



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Zur aktuellen Verfälschungsproblematik
von Milch und Milchprodukten

angestrebter akademischer Grad
Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin: Nina Winterleitner

Matrikel-Nummer: 0048999

Studienrichtung Ernährungswissenschaften

(lt. Studienblatt):

Betreuer: Helmut Mayer, Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn.
Universität für Bodenkultur Wien
DLWT, Abteilung Lebensmittelchemie

Wien, März 2010

Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei meinem Professor Helmut Mayer, Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn., für die nette und hilfsbereite Betreuung dieser Arbeit bedanken. Er hat mir bei allen Unklarheiten immer sofort geholfen, eine derartige Unterstützung kann man sich wirklich nur wünschen.

Ein besonderer Dank gilt natürlich meinen Eltern. Sie haben mich während meiner gesamten Studienzeit mit viel Liebe und mit viel Verständnis für manch schwierige Situation begleitet. Natürlich möchte ich mich auch für die finanzielle Hilfestellung bedanken, jedoch war es für mich am wichtigsten, dass meine Familie immer hinter mir gestanden ist und meine Art und Weise zu Studieren nie in Frage gestellt hat.

Speziell möchte ich mich bei meinem Freund Marco, der mit viel Geduld meine Prüfungsläunen „ertragen“ hat, bedanken. In stressigen Lernzeiten hat er mich in allen denkbaren Dingen unterstützt, er hat mich aufgebaut und motiviert, wenn mal etwas nicht so gut gelaufen ist. Ich bin sehr froh, dass wir meine Studienzeit gemeinsam gemeistert haben und jetzt endlich unsere Wochenenden nach Belieben und ohne schlechtes Gewissen genießen können.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Schwester Katrin (Kessy) besonders bedanken. Keiner hat meine Unisorgen so gut verstanden wie sie. Obwohl viele Kilometer entfernt, stand sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite und hatte stets ein offenes Ohr. Es ist sehr, sehr wichtig für mich, eine Freundin wie sie zu haben.

Ein weiterer Dank gilt natürlich all jenen, die sich die Mühe gemacht haben, meine Arbeit Korrektur zu lesen und mir bei diversen Formatierungsdramen geholfen haben. Ohne diese nette Hilfe wäre ich sicher nicht so gut vorangekommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Verfälschung durch Melamin	3
2.1	Was ist Melamin und wo findet es üblicherweise Verwendung	5
2.1.1	Chemische und physikalische Aspekte	5
2.1.2	Die Verwendung von Melamin	6
2.2	Toxikologie von Melamin	7
2.2.1	Akute Toxizität	7
2.2.2	Chronische Toxizität	7
2.2.3	Kanzerogenität	8
2.2.4	Gentoxizität	9
2.2.5	Kombinierte Toxizität	9
2.3	Melamin in Lebensmitteln	10
2.3.1	Mögliche Quellen von Melamin	10
2.3.2	Zusatz von Melamin	12
2.4	Nachweis von Melamin	15
3	Verfälschung durch fremdes Fett	26
3.1	Das Milchfett	26
3.2	Zusatz von pflanzlichen Fetten	28
3.3	Zusatz von tierischem Fett	36
4	Zusatz von Milch anderer Spezies	41
4.1	Verschiedene Arten der Elektrophorese	42
4.1.1	Elektrophoretische Trennung der Molkenproteine	46
4.2	Immunochemische Nachweismethoden	49
4.2.1	Nachweis durch Immunoassays	49
4.2.2	Nachweis durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	55
4.3	Nachweis durch Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	61
5	Verfälschung durch Wasserzusatz	66
5.1	Das Wasser in der Milch	66
5.2	Verdünnung der Milch mit Wasser	66
6	Schlussbetrachtung	75
7	Literaturverzeichnis	77
8	Anhang	83
8.1	Zusammenfassung	83
8.2	Abstract	84
8.3	Lebenslauf	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturformel von Melamin [FILIGENZI et al., 2007]	5
Abbildung 2:	Typische Elektropherogramme vom Standard, von Proben und von gespikten Proben unter optimalen Vorbehandlungs- und Trennungsbedingungen (30mM NaH ₂ PO ₄ , pH 3.2): (a) Melaminstandard in 1% Trichloressigsäure; (b) Flüssigmilch und gespikte Milch; (c) Joghurt und gespiktes Joghurt; (d) Vollmilchpulver und gespiktes Vollmilchpulver; (e) Fischfutter und gespiktes Fischfutter; (f) Fisch und gespikter Fisch. Die oberen Linien in den Bildern b-f entsprechen echten Proben, die mit 2µg/ml Melamin versetzt wurden [YAN et al., 2009].	19
Abbildung 3:	Sweeping-MECK-Elektropherogramm von melaminkontaminierter Milch, welche von der gemeinsamen Forschungsstelle der Europäischen Kommission (A) und von dem Büro für Lebensmittel- und Drogenanalyse in Taiwan (B) zur Verfügung gestellt wurde. M: Melamin [TSAI et al., 2009].	20
Abbildung 4:	Schematische Erläuterung von HFSE kombiniert mit GC-MS [LI et al., 2009].	22
Abbildung 5:	Gas-Flüssigkeitschromatogramme von Milchproben (A-D), die mit unterschiedlichen Mengen von partiell hydrierten Pflanzenfetten, die einen trans-18: 1 Isomer-Gehalt von 13.4g/100g Fettsäure haben, versetzt wurden. E: ist reine Milch. A: 20.2%; B: 16.0%; C: 12.1%; D: 5.0% und E: 0% [DESTAILLATS et al., 2006].	33
Abbildung 6:	Reproduzierbarkeitswerte, welche mit den Ergebnissen der konventionellen GC und der UFM-GC berechnet wurden (ROJ, Reproduzierbarkeitsgrenzen, die von der offiziellen Methode berichtet wurden; der erste Balken beschreibt eine Zusatz von 7%, der zweite Balken einen Zusatz von 14% [POVOLO et al., 2008]	38
Abbildung 7:	UREA-PAGE Analyse der Casein Fraktion von Standardmischungen von Kuh- und Schafmilch [MAYER, 2005]	44
Abbildung 8:	IEF Banden von γ-Caseine, die aus Mischungen von Kuh- und Ziegenmilch stammen [MAYER, 2005].	45
Abbildung 9:	UREA-PAGE Analyse der Molkenproteine von Kuh-, Schaf-, Ziegen- und Stutenmilch [Mayer, 2005]	47
Abbildung 10:	IEF-Banden der Molkenproteinfraktionen von Standardmischungen von Kuh- und Schafmilch [Mayer, 2005].	48
Abbildung 11:	Nachweis von Kuhmilch in verfälschten Proben von Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch unter der Verwendung des optimierten indirekten kompetitiven ELISAs für bovines IgG [HURLEY et al., 2004b]	53
Abbildung 12:	Ergebnis des optimierten indirekten kompetitiven ELISAs bei bovinem IgG unter der Verwendung von verschiedenen, behandelten Milcharten als Inhibitoren [HURLEY et al., 2004b]	54

- Abbildung 13:** Agarosegelelektrophorese von PCR Produkten amplifiziert durch Käsebruch, der durch die Mischung von Kuh- und Ziegenmilch erhalten wurde. M, 100bp Stufe; Linie 1, Kuhmilch (100%); Linie 2, Ziegenmilch (100%); Linie 3, Mischung von Kuhmilch (1%) und Ziegenmilch (100%); Linie 4 Mischung von Kuhmilch (0.5%) und Ziegenmilch; Linie 5, Mischung von Kuhmilch (0.1%) und Ziegenmilch; Linie 6, Kontrollreagens [BOTTERO et al., 2003] 56
- Abbildung 14:** Elektrophoretische Analyse von ziegenspezifischer 12S rRNA Amplifikation von Milchproben unter der Verwendung von Primer 12SHC-DIR und 12SHC-INV. Die Proben sind: Ziege (Linie 1), Schaf (2), Kuh (3) und Wasserbüffel(4). CN = Negativkontrolle; M = Molekulargewicht-Marker 1kb plus DNA-Leiter [LOPEZ-CALLEJA et al., 2005] 58
- Abbildung 15:** Elektrophoretische Analyse von den 12S rRNA PCR-Produkten, erhalten von rohen binären Mischungen aus Ziegen- in Schafmilch, unter der Verwendung der Primer 12SHC-DIR und 12SHC-INV. Proben: 100% Ziege (1), 10% Ziege (2), 5% Ziege (3), 1% Ziege(4), 0.5% Ziege (5), 0.1% Ziege (6) und 100% Schaf (7). NC = Negativkontrolle; M = Molekulargewicht-Marker 1kb plus DNA-Leiter [LOPEZ-CALLEJA et al., 2005]. 59
- Abbildung 16:** Elektrophoretische Analyse von den 12S rRNA PCR-Produkten, erhalten von hitzebehandelter Milch aus binären Mischungen von Ziegen- in Schafmilch, unter der Verwendung der Primer 12SHC-DIR und 12SHC-INV.A: Pasteurisierte Probe (65°C, 30min); und B: Sterilisierte Probe (120°C, 20min). Die Linien sind: 100% Ziege (1), 10% Ziege (2), 5% Ziege (3), 1% Ziege(4), 0.5% Ziege (5), 0.1% Ziege (6) und 100% Schaf (7). NC = Negativkontrolle; M = Molekulargewicht-Marker 1kb plus DNA-Leiter [LOPEZ-CALLEJA et al., 2005]. 60
- Abbildung 17:** Chromatographische Darstellung von Kuh- und Ziegengesamtcasein, erhalten durch RP-HPLC bei 280nm, 20µl-Injektionsvolumen: (a) rohe Ziegenmilch; (b) 5% Verfälschung; (c) 20% Verfälschung; (d) rohe Kuhmilch; Chromatographische Darstellung von Kuh- und Schafgesamtcasein, erhalten durch RP-HPLC bei 280nm; 20µl-Injektionsvolumen: (a) rohe Ziegenmilch; (b) 5% Verfälschung (c) 20% Verfälschung; (d) rohe Kuhmilch [VELOSO et al., 2002]. 65
- Abbildung 18:** Die Veränderung der Leitfähigkeit von Milch als eine Funktion der Zugabe von Wasser in Milch bei 8°C [MABROOK und PETTY, 2003] 71
- Abbildung 19:** Die Veränderung der Leitfähigkeit der Milch als Funktion des Anteils an Wasser in Milch bei 8°C; Daten für Wasserkonzentrationen weniger als 10% [MABROOK und PETTY, 2003] 73
- Abbildung 20:** NIR Spektrum von verfälschten Milchproben in dem Bereich von 1100-2500nm; A, durch Wasser verfälschte Milch; B, durch Molke verfälschte Milch [KASEMSUMRAM et al., 2007]. 74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Analysemethoden für den Nachweis von Melamin (LOD: Nachweisgrenze; LOQ: Quantifizierungsgrenze; VD: Validierungsdaten) [TITTLEMIER et al. 2008].	25
Tabelle 2:	Immunologische Methoden zur Detektion von Milchprodukten, die mit Kuhmilch verfälscht wurden [HURLEY et al., 2004a]	50
Tabelle 3:	Immunologische Methoden zur Detektion von Milchprodukten, die mit Ziegenmilch verfälscht wurden [HURLEY et al., 2004a]	51

1 Einleitung und Fragestellung

Einer der wertvollsten Naturstoffe überhaupt ist die Milch. Seit Jahrtausenden ist sie Grundbestandteil der menschlichen Ernährung und zählt daher zu den ältesten Lebensmitteln [SPREER, 2005].

