**	**$\delta^{15}N_{Air}$ Rückstand**	**$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Rückstand**	**$\delta^{13}C_{VPDB}$ Pistazienöl**	**$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Pistazienöl**
1	R, S	-26,36	10,00	36,44	-23,46	10,05	39,34	-28,28	38,79
2	R	-26,22	7,76	37,20	-23,65	7,76	41,13	-28,34	37,92
3	R	-27,07	10,58	36,43	-24,46	10,68	39,46	-28,94	37,11
4	R	-26,64	8,96	35,39	-24,31	9,02	40,09	-28,36	36,75
5	R	-27,03	7,91	37,57	-24,74	8,11	41,36	-28,72	38,35
6	R	-27,22	8,60	37,41	-24,73	8,72	40,32	-29,06	39,88
7	R	-27,35	8,78	38,18	-24,54	8,76	41,87	-29,22	**41,09**
8	R	-26,94	6,77	36,90	-24,18	6,64	40,28	-28,84	36,68
9	R	-26,46	8,47	36,42	-24,21	8,51	40,80	-28,14	38,06
10	R	-27,22	9,95	37,19	-24,55	7,82	41,28	-28,83	38,75
11	R	-27,15	6,73	37,35	-24,84	8,98	40,86	-29,04	38,63
12	R	-26,38	3,77	35,65	-23,86	4,03	39,12	-28,35	36,75
13	R	-26,52	4,26	35,72	-24,02	4,48	38,54	-28,32	36,68
14	G	-26,24	5,12	34,06	-23,68	5,28	38,85	-28,01	37,28
15	R	-26,91	5,57	38,41	-23,45	2,89	42,04	-28,50	38,65
16	R	-27,33	2,37	36,50	-24,35	2,50	39,27	-29,07	37,25
17	R	-26,50	4,21	36,38	-23,35	4,09	38,85	-28,08	37,06
18	R	-27,08	5,48	35,55	-24,11	5,64	38,54	-28,69	37,40
19	R	-27,37	5,67	35,77	-23,92	5,70	38,82	-28,82	37,62
20	R	-27,01	5,22	36,06	-24,00	5,50	38,68	-28,68	37,60
21	R	-26,74	4,16	34,36	-23,59	4,05	38,69	-28,31	35,18
22	R	**-28,19**	3,65	34,68	-24,87	3,78	38,67	-29,70	35,78
23	R	-26,36	3,31	38,37	-23,42	3,40	40,94	-28,15	40,38
24	R	-26,76	3,23	34,55	-23,72	3,36	38,29	-28,12	35,74
25	R	-27,39	4,31	34,95	-24,44	4,31	38,79	-29,31	35,89
26	R	-26,88	3,41	35,07	-23,82	3,63	38,34	-28,76	37,58
27	R	-27,60	9,47	36,14	-24,48	9,65	39,43	-29,86	37,49
28	R	-26,47	5,15	35,50	-23,54	5,24	38,93	-28,21	36,60
29	R	-28,03	8,49	38,78	-24,77	8,41	42,72	-29,84	40,15
30	R, S, Z	-27,68	3,17	36,08	-24,78	3,24	39,41	-29,43	36,13
31	G	-26,58	4,80	35,26	-24,11	4,79	38,18	-28,79	36,78
32	R, S	-26,70	4,22	37,13	-23,42	4,61	38,30	-28,21	36,75