Milch wird definiert als das Sekret der Milchdrüse weiblicher Säugetiere. Der natürliche Zweck der Milch ist die Ernährung des Neugeborenen solange zu sichern, bis sich diese unabhängig vom Muttertier mit Nahrung versorgen können. Aus diesem Grund enthält die Milch alle zum Erhalt und Aufbau des Organismus erforderlichen Stoffe. Die Zusammensetzung der Milch ist artspezifisch, je nach Tierart kann diese ziemlich stark schwanken [TÖPEL, 2004].

Die Milch von Ziege, Schaf, Büffel und Rind wurde vom Mensch immer schon genutzt, um sich zu ernähren. Heutzutage versteht man unter der Handelsware Milch beinahe ausschließlich Kuhmilch. Milch von anderen Tierarten gelangt unter Kennzeichnung, zum Beispiel als Schaf- oder Ziegenmilch in den Handel [BELITZ et al., 2001].

Die Milchindustrie ist verantwortlich für eine facettenreiche Gruppe von wirtschaftlich bedeutenden Produkten, wie Milch, Butter, Joghurt und Käse. Kuh-, Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch werden hauptsächlich für die Herstellung dieser Produkte verwendet. Die dominierende Milch am Markt ist die Kuhmilch, welche von der Mehrheit der westlichen Bevölkerung konsumiert wird [HURLEY et al., 2004].

Vermehrte Verfälschungen und Teilverfälschungen sind in der Milchindustrie zunehmend besorgniserregend. Um Produktionskosten zu senken oder Wettbewerbsvorteile zu erreichen, wird in Milchprodukten teilweise oder sogar das ganze Milchfett durch billigeres pflanzliches Fett ersetzt [FOX et al., 1988].

Eine Verfälschung der Milch mit Melamin ist deshalb wirtschaftlich reizvoll, weil dieser Stoff eine sehr stickstoffreiche Substanz ist und so als Ersatzstoff für Milchprotein Verwendung findet. Es entstehen Produkte, die durch Nicht-Proteinstickstoff, welcher von Melamin stammt, einen fälschlicherweise erhöhten Proteinwert aufweisen. Üblichen Analysenmethoden ist es nicht möglich, zwischen Proteinstickstoff und Nicht-Proteinstickstoff zu unterscheiden [WHO und FAO, 2008].

Der Inbegriff der Lebensmittelverfälschung ist das Zufügen von Wasser zu einem Getränk. Durch die Verdünnung der Milch verändert sich ihre Dichte, der Brechungsindex des Laktoserums und - am wichtigsten - der Gefrierpunkt [LEES, 2003].

Hinsichtlich der Lebensmittelauthentizität wurde die Artendifferenzierung von tierischen Produkten in den letzten Jahren zu einem wichtigen Thema. Ein Schutz gegen Substitution oder Zumischung ist wegen allergischen und religiösen Einschränkungen, aber auch wegen staatlichen Regulierungen von Bedeutung. Um unfairen Wettbewerb zu vermeiden und ehrliche Lebensmittelkennzeichnung zu gewährleisten, ist es nötig, gute analytische Methoden für die Milchindustrie und die Exekutivorgane zu entwickeln, um die Verfälschung von Milch in Angriff nehmen zu können [LOPEZ-CALLEJA et al., 2005].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen einige wichtige Verfälschungsarten der Milch behandelt werden. Einerseits soll kurz erläutert werden, welche Beweggründe hinter einer derartigen Verfälschung stehen. Andererseits soll näher darauf eingegangen werden, welche Möglichkeiten vorhanden sind, um die jeweiligen Verfälschungstypen nachzuweisen.

2 Verfälschung durch Melamin

Melamin ist eine industrielle Chemikalie, die in der Produktion von Melaminharzen eingesetzt wird. Dieser Stoff hat zwar geringe orale Toxizität, jedoch können chronische Aufnahmen von hohen Konzentrationen zu renalen Erkrankungen führen. Tierfutterzutaten, welche mit Melamin und seinen Analogen kontaminiert waren, führten im März 2007 zu einem großen Ausbruch von Nierenerkrankungen, die mit zahlreichen Todesfällen von Katzen und Hunden einhergingen. Im September 2008 wurde berichtet, dass hohe Konzentrationen von Melamin in chinesischer Säuglingsanfangsnahrung gefunden wurden. Daraufhin prüfte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die jüngste Melaminkontamination von China. Über 51900 Säuglinge und Kleinkinder wurden in China ins Spital gebracht, Gründe dafür waren renale Probleme, mögliche Obstruktion der Nierengänge und mögliche Nierensteine aufgrund des Konsums von melaminkontaminierter Säuglingsanfangsnahrung und ähnlichen Milchprodukten. Sechs Todesfälle unter den Kindern wurden in China berichtet [XU et al., 2009].

Die Substanz Melamin hat bei einem LD₅₀-Wert von 3161mg/kg Körpergewicht bei Ratten nur gering akut toxische Wirkung [WHO: melamin an cyanuric acid, 2008], sobald die Konzentration an dieser Chemikalie aber einen gewissen Grenzwert erreicht, kommt es zur Kristallbildung im Urin; unter diesem Wert hat die Aufnahme von Melamin im Allgemeinen keine negativen Auswirkungen auf die Gesundheit. Viele der betroffenen Kinder aus China hatten Steine oder Kalkablagerungen in der Niere, in der Harnblase oder im Harnleiter. Diese Nierensteine setzten sich aus Harnsäure (normales Abfallprodukt des menschlichen Urins) und Melamin zusammen [WHO und FAO, 2008].

Experimentelle Studien haben gezeigt, dass auch die Kombination mit Cyanursäure zu gesundheitlichen Problemen führen kann, da sich in der Niere unlösliche Melamin-Cyanursäure-Kristalle bilden, die dann in weiterer Folge zum Versagen der Niere führen könnten [WHO, 2008].

Verschiedene Vorfälle von melaminkontaminiertem Tierfutter wurden ebenso berichtet, wobei einer sogar dazu führte, dass 1154 Produkte zurückgerufen werden mussten. Diese Sorte Tierfutter stand im Verdacht, den Tod von mehr als 1000 Katzen und Hunden aufgrund eines Nierenversagens verursacht zu haben [WHO und FAO, 2008].

Verfälschung mit Melamin ist wirtschaftlich gesehen deshalb reizvoll, weil es eine sehr stickstoffreiche Substanz ist und so als Ersatzstoff für Protein Verwendung findet. Es entstehen Produkte, die durch Nicht-Proteinstickstoff, welcher von Melamin stammt, einen fälschlicherweise erhöhten Proteinwert aufweisen. Den üblichen Analysemethoden ist es nicht möglich zwischen Proteinstickstoff und Nicht-Proteinstickstoff zu unterscheiden, deshalb können solche Verfälschungen überhaupt auftreten. Damit Verfälschung vermieden werden kann, ist es wichtig, neue, einfache, schnelle, spezifische und kostengünstige Analysemethoden für die Quantifizierung von Protein zu entwickeln [WHO und FAO, 2008].

Durch den Konsum von kontaminierter chinesischer Säuglingsnahrung wurden durchschnittlich 8.6 bis 23.4mg/kg Körpergewicht pro Tag an Melamin aufgenommen, wobei sich diese Werte auf die meist kontaminierte Marke beziehen. Diese Menge ist das 40 bis 120fache des TDI von 0.2mg/kg Körpergewicht, was die gesundheitliche Dramatik nur verdeutlicht. Vorsichtige Schätzungen lassen darauf schließen, dass die mögliche Belastung von Erwachsenen durch verfälschte Milchprodukte bei einem 0.8 bis 3.5 fachen TDI-Wert liegt [WHO und FAO, 2008].

2.1 Was ist Melamin und wo findet es üblicherweise Verwendung

2.1.1 Chemische und physikalische Aspekte

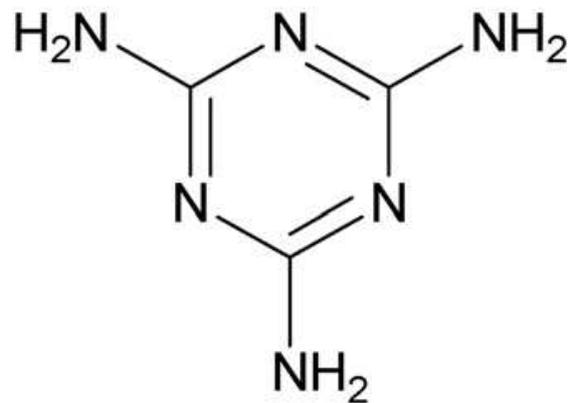


Abbildung 1: Strukturformel von Melamin [FILIGENZI et al., 2007]

Melamin (2, 4, 6-Triamino-s-triazin) oder auch Cyanursäuretriamid genannt, bezeichnet eine chemische Verbindung, die allgemein in der Kunststoffindustrie Verwendung findet. Diese Substanz ist ein weißes, geruch- und auch geschmackloses Pulver, das sich ab einer Temperatur von 280°C zersetzt und dann direkt vom festen Aggregatzustand in den gasförmigen übergeht.

Die Lösungseigenschaften sind in kaltem Wasser eher schlecht, dagegen ist es in heißem Wasser gut löslich; unlöslich ist es in Ether [Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker, 1993].

Durch Reaktion von Melamin mit Alkoholen, Aldehyden und Aminen kann es zu Harzen weiterverarbeitet werden. Eine der wirtschaftlich wichtigsten Reaktionen ist die Addition von Formaldehyd an die Aminogruppe des Melamins, wobei Methylol-Melamine entstehen. Durch Kondensation entstehen höhermolekulare Verbindungen, im schwach alkalischen Milieu bei Temperaturen ab 90°C und im stark Sauren schon ab 20-40°C. Je nach Dauer der Erwärmung sind die entstandenen Harze stärker oder schwächer vernetzt [Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker, 1993].