R: geröstet **S**: gesalzen **G**: grün **Z**: Zitronensaft

fett gedruckte Werte: nachgewiesene Ausreißer nach Kapitel 5.3.1

authentisch US amerikanische Pistazienproben

Mittelwerte der δ-Messung nach Grubbs-Ausreißertest

Probennr.	Verarbeitung	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Pistazie	$\delta^{15}N_{Air}$ Pistazie	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Pistazie	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Rückstand	$\delta^{15}N_{Air}$ Rückstand	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Rückstand	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Pistazienöl	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Pistazienöl
33	R, S	-27,51	**-0,10**	29,53	-24,51	**-0,08**	32,27	-29,65	**29,59**
34	R	-26,88	**3,33**	**24,82**	-24,28	**3,33**	28,61	-29,02	25,06
35	R, S, O	-26,97	**2,10**	27,29	-24,57	1,87	31,00	-28,97	27,74
36	R	-27,53	1,85	27,02	-25,10	2,06	30,83	-29,65	26,53
37	R	-28,35	0,63	27,77	-25,76	0,71	31,14	-30,40	27,02
38	R, S	-27,39	1,33	27,93	-24,87	1,46	**32,54**	-29,54	27,01
39	R, S	-27,39	1,21	28,28	-25,11	1,23	29,44	-29,32	27,66
40	R, S	-27,70	1,35	28,07	-25,09	1,52	30,51	-29,56	27,92
41	R, S	-27,89	1,05	27,83	-24,89	1,10	29,17	-29,64	26,59
42	R, S	-27,57	1,23	28,34	-24,40	1,23	30,30	-29,18	27,84
43	R, S	-27,91	1,27	27,56	-24,95	1,28	29,27	-29,56	26,75
44	R, S	-27,95	1,40	27,75	-24,95	1,50	30,11	-29,54	26,93
45	R, S	-27,76	0,93	27,86	-25,08	1,04	30,29	-29,51	27,61
46	R, S	-27,73	0,90	27,72	-24,85	0,90	29,51	-29,25	27,18
47	R, S	-28,42	0,99	27,23	-25,53	1,26	30,37	-30,01	27,45
48	roh	-27,78	**2,22**	26,59	-25,23	2,17	29,03	-29,93	26,18
49	R	-28,04	1,79	27,57	-25,56	1,82	29,84	-30,16	26,68
50	R, S	-27,27	0,93	26,79	-24,89	0,94	28,75	-29,44	25,95
51	R, S, O	-27,53	1,61	26,39	-25,21	1,59	28,46	-29,67	25,97
52	R, S	-27,36	1,24	29,59	-24,86	1,33	30,21	-29,42	27,60
53	R, S	-27,88	1,39	27,36	-25,31	1,34	28,80	-29,89	25,91
54	R	-27,54	1,31	28,27	-25,32	1,32	29,22	-29,42	27,08
55	R	-27,52	1,28	27,18	-25,38	1,42	29,23	-29,58	26,48
56	R, S	-26,98	0,50	28,42	-25,02	0,37	30,03	-29,11	27,64
57	R, S	-28,40	1,08	27,02	-25,87	1,33	28,16	-30,41	25,92
58	roh	-27,84	1,03	27,77	-25,78	1,21	29,84	-29,79	27,55
59	R	-27,71	1,64	28,08	-25,32	1,04	29,51	-29,62	26,87
60	R, ½S	-27,66	1,30	28,24	-25,22	1,36	29,97	-29,81	27,53
61	R, S, B	-27,32	**5,27**	27,74	-25,46	**5,36**	29,47	-29,49	26,42
62	R, S	-28,22	0,74	27,40	-25,43	0,83	29,79	-30,28	26,50
63	R, S, O	-28,01	1,19	27,28	-24,74	1,06	30,40	-29,96	27,22
64	roh	-28,07	0,70	26,10	-25,14	0,68	29,16	-30,26	25,81
65	R	-27,27	1,11	28,90	-24,37	1,31	30,76	-29,26	27,70
66	R, ½S	-27,88	0,48	28,36	-24,93	0,65	30,91	-29,87	27,37
67	R, ½S	-28,16	0,99	28,51	-25,14	1,12	30,37	-30,10	27,48
68	R, S	-27,81	0,89	28,26	-25,36	0,93	30,90	-29,79	27,63
69	R, S, B	-27,28	**4,90**	**30,44**	-24,42	**5,03**	32,33	-29,11	**29,77**
70	R	-28,07	1,10	28,72	-24,67	1,12	30,28	-29,96	27,99