2.1.2 Die Verwendung von Melamin

Der Anwendungsbereich von Melamin ist breit gefächert. In der Automobilindustrie findet Melamin als Einbrennlack Verwendung, dabei wird es mit Alkohol verethert und durch Zusatz von weich machenden Harzen entstehen diese besonders alkaliresistenten Lacke. Auch in der Holzindustrie wird Melamin besonders bei höherwertigen Produkten, wie zum Beispiel feuchtigkeitsbeständige Spanplatten, als Teil von Harzklebesystemen, wie etwa Melamin-Harnstoff-Formaldehyd-Harze (MUF), verwendet. Durch Zusatz von Melaminharzen wird Papier veredelt, dabei entstehen Produkte mit erhöhter Nassfestigkeit und Nassabriebfestigkeit. Ebenso können Textil- und Lederwaren veredelt werden, indem cellulosehaltige Gewebe mit Melaminharzen imprägniert werden. Durch diese Behandlung erhöht sich die Formbeständigkeit, Scheuer- und Nassfestigkeit, außerdem kann zu einem gewissen Grad die Entflammbarkeit der Fasern verringert werden [Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker, 1993].

2.2 Toxikologie von Melamin

2.2.1 Akute Toxizität

Studien an verschiedenen Tierarten, wie Ratten, Mäusen oder Hasen, haben die akute Toxizität ausgeforscht. Ebenso wurden die unterschiedlichen Arten der Aufnahme (oral, inhalativ, dermal) untersucht. Die niedrigsten LD₅₀-Werte dabei waren:

LD₅₀ oral, Ratte = 3161mg/kg Körpergewicht

LC₅₀ inhalativ, Ratte = 3.2mg/l

LD₅₀ dermal, Hase > 1000mg/kg Körpergewicht

LD₅₀ i.p., Maus = 112mg/kg Körpergewicht

Es wurden keine hautirritierenden Eigenschaften an Hasen oder Meerschweinchen festgestellt [OECD, 1998]. Fütterungsstudien an Ratten, Mäusen und Hunden haben gezeigt, dass die hauptsächlichsten toxikologischen Effekte von Melamin folgende sind: Nierensteinbildung, entzündliche Reaktionen und Verdickung der Harnblase. Im Körper wird der Stoff nicht metabolisiert, sondern schnell renal ausgeschieden; die Halbwertszeit in Plasma beträgt drei Stunden. Melamin hat nur eine sehr geringe akute Toxizität [WHO, 2008].

2.2.2 Chronische Toxizität

Verschiedene Studien an Tieren haben herausgefunden, dass vor allem die Harnwege betroffen sind. Der Stoff Melamin hat diuretische Wirkung und neigt im Körper zur Harnsteinbildung (Urolithiasis). Bei Mäusen sind sowohl Eiterung als auch Verdickung der Harnblase aufgetreten. Die Veränderungen der Harnblase sind abhängig von der zugeführten Dosis und von der Spezies, die Ratte und dabei vor allem die männliche, ist empfindlicher als die Maus [OECD, 1998].

Fütterungsstudien an Tieren konnten keine nierentoxische Wirkung nachweisen. Hohe Dosen an Melamin haben bei Ratten und Hunden diuretische Wirkung gezeigt, aber verursachen keine Nierentoxizität. Dennoch hat eine 13-wöchige Fütterungsstudie gezeigt, dass sich im proximalen Tubulus kalkhaltige Ablagerungen dosisabhängig manifestieren, darauf folgte eine 2-Jahres-Studie, welche eine chronische Entzündung der Niere ergab [WHO, 2008].

2.2.3 Kanzerogenität

Das NTP (National Toxicology Program) führte eine zweijährige Studie an Ratten durch, dabei wurden unterschiedliche Dosen an Melamin verfüttert: 0, 4500 oder 9000mg/kg in einer Diät für weibliche Ratten und 0, 2250 oder 4500mg/kg für männliche. Man kam zu dem Ergebnis, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen hinsichtlich der Sterberate gab.

In einer Konkurrenzstudie an Mäusen (Melamindosis: 0, 2250 oder 4500mg/kg) wurde eine niedrigere Überlebensrate bei männlichen Versuchstieren, die höher dosiert gefüttert wurden, beobachtet. Es wurden Nierensteine und entzündliche hyperplastische Veränderungen in der Harnblase gefunden, ebenso sind solche Veränderungen bei weiblichen Tieren aufgetreten, jedoch nicht so häufig. Weiters konnte keine pathologische Gewebekonstruktion in der Harnblase gefunden werden. Eine andere Studie kam zu dem Ergebnis, dass die Bildung der Harnblasensteine abhängig von der Dosis ist. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz von Karzinomen und Papillomen abhängig von der Dauer der Melaminbehandlung ist.

Die International Agency for Research on Cancer (IARC) stellte fest, dass der DNA-reaktive Mechanismus, unter welchem Melamin Harnblasentumore bei Ratten verursacht, nur unter Bedingungen auftritt, welche Steine verursachen. Alles in allem konnte Melamin beim Menschen nicht als kanzerogen klassifiziert werden [WHO und FAO, 2008].

2.2.4 Gentoxizität

Diesbezüglich wurden viele Studien an unterschiedlichen Organismen und Zellen durchgeführt. Es wurden sowohl übliche Verfahren angewandt, wie z.B. AMES-Test, aber auch nicht so Gebräuchliche, wie das Biolumineszenzverfahren. Alles in allem gilt Melamin weder als gentoxisch noch als mutagen [OECD, 1998].

2.2.5 Kombinierte Toxizität

Die beiden Substanzen, Melamin und Cyanursäure, haben alleine für sich nur geringe akute Toxizität. Der Ausbruch von Nierenversagen bei Katzen und Hunden, die kontaminiertes Futter im Jahre 2007 aufgenommen hatten, lässt darauf schließen, dass die gemeinsame Aufnahme von Melamin und Cyanursäure eine toxische Wirkung auf Nieren zur Folge hat. Die Untersuchung des Tierfutters ergab, dass es eine Vielzahl von Triazinen, unter anderem auch Melamin und Cyanursäure, enthielt [WHO, 2008].

In einer Studie von Puschner et al. (2007) hat man Katzen melamin- und cyanursäurehaltiges Futter zwei Tage lang verabreicht, dabei trat bei diesen Tieren akutes Nierenversagen mit Kristallen in Urin und Niere auf. Dagegen zeigten Katzen, die zwar mit derselben Dosis, aber nur mit einer der beiden Substanzen behandelt wurden, keine pathologischen Veränderungen. Dobson et al. (2008) konnte dies bestätigen, Ratten bekamen einen Mix aus vier verschiedenen Triazinen oder die Kombination von Melamin und Cyanursäure drei Tage lang verabreicht [WHO und FAO, 2008].

Dadurch stieg der Gehalt von Harnstoff-Stickstoff und Kreatinin im Serum an und es kam zu einer Erhöhung des Nierengewichts. Ratten, die mit einer Einzeldosis von Ammelin oder Ammelid gefüttert wurden, zeigten 24 Stunden nach der Behandlung keine Veränderung bezüglich Nierengewicht, Harnstoff-Stickstoff, Serumkreatinin und Kreatininausscheidung. Zur Toxizität von Melamin-Cyanursäure-Komplexen sind wenige Daten vorhanden. Eine Studie, die die akute Toxizität von Melamin-Cyanursäure bei Ratten und Mäusen behandelt hatte, kam zu einem LD_{50} von 4110mg/kg Körpergewicht bei Ratten und zu einem LD_{50} von 3461mg/kg Körpergewicht bei Mäusen.

Verglichen mit der Toxizität der Einzelkomponenten (Melamin: 6000mg/kg Körpergewicht bei Ratten, 4282mg/kg Körpergewicht bei Mäusen; Cyanursäure: 7667mg/kg Körpergewicht bei Ratten, 3378mg/kg Körpergewicht bei Mäusen) wird deutlich, dass die Kombination der beiden Chemikalien toxischer ist als eine alleine [WHO und FAO, 2008].

2.3 Melamin in Lebensmitteln

2.3.1 Mögliche Quellen von Melamin

Wie erwähnt, wird Melamin auf viele verschiedene Arten verwendet. Dadurch und auch durch den Abbau von chemischen Ausgangsstoffen kann es auf unterschiedlichen Wegen in die Umwelt und natürlich auch in die Nahrungskette gelangen [WHO und FAO, 2008].

Unter anderem ist Melamin ein Metabolit von Cyromazin; dieser Stoff wird als Pestizid und auch als Tierarzneimittel verwendet. Patakioutas et al. (2007) fanden heraus, dass durch Besprühung mit diesem Pflanzenschutzmittel die Gesamternte Rückstände von Cyromazin und auch dessen Metabolit Melamin enthält [WHO und FAO, 2008].

Landwirtschaftliche Versuche haben den Restgehalt von Melamin in Tomaten, Salat und Sellerie geprüft, laut japanischen Daten (Japan Food Safety Commission) betrug der Rückstand nicht mehr als 1mg/kg. Der Melamin-Rückstand in Bohnen wurde von Karras et al. (2007) untersucht, indem er die Wurzeln mit einer Cyromazinlösung versetzte, dabei betrug der Rückstand von Melamin im vegetativen Teil der Pflanze weniger als 1mg/kg. Laut Experten (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR USEPA)), beträgt der Melaminrückstand im Allgemeinen ungefähr 10% des Cyromazinrückstandes, außer bei genießbaren Schlachtnebenerzeugnissen und Pilzen ist die Höhe des Melaminrückstandes etwa gleich dem des Cyromazinrückstandes [WHO und FAO, 2008].

Die Migration von melamin-formaldehydhältigem Plastikgeschirr wurde unter kontrollierten Bedingungen untersucht; dabei wurden hohe Temperaturen und lebensmittelähnliche Lösungen, wie z.B.: Essigsäure oder Wasser verwendet. Chinese Center for Disease Control and Prevention und das Korea Food and Drug Administration beschäftigten sich ebenso mit diesem Problem; höchstwahrscheinlich beträgt die Konzentration von Melamin in Lebensmittel durch Migration nicht mehr als 1mg/kg.

In den USA wird der Stoff Trichlormelamin als Desinfektionsmittel für Lebensmittelproduktionsanlagen verwendet; dieser kann zu Melamin abgebaut werden. Die US FDA schätzt, dass die Melamin-Konzentration in Nahrungsmittel durchschnittlich 0.14mg/kg beträgt, wenn alle Desinfektionsmittel melaminhaltig sind [WHO und FAO, 2008].

Durch den weit verbreiteten Gebrauch von Melamin kann es ebenso in die Umwelt gelangen, wie zum Beispiel durch die Herstellung von Laminat oder durch die Produktion von flammenfesten Farben oder Düngemittel, allerdings wurden noch keine spezifischen Daten über Rückstandsmengen von Melamin berichtet. Der Mensch kann durch viele Wege mit Melamin in Kontakt kommen; derzeit wird angenommen dass diese Melaminquellen nur einen Bruchteil dessen ausmachen, denen ein Mensch ausgesetzt ist [WHO und FAO, 2008].