R: geröstet **S**: gesalzen **O**: ohne Schale **B**: biologischer Anbau

fett gedruckte Werte: nachgewiesene Ausreißer nach Kapitel 5.3.1

authentisch türkische Pistazienproben

Mittelwerte der δ-Messung nach Grubbs-Ausreißertest

Probennr.	Verarbeitung	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Pistazie	$\delta^{15}N_{Air}$ Pistazie	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Pistazie	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Rückstand	$\delta^{15}N_{Air}$ Rückstand	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Rückstand	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Pistazienöl	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Pistazienöl
71	R, S	-27,14	2,62	**35,09**	-24,57	**2,63**	36,43	-28,84	34,51
72	R, S, B	-26,16	0,01	31,90	-23,33	-0,03	35,18	-27,74	32,97
73	R, S	-26,37	0,64	29,65	-23,46	0,82	33,29	-27,98	31,80
74	R, S	-26,39	0,71	31,64	-23,43	0,82	34,35	-27,82	33,32
75	R, S	**-25,28**	-1,62	32,22	**-22,31**	-1,50	35,23	**-26,82**	33,38
76	R, S	-27,14	0,00	30,92	-23,87	-0,20	33,39	-28,51	31,79
77	R, S	-26,62	1,76	30,78	-23,72	1,70	33,03	-28,07	31,79
78	R, S	-26,93	-0,46	30,43	-23,87	-0,34	33,05	-28,37	32,59
79	R, S	-26,42	-0,49	30,11	-23,57	-0,36	33,44	-27,89	33,03
80	R, S	-27,27	-0,38	31,47	**-24,62**	-0,09	33,21	-28,68	32,26
81	R	-26,09	-0,14	31,43	-23,15	0,04	33,29	-27,69	32,73
82	R, S, O	-26,49	**4,30**	34,59	-23,44	**4,57**	**38,66**	-28,15	**36,47**
83	R, S	-26,01	-0,32	32,15	-23,33	-0,47	33,90	-27,63	33,22
84	R, S	-26,92	0,79	29,65	-24,38	0,64	31,70	-28,55	31,44
85	R	-26,58	0,47	30,44	-23,34	0,35	33,34	-28,03	32,14
86	R, S, O	-26,27	**4,49**	**35,17**	-23,59	**4,99**	**38,80**	-28,01	**36,20**
87	R, S	-26,92	0,95	30,90	-24,03	0,97	33,74	-28,57	31,77
88	R, S	-27,38	**5,28**	**36,77**	-24,27	**5,43**	**38,98**	-28,91	**38,05**
89	R, S	-26,79	0,19	31,72	-23,61	0,19	35,09	-28,13	33,79
90	R, S	-26,75	**3,23**	34,92	-23,77	**3,20**	**37,73**	-28,18	**36,34**
91	R, S	-26,21	-0,18	32,46	-23,20	-0,07	33,58	-27,79	33,17
92	R, S	-26,65	-0,19	31,53	-23,71	-0,08	32,79	-28,39	32,44
93	R, S	-26,23	1,53	29,92	-23,46	1,51	31,92	-27,81	31,12
94	R, S	-26,41	-1,16	32,45	-23,84	-0,86	34,07	-27,99	33,28
95	R, S	-26,78	0,88	30,94	-23,60	1,24	32,08	-28,32	31,62
96	R, S	-26,22	0,04	32,30	-23,47	0,13	33,63	-27,76	33,03
97	R, S	-26,82	1,21	30,36	-24,06	1,44	32,85	-28,24	31,39
98	R, S	-26,48	0,32	32,21	-23,58	0,59	34,42	-28,01	33,13
99	R, S	-26,80	1,48	29,37	-23,97	1,47	31,71	-28,30	30,50
100	R, S	-26,29	0,64	29,09	-23,22	0,57	31,32	-27,79	30,05
101	R, S	-26,25	0,71	31,41	-23,20	0,72	32,84	-27,85	31,62

R: geröstet **S**: gesalzen **O**: ohne Schale **B**: biologischer Anbau

fett gedruckte Werte: nachgewiesene Ausreißer nach Kapitel 5.3.1

Handelsproben mit Herkunftsdeklaration

Mittelwerte der δ-Messung nach Grubbs-Ausreißertest

Probennr.	Verarbeitung	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Pistazie	$\delta^{15}N_{Air}$ Pistazie	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Pistazie	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Rückstand	$\delta^{15}N_{Air}$ Rückstand	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Rückstand	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Pistazienöl	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Pistazienöl
Iran									
102	R, L, O	-25,82	5,85	36,04	-23,08	5,81	39,72	-27,71	36,01
103	R, S, L	-27,02	4,91	35,99	-23,54	4,89	39,23	-29,06	36,65
104	G	-26,05	3,38	34,48	-22,85	3,66	38,19	-27,76	37,31
105	R, L	-26,60	3,11	36,83	-23,82	2,98	38,70	-28,41	37,45
106	R, S	-26,39	2,16	36,30	-23,48	2,19	39,04	-28,12	37,10
107	R, S	-26,89	4,30	36,82	-23,95	4,40	39,37	-28,41	38,11
108	R, S	-26,34	6,92	37,21	-23,41	7,09	39,95	-28,07	39,76
USA									
109	R, S	-27,22	0,41	26,95	-24,21	0,47	29,58	-29,28	26,68
110	R, S	-26,54	3,70	35,37	-23,49	3,82	38,63	-28,36	38,29
111	R, S	-27,92	0,74	26,28	-25,19	0,58	28,85	-29,93	26,44
112	R, S	-27,16	1,64	27,87	-24,25	1,43	30,18	-29,23	27,74
113	R, S	-27,41	1,59	28,16	-24,47	1,58	30,96	-29,53	27,90
114	R, S	-27,42	0,96	26,23	-25,01	1,21	28,78	-29,51	26,12
115	R, S, L	-26,84	2,88	36,95	-24,07	3,05	39,12	-28,62	37,69
116	R, S, L	-27,69	1,81	27,87	-24,73	1,82	28,99	-29,47	26,95
117	R, S, L	-28,41	1,33	27,64	-25,67	1,65	29,78	-30,24	26,73
118	R, S	-27,76	0,97	28,10	-25,07	0,92	30,35	-29,83	27,48
119	R, S	-28,15	1,63	24,77	-25,36	1,67	27,39	-30,21	24,59
120	R, S	-27,56	1,47	26,55	-24,51	1,46	29,37	-29,59	26,16
121	R, S	-27,23	0,33	25,95	-24,35	0,31	28,40	-29,31	26,61
122	R, S	-27,22	1,39	26,26	-24,20	0,97	29,63	-29,20	29,35
123	R, S, L	-27,77	0,74	25,98	-24,52	0,78	27,63	-29,50	24,79
124	R, S	-26,41	3,60	35,62	-23,41	3,71	38,22	-27,94	40,78
125	R, S	-26,26	1,24	30,71	-22,90	1,36	34,27	-27,76	32,29
126	R, S	-27,08	7,11	36,04	-24,15	7,40	39,41	-28,84	36,97

R: geröstet **S**: gesalzen **G**: grün **L**: lose Ware **O**: ohne Schale

Handelsproben mit Herkunftsdeklaration (Forts.)