2.3.2 Zusatz von Melamin

2.3.2.1 Melamin in Säuglingsanfangsnahrung

In einer chinesischen Untersuchung zur Nahrungsaufnahme wurden speziell verfälschte Sanluprodukte untersucht. Dafür wurden vier verschiedene Altersgruppen von Säuglingen und Kleinkindern gewählt; das Alter betrug drei, sechs, zwölf und vierundzwanzig Monate und ihr Gewicht lag zwischen 5,5 und 14kg. Bezogen auf die empfohlenen Zufuhrmengen, die der Packungsaufschrift der Produkte entnommen wurden, wurde für diese Untersuchung die maximale Verzehrsmenge verwendet; die zugeführten Mengen lagen zwischen 120 und 150g.

Bezieht man sich auf die mittlere Melaminkonzentration von 1000mg/kg der Sanluproben, so würde die nahrungsabhängige Melaminbelastung für diese Kinder folgendermaßen aussehen: für drei, sechs, zwölf und vierundzwanzig Monate alte Kinder wäre die Belastung 23.4, 21.4, 15.0 und 8.6mg/kg Körpergewicht pro Tag, wobei aber betont werden muss, dass in dieser Untersuchung die Probennahme nicht unbedingt repräsentativ war, die Melaminkonzentrationen in den verfälschten Sanluprodukten variieren und dass die Kinder vielleicht nicht nur diese Produkte verzehrt haben [CROSSLEY et al., 2008].

Das Institute of Nutrition and Food Safety und das Chinese Centre for Disease Control and Prevention haben 111 Proben von Säuglingsanfangsnahrung der Marke Sanlu in Beijing und Gansu auf die Anwesenheit von Melamin getestet, von diesen wurden 87 positiv getestet. Der durchschnittliche Melamingehalt betrug in diesen Proben 1212mg/kg; bei einzelnen Exemplaren betrug die Konzentration an Melamin zwischen weniger als 0.05mg/kg bis zu 4700mg/kg, dabei betrug der Melamingehalt bei 51 der 87 positiv getesteten Proben mehr als 1000mg/kg.

Ebenso wurden Nicht-Sanlu-Produkte von der Provinz Gansu untersucht, bei 38 Proben betrug der durchschnittliche Gehalt an Melamin 4.06mg/kg. Es wird angenommen, dass die mit Wasser gestreckten Zutaten bei den Milchsammlstellen mit Melamin versetzt wurden, um einen höheren Milchproteingehalt vorzutäuschen. Im Oktober 2008 verlangte die chinesische Regierung, dass Firmen der Milchindustrie alle Proben, die vor 14. September hergestellt wurden, auf Melaminrückstände zu testen. Durch diesen Vorfall wurden weltweit viele Länder und Regionen angespornt, einen Grenzwert der Melaminkonzentration festzulegen [HILTS und PELLETIER, 2008].

Im Allgemeinen wurde der Höchstwert für Säuglingsanfangsnahrung auf 1mg/kg festgelegt; für Milchprodukte und Produkte, welche Milch enthalten, oder die Zutaten enthalten, welche von Milch stammen, wurde ein Maximalwert von 2.5mg/kg festgelegt. Das AQSIQ in 17 Provinzen hat über 1500 Chargen von pulveriger Säuglingsanfangsnahrung von 78 Marken getestet, all diese Chargen lagen unter den festgesetzten Werten. Ebenso wurden in 25 Provinzen 2175 Chargen von Milchpulver, welches nicht als Säuglingsanfangsnahrung verwendet wird, untersucht. Getestet wurden 182 Marken, die nach dem 14. September 2008 produziert wurden; all diese Produkte haben die festgesetzten Melaminkonzentrationen nicht überschritten [HILTS und PELLETIER, 2008].

2.3.2.2 Melamin in anderen Lebensmitteln

Abschätzungen der EFSA Concise Food Consumption Database für Erwachsene wurden herangezogen, um die durchschnittliche Aufnahme von Melamin über milchhaltige Produkte aus China herauszufinden. Durch INFOSAN und durch Daten von anderen Ländern wurden die maximalen Melaminkonzentrationen ermittelt, diese wurden herangezogen, um den Gehalt an Melamin in den verschiedenen Lebensmittelgruppen ableiten zu können.

Es wurde angenommen, dass 10% der Lebensmittelgruppen, welche analysiert wurden, Milchpulver aus China enthalten und dass Kaffee 50% der Lebensmittelgruppe Tee und Kaffee umfasst. Wenn mehr als ein Lebensmittel pro Gruppe analysiert wurde, so wurde die höchste Melaminkonzentration genommen. Unter der Annahme, dass Melamin in allen Lebensmitteln enthalten war und mit der höchsten berichteten Konzentration für ein Lebensmittel in dieser Gruppe, betrug die durchschnittliche Aufnahme von Melamin durch ein Nahrungsmittel, welches verfälschtes Milchpulver enthält, bei einem Körpergewicht von 60kg 0.16–0.7mg/kg pro Tag. Wobei dies nur eine grobe Abschätzung ist, da nicht unbedingt alle Lebensmittel einer Gruppe Milchpulver enthalten und weniger als 10% dieser Lebensmittel enthalten verfälschtes Milchpulver aus China. Außerdem liegen die tatsächlichen Melaminkonzentrationen meist unter dem publizierten Höchstwert in einer Lebensmittelgruppe. Im Vorfeld von Testergebnissen wurden von der EFSA theoretische Melaminaufnahmen von high consumern von Süßwaren und Feingebäck publiziert. Es wurde angenommen, dass sich der Gehalt an Melamin im Milchpulver in den verschiedenen Produkten unterscheidet und dass Milchpulver zu unterschiedlichen Verhältnissen zugesetzt wurde. Theoretisch kann ein 60kg schwerer Erwachsener durch Gebäck 0.0002 bis zu 0.3mg/kg Körpergewicht an Melamin pro Tag aufnehmen; ein 20kg schweres Kind 0.0006 bis zu 0.9mg/kg Körpergewicht [CROSSLEY et al., 2008].

Mögliche Aufnahmen von Melamin durch Süßigkeiten reichten von 0.0007 bis zu 0.45mg/kg Körpergewicht pro Tag für einen 60kg schweren Erwachsenen und von 0.002 bis zu 1.35mg/kg Körpergewicht pro Tag für ein 20kg schweres Kind [CROSSLEY et al., 2008].

2.4 Nachweis von Melamin

Es wurden verschiedene Methoden entwickelt, um den Gehalt an Melamin in unterschiedlichen Proben zu ermitteln und zu quantifizieren.

Mittels Gaschromatographie mit Stickstoff-Phosphor-Detektor und mit Massenselektiven-Detektor wurden chinesischer Kohl und Säuglingsanfangsnahrung analysiert. Methoden, welche Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Ultraviolettdetektion und mit Photodioden-Array-Detektion kombinieren, wurden ebenso entwickelt, um Melamin in Tabletten und Tierfutterproben zu analysieren. Für die Melaminbestimmung ist die Flüssigchromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (LC-MS), ebenso ein analytisches Instrument; diese stellt zurzeit die hauptsächliche Methode dar, die von der US Food and Drug Administration (FDA) verwendet wird [TSAI et al., 2009].

Andersen et al. (2008) untersuchten mit dieser Methode Rückstände von Melamin in den essbaren Teilen von Fischen, die mit dieser verunreinigenden Substanz gefüttert wurden. Diese essbaren Teile wurden extrahiert und anschließend mittels Flüssigchromatographie mit Tandemmassenspektrometrie analysiert. 55 mit Melamin behandelte Welse, Forellen, Tilapias und Lachse wurden analysiert. Melaminrückstände wurden in allen essbaren Teilen dieser Fische in einer Konzentration von 0.011 bis 210mg/kg (ppm) nachgewiesen [ANDERSEN et al., 2008].

Da die Skandale rund um Melamin weltweite Aufmerksamkeit erlangten, wurden spezielle analytische Techniken, einschließlich der „Direkten Analyse in Echtzeit“ (DART), Niedrigtemperatur-Plasma-Untersuchung kombiniert mit Tandem-Massenspektrometrie (LTP-MS/ MS) und extraktive Elektronenspray-Massenspektrometrie (EESI-MS) entwickelt, um Melamin schnell bestimmen zu können.

Diese Techniken sind jedoch in gewöhnlichen Laboratorien weitgehend nicht anwendbar. Kapillarelektrophorese (CE) wurde als eine effiziente und kosteneffektive Methode zur Analyse von kleinen Molekülen und Biopolymeren mit vielen Vorteilen erachtet, einschließlich minimalem Verbrauch an Probe und Reagens, hohe Trenngeschwindigkeit und hohe theoretische Bodenzahl. Wegen dem schmalen inneren Durchmesser der Kapillare und wegen der geringen Injektionsmenge wird die Nachweisempfindlichkeit leider zu einem Problem, wenn diese mit einem gewöhnlichen UV-Detektor kombiniert wird. Zwei allgemeine Methoden wurden eingeführt, um die Sensitivität zu verbessern. Eine verwendet empfindlichere Detektoren wie Fluoreszenzdetektoren, elektrochemische Detektoren oder Massenspektrometrie zur Detektion und die andere Technik verwendet als Strategie gekoppelte Konzentrationen [TSAI et al., 2009].

Cook et al. (2005) verwendeten für den Nachweis von den Hauptkomponenten von Melaminharzen Kapillarzonenelektrophorese kombiniert mit Elektronensprüh-Massenspektrometrie. Die Autoren zeigten mit dieser Methode sowohl die einzigartige Trennselektivität der Kapillarelektrophorese, als auch die schnelleren Analysenzeiten, verglichen mit HPLC-Methoden, die bis dato verwendet wurden [COOK et al., 2005].

Yan et al. (2009) verwendeten für den Nachweis von Melamin in flüssiger Milch, in Joghurt, in Vollmilchpulver, in Fischfutter und in Fisch zum ersten Mal Kapillarzonenoelektrophorese mit einem Diodenarraydetektor (CZE-DAD). Während Fett in den eigentlichen Proben mit 1ml Chloroform ausgefällt wurde, wurden verdächtige Proben mit 1% Trichloressigsäure extrahiert. Die Extrakte wurden direkt durch CZE-DAD analysiert, nachdem sie zentrifugiert und gefiltert wurden. Durch Ermittlung der Variablen der Extraktion, Separation und der Detektion im Detail konnte die gesamte analytische Vorgehensweise, einschließlich der Probenvorbereitung, innerhalb von 30 Minuten beendet werden.

Die Nachweisgrenzen und die Quantifizierungsgrenzen für Melamin wurden bei 0.01µg/mL beziehungsweise bei 0.05µg/mL gefunden. Diese Methode wurde bei der Analyse von Milchprodukten, Fischfutter und Fisch mit einer gesamten Wiederfindungsrate von 93 bis 104% durchgeführt. Abbildung 2 zeigt die repräsentativen Elektropherogramme, die bei der Analyse des Standards und der echten Proben erhalten wurden [YAN et al., 2009].

Die Empfindlichkeit der CZE-DAD Methode war jedoch nicht ausreichend. Tsai et al. (2009) entwickelten in ihrer Studie eine analytische Methode unter der Verwendung von Kapillarelektrophorese mit der Technik der on-line Vorkonzentrierung, um Melamin in Säuglingsanfangsnahrung schnell bestimmen zu können. Beide Vorkonzentrierungstechniken, sowohl SWEEPING als auch STACKING, wurden angewendet, um deren Effektivität bei der Analyse von Melamin zu vergleichen. Bei der Feld-verstärkten-Proben-Stacking-Technik [field amplified sample stacking (FASS)] lag die Nachweisgrenze bei 0.5ng/mL, bei der Sweeping-Methode hingegen bei 9.2ng/mL [TSAI et al., 2009].

Obwohl die FASS-Technik eine bessere Wirksamkeit der Konzentrierung lieferte, waren die Matrixeffekte bei dieser Technik schwerwiegender.

Es zeigte sich, dass die SWEEPING-Mizellare-Elektrokinetische-Chromatographie (sweeping-MECK) am besten für die Analyse von echten Proben geeignet ist (Abbildung 3).

Unter optimalen Bedingungen konnte der Melamingehalt in Säuglingsanfangsnahrung innerhalb von sechs Minuten bestimmt werden. Die entwickelte Solid-Phase-Extraktions-Vorgehensweise - gekoppelt mit der sweeping-MECK-Methode - wurde validiert. Die Reproduzierbarkeit der Peakfläche von Lauf zu Lauf (n-3) entsprach einer relativen Standardabweichung von 3.6% und die Wiederholbarkeit von Tag zu Tag entsprach einer relativen Standardabweichung von 4.8% [TSAI et al., 2009].

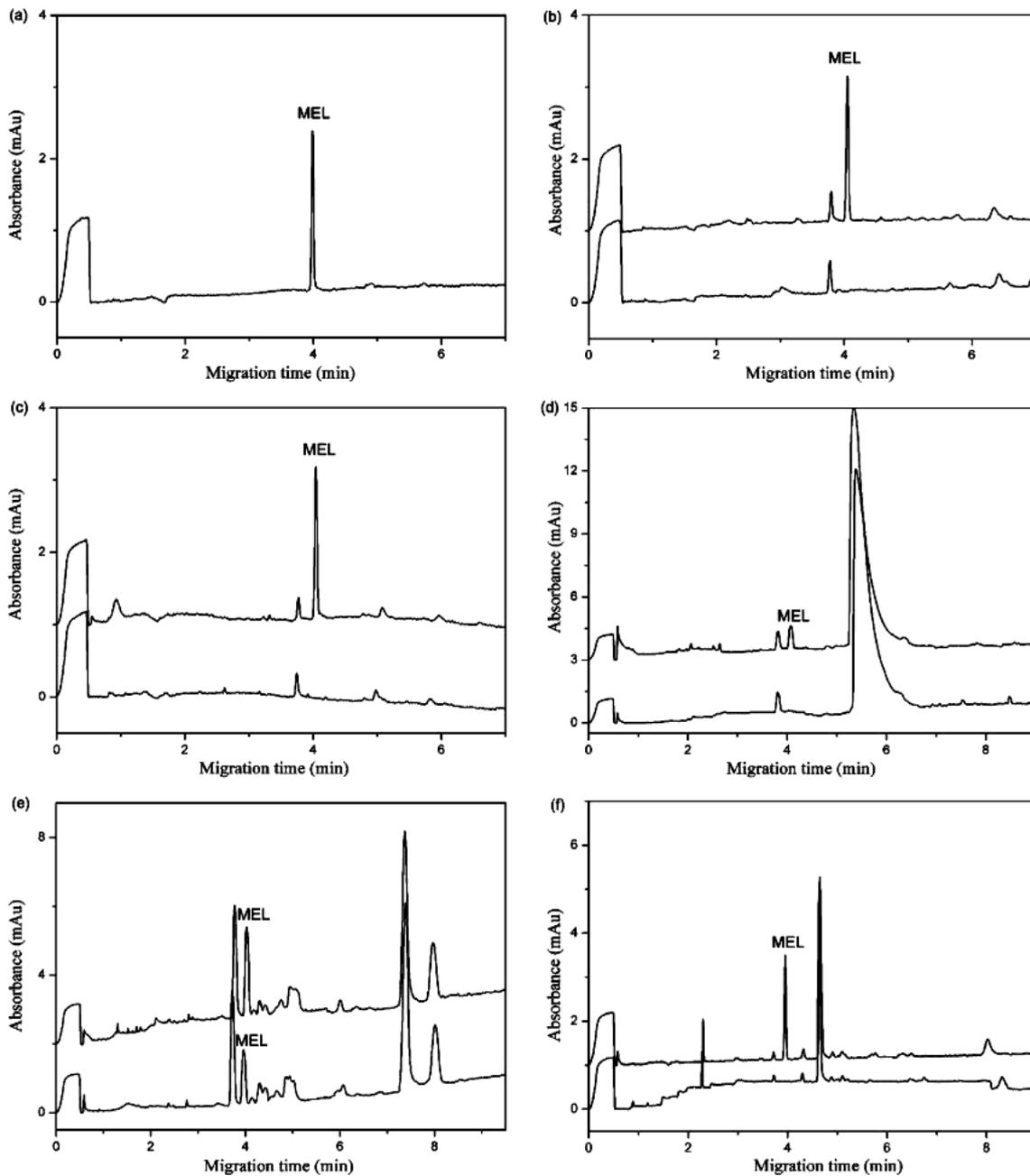


Abbildung 2: Typische Elektropherogramme vom Standard, von Proben und von gespikten Proben unter optimalen Vorbehandlungs- und Trennungsbedingungen (30mM NaH₂PO₄, pH 3.2): (a) Melaminstandard in 1% Trichloressigsäure; (b) Flüssigmilch und gespikte Milch; (c) Joghurt und gespiktes Joghurt; (d) Vollmilchpulver und gespiktes Vollmilchpulver; (e) Fischfutter und gespiktes Fischfutter; (f) Fisch und gespikter Fisch. Die oberen Linien in den Bildern b-f entsprechen echten Proben, die mit 2µg/ml Melamin versetzt wurden [YAN et al., 2009].

Die Genauigkeit der Methode wurde getestet, indem melaminkontaminiertes Milchpulver, welches von der Europäischen Kommission zur Verfügung gestellt wurde, mit 0.5 und 2 µg/mL des Melaminstandards versetzt wurden. Die Wiederfindungsraten lagen bei $93.4 \pm 0.5\%$ beziehungsweise bei $98.7\% \pm 0.4\%$. Diese Ergebnisse zeigen großes Potential für die Untersuchung von Melamin in Säuglingsanfangsnahrung [TSAI et al., 2009].

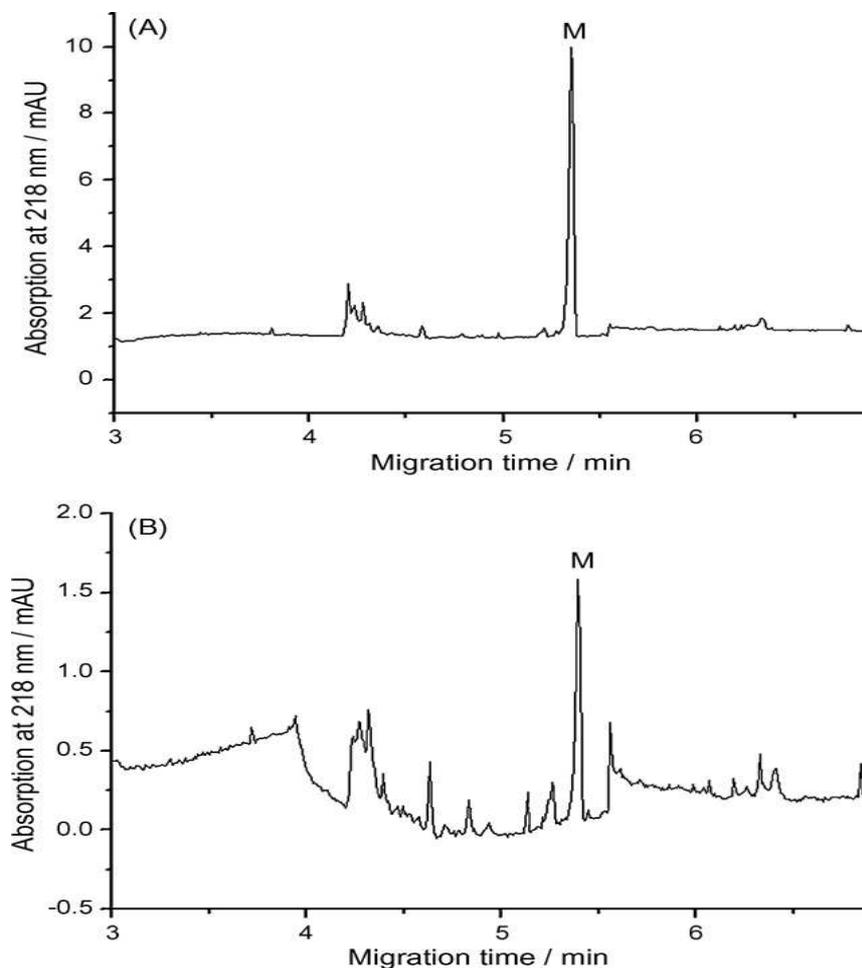


Abbildung 3: Sweeping-MECK-Elektropherogramm von melaminkontaminierter Milch, welche von der gemeinsamen Forschungsstelle der Europäischen Kommission (A) und von dem Büro für Lebensmittel- und Drogenanalyse in Taiwan (B) zur Verfügung gestellt wurde. M: Melamin [TSAI et al., 2009].

Für die schnelle Analyse von Melamin in Milchprodukten entwickelten LI et al. (2009) eine Methode, welche auf der Anreicherung und Vorbehandlung des Analyten in der Milchprobe, auf Sorptiv-Hohlfaserextraktion [hollow fiber sorptive extraction (HFSE)] und auf Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) beruht. Melamin in frischer Milch wurde mittels Zirconiumdioxidhohlfaser extrahiert, durch die mit Zirconiumdioxid ausgekleidete Hohlfaser angereichert und anschließend durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie analysiert.

Die Sorptivhohlfaserextraktion (HFSE) ist eine neue Art der Solid-Phase-Mikroextraktion (SPME), die einfach anzuwenden ist, wenig Probenmenge benötigt und wenig Lösungsmittel verbraucht. Weiters ist sie eine Methode, die es erlaubt, Extraktion, Anreicherung und Aufreinigung in einem Schritt durchzuführen. Außerdem kann die HFSE mit ultraschallunterstützter Extraktion kombiniert werden. Der Analyt kann direkt aus der flüssigen Probe extrahiert werden, wird dann mit Mikrolitern von Lösungsmittel desorbiert und kann so durch Gaschromatographie oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie analysiert werden. Wenn HFSE für den Nachweis von Melamin in frischer Milch verwendet wird, ist es nur nötig, die vorbereitete Zirconiumdioxidhohlfaser für eine vorgeschriebene Zeit in eine Milchprobe unter Ultraschall zu geben. Um eine schnelle Methode mit einer geringen Nachweisgrenze, verglichen mit anderen Methoden, zu entwickeln, wurde HFSE mit GC-MS kombiniert. Die Nachweisgrenze lag bei $0.001\mu\text{g/mL}$ und es ergaben sich wünschenswerte Wiederfindungsraten bei drei verschiedenen Konzentrationen.