Mittelwerte der δ-Messung nach Grubbs-Ausreißertest

Probennr.	Verarbeitung	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Pistazie	$\delta^{15}N_{Air}$ Pistazie	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Pistazie	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Rückstand	$\delta^{15}N_{Air}$ Rückstand	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Rückstand	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Pistazienöl	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Pistazienöl
Griechenland									
127	R, S	-26,62	1,53	27,51	-24,22	1,58	29,72	-28,01	30,09
128	R, S	-26,56	2,55	28,66	-24,22	2,62	29,47	-28,01	31,33
129	R, S, L	-26,75	5,43	34,33	-23,67	5,77	37,40	-28,38	36,33
130	R, S	-26,29	1,56	31,76	-23,44	1,86	33,03	-27,78	32,32
131	R, S, L	-26,41	1,99	28,94	-23,51	2,08	30,91	-28,19	30,72
132	R, S, L	-26,71	6,11	35,80	-23,84	6,05	37,80	-28,47	37,46
Syrien									
133	R, S	-26,13	-1,18	34,21	-22,97	-1,07	36,48	-27,89	35,88
134	roh	-27,94	-0,23	29,43	-24,81	-0,30	33,28	-29,65	31,91
135	R, S	-28,67	0,03	30,29	-25,53	0,03	33,31	-30,31	32,29
Marokko									
136	R, S, L	-26,94	5,34	34,76	-24,21	5,41	39,48	-28,61	37,69
Usbekistan									
137	roh, L	-26,29	5,01	27,09	-24,08	5,21	29,84	-27,53	30,70
Italien									
138	G	-25,95	4,14	34,73	-23,85	4,48	39,04	-27,72	37,21

R: geröstet **S**: gesalzen **G**: grün **L**: lose Ware **O**: ohne Schale

Handelsproben ohne Herkunftsdeklaration

Mittelwerte der δ-Messung nach Grubbs-Ausreißertest

Probennr.	Verarbeitung	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Pistazie	$\delta^{15}N_{Air}$ Pistazie	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Pistazie	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Rückstand	$\delta^{15}N_{Air}$ Rückstand	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Rückstand	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Pistazienöl	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ Pistazienöl
139	R, S	-26,81	4,75	37,46	-24,02	4,83	39,24	-28,44	37,82
140	R, S	-26,90	3,61	36,27	-23,71	3,55	39,15	-28,35	37,57
141	R, S	-26,48	3,97	37,49	-23,47	3,74	38,94	-28,16	37,89
142	G	-27,02	5,00	36,46	-23,75	5,13	38,32	-28,80	37,16
143	R, S	-27,41	1,02	27,92	-24,24	1,09	29,84	-29,48	27,81
144	R, S	-26,18	0,15	33,19	-23,07	0,37	36,28	-27,85	35,32
145	R, S	-27,64	1,11	25,75	-24,54	1,12	28,76	-29,67	27,07
146	R, S	-26,78	4,94	36,50	-24,04	4,77	38,94	-28,65	38,28
147	R, S	-26,56	5,11	36,01	-23,61	5,45	38,87	-28,30	38,38
148	R, S	-26,91	2,90	34,17	-23,89	2,91	36,41	-28,55	35,31
149	R, S	-26,33	5,21	36,05	-23,18	5,30	38,67	-28,15	37,78
150	R, S	-26,12	3,16	35,21	-23,19	3,53	38,22	-27,85	36,81
151	R, S	-26,62	5,30	37,45	-23,97	5,05	39,34	-28,45	37,44
152	R, S	-26,51	6,10	37,46	-23,50	6,19	39,56	-28,39	38,23
153	R, S	-27,64	1,96	27,97	-24,58	1,79	28,69	-29,63	27,08
154	G	-26,01	3,92	35,13	-23,05	4,20	38,70	-27,69	37,75
155	R, S	-27,95	1,18	26,40	-24,89	1,29	29,72	-29,99	27,30
156	R, S	-27,51	1,26	27,34	-24,55	1,35	29,89	-29,61	27,51
157	R, S	-27,05	4,71	36,59	-23,94	4,71	39,75	-28,82	37,86
158	R, S	-28,16	1,99	26,41	-25,01	1,75	30,07	-29,97	26,23
159	R, S	-27,43	0,72	27,26	-24,53	0,79	30,94	-29,58	27,00
160	G	-25,83	2,99	34,07	-23,50	3,40	38,08	-27,76	36,31
161	R, S	-27,65	1,08	28,60	-24,97	1,27	30,72	-29,65	28,00
162	R, S	-26,63	3,05	36,71	-23,62	3,47	39,52	-28,31	38,01
163	R, S	-26,78	5,16	35,84	-24,03	5,32	38,28	-28,38	36,57
164	R, S	-26,74	4,75	36,40	-24,21	5,10	38,66	-28,36	38,44

R: geröstet **S**: gesalzen **G**: grün