Die größten Vorteile der von LI et al. (2009) beschriebenen Methode bestehen in: einfacher und schneller Probensammlung aus der Milch, Extraktion und Konzentrierung durch HFSE und schneller GC-MS- Analyse. HFSE kombiniert mit GC-MS kann den Lösungsmittelverbrauch und die Zeit für Aufreinigung und Vorbehandlung in der Probenvorbereitung signifikant reduzieren [LI et al., 2009].

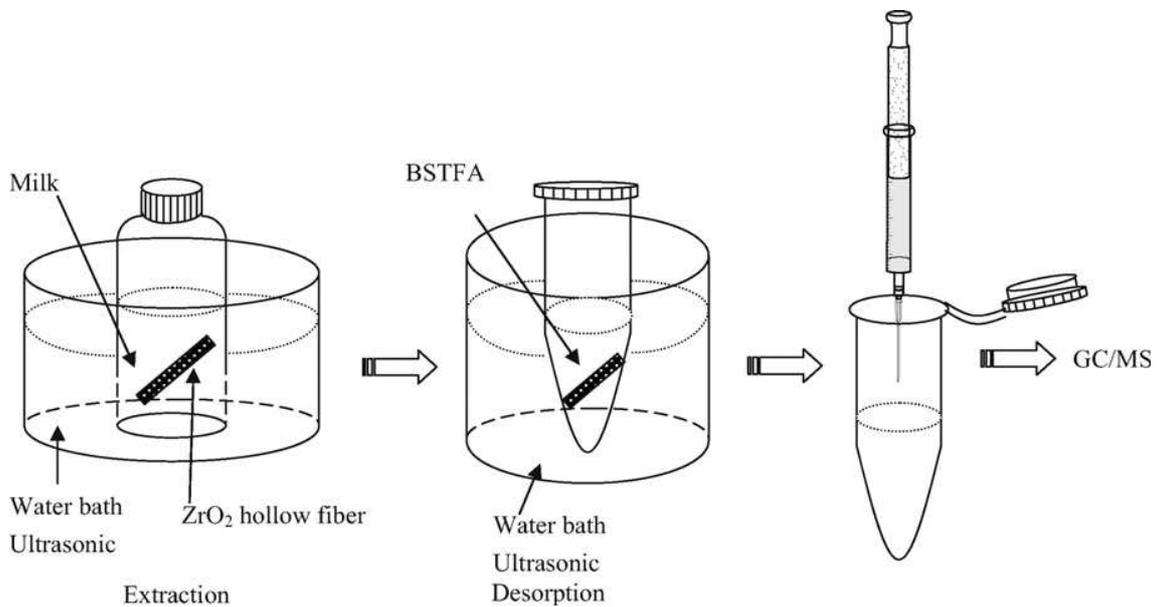


Abbildung 4: Schematische Erläuterung von HFSE kombiniert mit GC-MS [LI et al., 2009].

Da Melamin eine stark polare Verbindung ist, ist es nötig, diese vor der Detektion mittels GC-MS mit Trimethylsilylchlorid (TMSCL) zu derivatisieren.

In der Struktur von Melamin sind drei NH₂ vorhanden. Zusätzlich zu dem derivativen Produkt tri-TMS-Melamin wurden, je nach Reaktionsbedingungen, ebenso di- und mono-TMS-Melamin gefunden.

Aufgrund dieser unvollständigen Derivatisierung ist eine schlechte Reproduzierbarkeit der quantitativen Analyse unvermeidlich. Außerdem ist das Derivatisierungsreagenz sehr teuer und die Reaktion benötigt sehr viel Zeit. Diese Gründe limitieren die Anwendung des GC-MS für die quantitative Analyse von Melamin. Für die direkte Analyse von dem stark polaren Melamin, müssten Säulen mit starker Polarität verwendet werden, jedoch sind solche für die GC-MS-Analyse nicht geeignet [XU et al., 2009].

Xu et al. (2009) entwickelten eine neue Methode, um Melamin in Milchprodukten direkt nachzuweisen und zwar mittels GC-MS mit einem gekoppelten Säulensystem. Das gekoppelte Säulensystem bestand aus einer 30m DB-5ms Säule, die mit einer 1.5m Innowax Säule durch einen Quarzkapillarsäulenkonnekter gekoppelt war. Dieses System erwies sich als schnell, selektiv, sensitiv und als verlässlich für den Nachweis von Melamin in Milchprodukten. 105 Proben von Eiscreme, flüssiger Milch und von Milchpulver wurden mit dieser Methode analysiert. In 43.8% der Proben wurde Melamin gefunden; die Konzentrationen von 19 Proben lagen bei 0.01 bis 1mg/kg; 17 Proben hatten Konzentrationen von 1 bis 10mg/kg und 10 Proben überschritten 10mg/kg.

Nach wiederholter Verdünnung, um das quantitative Ergebnis zu erhalten, wurde eine Probe bei einer Konzentration von 6175mg/kg detektiert. Glücklicherweise lag der Gehalt bei den meisten Proben unter 1mg/kg oder wurde nicht nachgewiesen. Verglichen mit der GC-Methode mit einem Derivatisierungsschritt und der direkten Flüssigchromatographie-Tandemmassen-spektrometrie (LC/MS/MS), ist die direkte GC-MS Methode viel preiswerter und komfortabler bei der Handhabung in gewöhnlichen Laboratorien [XU et al., 2009].

Bei den meisten Methoden wird Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) angewandt, da Melamin und seine verwandten Substanzen kleine und polare Moleküle sind. Neueste Analysemethoden verwenden hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC). Dabei verwenden manche polare Reversed-Phase Säulen, Cyanosäulen oder Aminosäulen [TITTLEMIER, 2008].

Obwohl Melamin aufgrund seiner Größe und Polarität durch Reversed-Phase-Säulen gewöhnlich schlechter aufgetrennt wird, verwenden manche Methoden hauptsächlich Reversed-Phase-HPLC-Säulen. Zur Verbesserung der Auftrennung werden bei manchen Methoden Ionenpaarreagentien verwendet, wobei dies zu Störungen bei der MS führen könnte, andere verwenden Mehrfachsäulen in Serie, um die Separation zu verbessern [TITTLEMIER, 2008].

Häufig wird die hochselektive MS/MS-Methode (Tandemmassenspektrometrie) verwendet, dabei werden meist zwei Ionenübergänge für jeden Analyten überprüft, das Verhältnis dieser beiden Übergänge kann als weiteres Identifikationskriterium dienen. Bei HPLC-MS/MS wird für die Analyse von Melamin die positive Elektronen-Spray-Ionisation (ESI+) verwendet; für die Analyse von Cyromazin verwendet man die negative Elektronen-Spray-Ionisation. Für die Detektion von Melamin verwenden andere Methoden UV- oder Diodenarraydetektoren in Kombination mit HPLC, wobei diese weniger selektiv und in weiterer Folge auch weniger sensitiv sind als MS [TITTLEMIER, 2008].

Für die Analyse von Melamin mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay; Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) gibt es eine kleine Anzahl von kommerziell erhältlichen Testkits. Über die Eignung von ELISA zur Analyse von Cyanursäure, Ammelin, Cyromazin oder Ammelid sind nur wenige Informationen vorhanden, diese Testkits wurden bis jetzt nur von einzelnen Gruppen evaluiert und nicht von Gemeinschaftsstudien. Romer Labs bietet zwei kompetitive ELISAs an, wobei wenige Validierungsdaten für Milchprodukte (AgraQuant Melamine Sensitive Assay) vorhanden sind. Um die Probe mittels ELISA analysieren zu können, ist Einfachextraktion, Zentrifugation, Filtration und Verdünnung der Proben nötig [TITTLEMIER, 2008].

In der nachfolgenden Tabelle werden die gängigen Analysemethoden für Melamin zusammengefasst.

Methode	Grundsubstanzen	Analyten	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	VD	Referenz
HPLC-MS/MS	Säuglingsanfangsnahrung, Milch, Joghurt, auf Soja basierende Milchersatzprodukte	Melamin		0.004	Ja	Tittlemier (2008)
HPLC-MS/MS	Schweinefleisch, Fisch, Säuglingsanfangsnahrung	Melamin, Cyanursäure		0.025-0.2	Ja	Smoker & Krynitsky (2008)
HPLC-MS/MS	Säuglingsanfangsnahrung	Melamin, Cyanursäure		0.25	Ja	Turnipseed et al. (2008)
HPLC-MS/MS	Säuglingsanfangsnahrung, Milchpulver, Molkenprotein, Joghurt, Milch, Joghurtgetränke	Melamin, Cyanursäure	1	0.50-50	Nein	Canadian Food Inspection Agency (2008)
HPLC-MS/MS	Weizengluten, Milch	Melamin, Cyanursäure	0.005-0.05	0.02-0.20	Einige	Universität der Welfen (2008)
ELISA	Milch, Joghurtgetränke, Milchpulver, Joghurt, Eier, Kekse	Melamin	0.008-0.15	0.1-25	Einige	Romer Labs (2008)

Tabelle 1: Analysemethoden für den Nachweis von Melamin (LOD: Nachweisgrenze; LOQ: Quantifizierungsgrenze; VD: Validierungsdaten) [TITTLEMIER et al. 2008].

3 Verfälschung durch fremdes Fett

3.1 Das Milchfett

Die in der Milch enthaltenen Lipide werden allgemein als Milchfett bezeichnet. Dieses Fett ist ein komplexes Gemisch aus mehreren Lipidkomponenten, dabei unterscheidet man zwischen:

- dem Neutralfett, dazu zählen Mono-, Di- und Triacylglyceride
- den fettähnlichen Stoffen, wie Phospholipide oder Glykolipide
- den Isoprenoidlipiden, dazu zählen Steroide, Steroidhormone und Carotinoide
- den Fettbegleitstoffen, dazu gehören die fettlöslichen Vitamine, die Lipoproteine, die freien Fettsäuren, Alkanole und fettlösliche Aromastoffe.

Das Fett in der Milch ist in Form von kleinen Fettkügelchen mit einem Durchmesser zwischen 3µm und 6µm enthalten und bildet so die emulgierte Phase der Milch. Dieser Zustand wird durch den Aufbau der Fettkügelchen ermöglicht; der Fettkern wird von der Fettkügelchenhüllenmembran umgeben. Der Hauptlipidbestandteil des Kerns besteht zu 97 bis 98% aus Triacylglyceriden, wobei in diesem Triacylglyceridgemisch Di- und Monoacylglyceride, sowie Isoprenoide und Fettbegleitstoffe verteilt sind. Phospholipide und Glykolipide sowie Fettkügelchenhüllenproteine finden sich in der Fettkügelchenhüllenmembran. Im Milchserum sind ebenso Milchlipide - jedoch nur in Spuren - enthalten [TÖPEL, 2004].

Zum Unterschied zu anderen tierischen Fetten, vor allem Körperfetten, findet man eine Vielzahl von Fettsäuren und einen höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren. Über 400 Fettsäuren wurden im Milchfett identifiziert, wobei nur etwa 10 die physikalische Eigenschaften der Milch bestimmen; die kurzkettigen Fettsäuren C₄, C₆, C₈, C₁₀ und C₁₂ sowie die langkettigen C₁₄, C₁₆, C₁₈ C_{18:1(cis)} und C_{18:1(trans)}. Es finden sich sowohl gesättigte als auch ungesättigte, langkettige Fettsäuren; das Verhältnis dieser ist vorwiegend von der Fütterung abhängig. So können einige spezifische Kennwerte saisonbedingt schwanken, da zum Beispiel der Anteil an ungesättigten Fettsäuren im Sommer höher ist als im Winter [SPREER, 2005].

Milchfett ist auch heutzutage noch ein wertvoller Milchbestandteil; unter anderem durch seinen Nährwert, durch den angenehmen Geschmack und natürlich auch durch seinen positiven Beitrag zur Konsistenz und Textur fetthaltiger Milchprodukte [TÖPEL, 2004].

Die Bestimmung des Fettgehaltes spielt daher immer noch eine der wichtigsten Rollen in den milchwirtschaftlichen Laboratorien. Für keinen anderen Milch-inhaltsstoff liegen so viele Standards zur Bestimmung vor. Im Betrieb müssen die Resultate der Fettbestimmung rasch vorliegen, um den vorgeschriebenen Fettgehalt der Produkte zu gewährleisten. Dabei finden neben Eingangs- und Endkontrolle auch Untersuchungen der Zwischen- und Nebenprodukte statt [TÖPEL, 2004].

3.2 Zusatz von pflanzlichen Fetten

In den vergangenen Jahren haben Konsumenten immer mehr Interesse an Qualität, Sicherheit, Ernährung, gesundheitliche Aspekte und Lebensmittelkennzeichnung gezeigt. Auf dieses Konsumverhalten hat die Milchindustrie mit Marketingkampagnen reagiert, um das Kundenbewusstsein vermehrt auf die natürliche Ernährung durch Milchprodukte aufmerksam zu machen. Aufgrund solcher Werbestrategien wurden verfälschte Produkte gegenüber echten Produkten immer weniger wünschenswert.

Die zunehmenden Verfälschungen und Teilverfälschungen sind aber in der Milchindustrie zunehmend besorgniserregend; leider wird dieses Problem durch skrupellose Produzenten verschlimmert. Um Produktionskosten zu senken oder Wettbewerbsvorteile zu erreichen, wird in Milchprodukten teilweise oder sogar das ganze Milchfett durch billigeres pflanzliches Fett ersetzt [FOX et al., 1988].

Große Preisunterschiede zwischen Butterfett und Ersatzstoffen verursachen Verfälschung. Das in Butter oder Ghee enthaltene Milchfett wird oft mit anderen Fettarten aufgestockt; dabei sind pflanzliche Öle, hauptsächlich Baumwollsamensöl und Rindertalg die gängigsten Ersatzstoffe in Ägypten. Über einen Zeitraum von 13 Jahren wurden 27052 Proben von Butter und Ghee analysiert, von diesen enthielten 4472 Proben ein billigeres, verfälschendes Fett mit einem Durchschnittsgehalt von 16%. Viele bedeutende Länder haben ihre eigenen Qualitätsstandards festgesetzt, um die Authentizität von Butter zu gewährleisten. Der Nachweis basiert im Allgemeinen auf Struktur und Aufbau der Triglyceride, der Fettsäuren, auf der Zusammensetzung der unverseifbaren Anteile, das sind Sterole, Sterolester, Kohlenwasserstoffe, Tocopherole und Carbonylverbindungen [SINGHAL et al., 1997].

Die unterschiedliche Sterolzusammensetzung des Butterfetts und des verfälschenden Pflanzenfetts hat die Grundlage der Detektion gebildet, entweder durch Papierchromatographie, TLC oder Gasflüssigkeitschromatographie. Die Sterole im Butterfett sind zu über 99% Cholesterol und zu 0.4-1.2% Campesterol und Ergosterol; wohingegen Pflanzensterole, wie z.B. Baumwollsamensöl, hauptsächlich aus β -Sitosterol, γ -Sitosterol und Stigmasterol bestehen. Im Butterfett kommt β -Sitosterol überhaupt nicht vor; daher kann die Verfälschung von Butterfett mit Pflanzenfett durch einen Konzentrationsanstieg von β -Sitosterol und Stigmasterol und durch ein Absinken der Cholesterolkonzentration nachgewiesen werden. Der β -Sitosterol-Gehalt in Butter kann nach Zusatz von 0-6% Baumwollsamensöl von 0% auf 4.45% ansteigen. Bearbeitungsprozesse, wie Bleichen durch Bleicherde oder Aktivkohle, Desodorierung durch Dampfinjektion oder Hydrierung, können den Gehalt an Sterolen senken, in erster Linie durch Abbau des Cholesterols. Wie auch immer, Raffinationsschritte behindern den Phytosteroltest zum Nachweis von verfälschtem Butterfett nicht. Auf dieser Basis kann hingegen nicht zwischen Butterfett und einem Tierfett mit ähnlicher Sterolzusammensetzung, wie zum Beispiel Talg, unterschieden werden [SINGHAL et al., 1997].

In den 80er Jahren wurde eine präzise Methode entwickelt und standardisiert, um Verfälschungen zu entdecken. Diese Methode beruht auf der Separation der Triglyceride entsprechend ihrer Kettenlänge (Gesamtkohlenstoffzahl) durch Gasflüssigkeitschromatographie (GLC). Die Analyse der Triglyceride wird üblicherweise entweder durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), getrennt durch Verdampfungs-Lichtstreuungsdetektion, oder durch Gasflüssigkeitschromatographie unter der Verwendung von gepackten Säulen und Kapillarsäulen erreicht. HPLC benötigt keine hohen Temperaturen und vermeidet so den wärmebedingten Abbau der Lipide. Aufgrund des limitierten Bereichs des Detektors kann die Quantifizierung von verschiedenartigen Triglyceriden jedoch schwierig werden [DESTAILLATS et al., 2006].

Die standardisierte Methode wurde unter der Verwendung von gepackten Säulen entwickelt. Diese Technik ist aber nicht weit verbreitet, da diese Säulen kommerziell nicht erhältlich sind. Sowohl für die Detektion als auch für die Quantifizierung von möglichem fremdem Fett in Milch wurden Triglyceridformeln erstellt. In dieser standardisierten Methode wurde aber der Nachweis von einer Verfälschung mit partiell hydriertem Pflanzenfett nicht berücksichtigt. Wie von Molkentin und Precht (1997) beschrieben, kann der Gehalt an diesen pflanzlichen Fetten in Milch annähernd durch die Analyse des Gehalts an Buttersäure durch GLC bestimmt werden. Partiiell hydrierte Pflanzenfette werden bei der katalytischen Hydrierung von pflanzlichen Ölen, wie Sojabohnen-, Raps- oder Maiskeimöl erhalten. Charakteristisch für solche Fette ist die beträchtliche Menge an Transfettsäuren, die von Linol- und α -Linolensäure gebildet werden.

Die im Milchfett enthaltenen Transfettsäuren werden während der Biohydrierung gebildet und stammen von den mehrfach ungesättigten Fettsäuren, hauptsächlich von Linol- und α -Linolensäure.

Das hauptsächlichliche trans-18:1 Isomer in Milchfett ist die trans-11 18:1 Säure, diese beträgt ungefähr 45-50% der gesamten Transfettsäuren. In den partiell hydrierten Pflanzenfetten sind die hauptsächlichlichen trans-18:1 Isomere die trans-9 und trans-10 Säuren. Ein wichtiger Unterschied zwischen dem Ursprung dieser beiden trans- 18:1 Säuren liegt darin, dass Wiederkäuer(milch)fett einen geringen Gehalt an den Transfettsäuren hat (6g/100g Fettsäure), während die partiell hydrierten Pflanzenfette einen trans-18:1 Fettsäuregehalt von 10 bis zu 60g/100g Fettsäure erreichen können. Trotz mangelhaften wissenschaftlichen Beweises ist es möglich, dass die natürlichen Transfettsäuren der Milch unterschiedliche biologische Auswirkungen haben als die in den partiell hydrierten Pflanzenfetten [DESTAILLATS et al., 2006].

Daher ist es wichtig, analytische Methoden zu entwickeln, welche geeignet sind, eine Verfälschung von Milchfett und Milchprodukten, die Milchfett mit partiell hydriertem Pflanzenfett enthalten, nachzuweisen.

Destailats et al. (2006) entwickelten eine schnelle Methode unter der Verwendung von kurzen, offenen Rohrkapillarsäulen. Die entwickelten experimentellen Bedingungen können angewendet werden, um die chromatographische Auflösung zu erhalten, die in der standardisierten Vorgehensweise verlangt wird. Außerdem wird die Separation der Triglyceride des Milchfetts (C24 bis C54) in weniger als vier Minuten erreicht. Diese Methode wurde validiert und die Werte der relativen Reproduzierbarkeit wurden mit den Werten, die in der standardisierten Vorgehensweise erhalten wurde, verglichen: Diese Technik wurde angewendet, um eine Verfälschung von Milchfett mit partiell hydrierten Pflanzenfetten nachzuweisen. Zwei verschiedene Pflanzenfette mit unterschiedlichem Gehalt an trans-18:1 Säuren (13 und 38%) wurden dem Milchfett in einer Menge von 5-30% zugesetzt.

Die so erhaltenen Mischungen wurden durch Gas-Flüssigkeitschromatographie (Abbildung 5) analysiert und Formeln, die von der Europäischen Kommission ermittelt wurden, wurden angewendet. Die Autoren zeigten, dass das trans-9 18:1 Isomer ein guter Indikator für die Anwesenheit von partiell hydriertem Pflanzenfett in Milchfett ist. Die Verteilung der trans-18:1 Isomere war in den gemischten Proben, verglichen mit den originalen Profilen des Milchfetts, unterschiedlich. Die Ergebnisse verdeutlichten, dass kurze apolare Kapillarsäulen anstatt gepackter Säulen für den Nachweis einer Verfälschung mit partiell hydrierten Pflanzenfetten angewendet werden können. Außerdem wurde gezeigt, dass die erstellten mathematischen Modelle für die Detektion der Verfälschung geeignet sind [DESTAILLATS et al., 2006].

Auch physikalische Eigenschaften, gemessen durch Lichtbrechung, Differentialthermoanalyse, Differential-Scanning-Kalorimeter oder Infrarotspektroskopie, dienen als Nachweismethoden für die Verfälschung von Milchfett. Zur Bestimmung von hydriertem pflanzlichem Fett und Kokosfett zu 5% in Milchfett, kann das Differential-Scanning-Kalorimeter angewendet werden, aber nicht für den Zusatz von 5% Talg oder Schmalz in Butter. Kokosfett und Palmkernöl in Butter können mittels Differentialthermoanalyse identifiziert werden, wobei es nicht möglich ist, zwischen diesen beiden zu differenzieren. Eine Unterscheidung zwischen Palmöl und Rindertalg bei einer Konzentration von 5% ist aber möglich; bei 10% ist ganz eindeutig zu unterscheiden [SINGHAL et al., 1997].

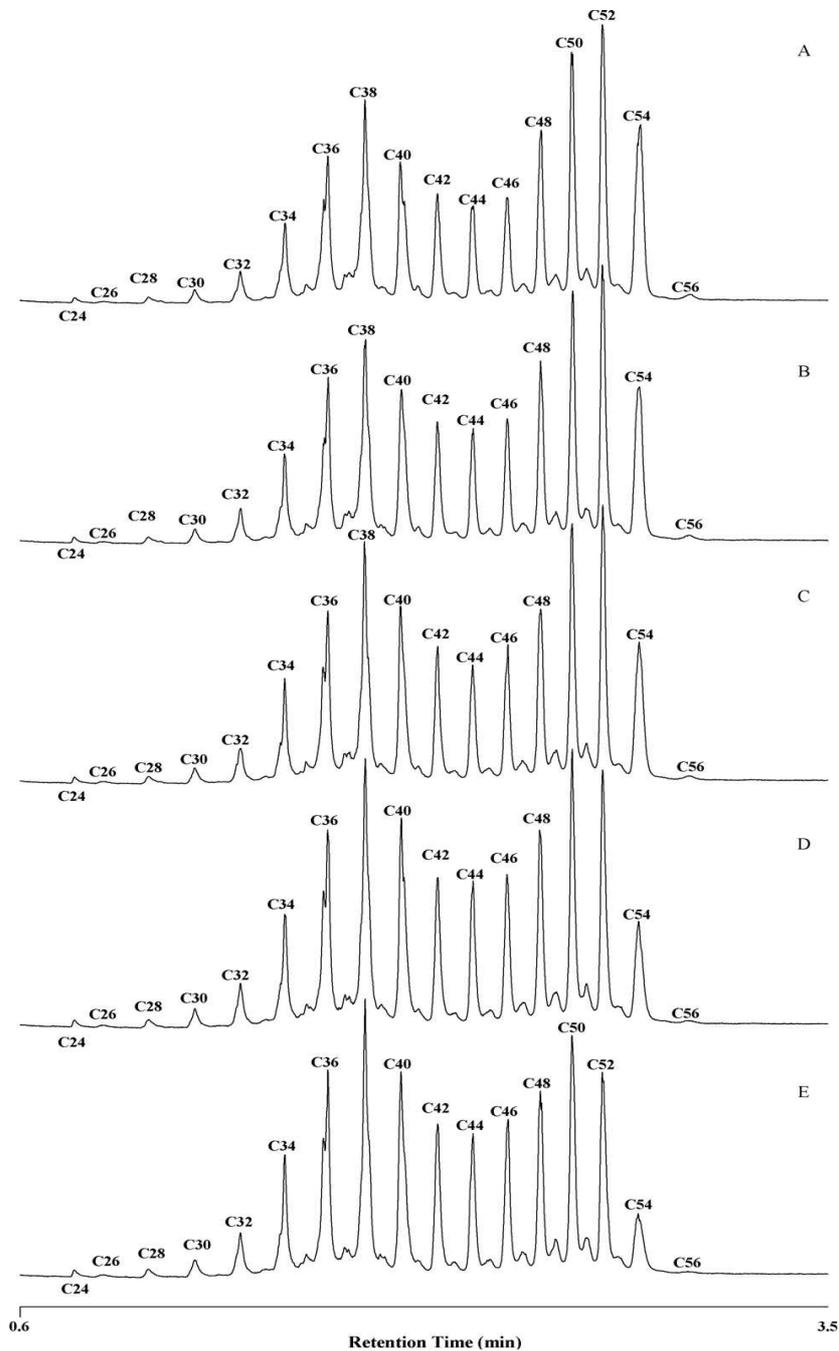


Abbildung 5: Gas-Flüssigkeitschromatogramme von Milchproben (A-D), die mit unterschiedlichen Mengen von partiell hydrierten Pflanzenfetten, die einen trans-18: 1 Isomer-Gehalt von 13.4g/100g Fettsäure haben, versetzt wurden. E: ist reine Milch. A: 20.2%; B: 16.0%; C: 12.1%; D: 5.0% und E: 0% [DESTAILLATS et al., 2006].

Ein direkter Weg um pflanzliche Fette, welche dem Milchfett zugesetzt wurden, nachzuweisen, ist die Analyse der Sterole. Der Grund dafür ist, dass Phytosterole im Milchfett in nicht messbaren Mengen auftreten, daher dient die Detektion von β -Sitosterol, Stigmasterol, Campesterol und dergleichen dem direkten Beweis, dass pflanzliches Fett zugesetzt wurde. Allerdings können die Minorkomponenten, wie zum Beispiel Lanosterol, in Chromatogrammen der unverseifbaren Anteile des Milchfetts nahe des β -Sitosterols eluieren; deshalb muss sorgfältig gearbeitet werden, um korrekte Schlüsse ziehen zu können. Eine Methode zur Bestimmung der Sterole im Milchfett basiert auf den unterschiedlichen Schmelzpunkten von Phytosterolacetat und Cholesterolacetat (IDF Standard 32:1965) [LEES, 2003].

Durch Schmelzpunktbestimmung und durch den Phytosterolgehalt können pflanzliche Öle, wie Maiskeimöl oder Reisöl über 2%, Kakaobutter, Raps-, Sesam-, Soja-, Leinsamen- und Erdnussöl über 5%, Kokosfett und Palmöl über 20% und Palmkernöl über 35% nachgewiesen werden. Cholesterolacetat hat einen Schmelzpunkt von 125°C; durch Zumischen von 6.25%, 12.5%, 25% und 50% Phytosterolacetat steigt der Schmelzpunkt um je 2°C, 5°C, 14°C und 18°C an. Die Sensibilität dieser Methode ist abhängig von der Menge des Phytosterols im Verhältnis zum vorhandenen Cholesterol. Die Art des anwesenden Phytosterols bestimmt den Anstieg der Schmelzpunktskurve, welche das Verhältnis Cholesterol: Phytosterol beschreibt [SINGHAL et al., 1997].

Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung beruht auf der Gas-Flüssigkeitschromatographie (IDF-Standard 54:1970). Von der EC wurde ebenso ein ähnliches Gas-Flüssigkeitschromatographie-Verfahren beschrieben, um β -Sitosterol und Stigmasterol nachzuweisen (Comission Regulation (EC) No. 213/2001). Als Alternative zu diesen langen Probenvorbereitungen, die in diesen Standards beschrieben sind, wurde eine LC-GC-Technik eingeführt.

Die Detektionsgrenze für die Bestimmung von β -Sitosterol liegt bei diesem Verfahren um einiges niedriger als bei den konventionellen Methoden, das Limit liegt nämlich bei 2mg/kg Fett anstatt bei 40mg/kg und 10mg/kg. Wenn man die Menge an β -Sitosterol, die in Rapsöl enthalten ist (ungefähr 400mg/kg), berücksichtigt, so könnte man einen Zusatz von etwa 0.05% Rapsöl im Milchfett identifizieren; wobei eine Verfälschung mit einem so geringen Gehalt nicht von Interesse ist. Wie auch immer, es können Zusätze von nur 1-2% Pflanzenfett mit Sicherheit nachgewiesen werden. Sogar bei Palmöl würde die Nachweisgrenze (0.5-1%) zur Identifikation ausreichen, wobei dies ein Vertreter mit einem nur sehr geringen Gehalt an β -Sitosterol (200-400mg) ist [LEES, 2003].

Bei Produkten wie Käse kann die Verfälschung von Milchfett durch hydriertem oder teilweise hydriertem Sojabohnenöl oder durch vergleichbare Pflanzenfette, wie Baumwollsamensamenöl oder Maiskeimöl, durch GLC detektiert werden. Dabei werden durch die GLC die Kalisalze der Fettsäuren, die nach Verseifung gewonnen werden, analysiert. Dies stellt eine Methode dar, welche Fettsäuren zu Kalisalzen umbaut und diese dann durch Gaschromatographie analysiert; ein wesentliches Problem, nämlich Probenverlust aufgrund von Verdampfung, wird eliminiert [SINGHAL et al., 1997].

Die Salze der Fettsäuren werden in den Gaschromatographen injiziert, in welchem das Trägergas mit Ameisensäure-Dampf gesättigt vorliegt. In dieser sauren Umgebung werden die Salze wieder zu freien Fettsäuren umgewandelt und können als solche analysiert werden [FOX et al., 1988].

Die charakteristische Zusammensetzung einiger Verfälschungsmittel, wie zum Beispiel Sesamin oder Sesamol in Sesamöl, kann ebenfalls als Indikator einer Verfälschung dienen. Durch verschiedene substanzspezifische Farbreaktionen kann das Verfälschungsmittel nachgewiesen werden [SINGHAL et al., 1997].

Als Hinweis für eine Verfälschung durch Pflanzenfett kann ebenso der Tocopherolgehalt in Butterfett dienen [SINGHAL et al., 1997].

Milchfett ist eine relativ schlechte Quelle für Vitamin E (20 bis 40µg/g), wohingegen pflanzliche Öle (Maiskeim-, Soja-, Baumwollsaamenöl) reich an diesem Vitamin sind (500 bis 1500µg/g). Eine Verfälschung von nur 2 bis 3% würde den normalen Vitamin E-Gehalt von Milchfett verdoppeln und würde so die Probe relativ verdächtig machen. Das einzige pflanzliche Fett, welches mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden kann, ist das Kokosfett, da sein Vitamin-E-Gehalt dem der Milch gleicht. Dieser Screening-Test beruht auf der kalorimetrischen Bestimmung von eisenreduzierenden Substanzen wie Tocopherol [KEENEY et al., 1971].

3.3 Zusatz von tierischem Fett

Obwohl sich der Fettsäure- und Triglyceridaufbau von reinem Nicht-Milchfett beträchtlich von dem Aufbau von Milchfett unterscheiden kann, ist es schwierig, den Zusatz von kleineren Anteilen an fremden Fetten, wie Rindertalg, nachzuweisen. Dies wird verursacht, weil der Aufbau des Milchfettes durch andere Dinge wie Fütterung, Jahreszeit oder Rasse schwankt [MOLKENTIN, 2007].

Die offizielle EU Methode für die Evaluierung der Reinheit von Kuhmilchfett basiert auf der gaschromatographischen Analyse von Triglyceriden, welche entsprechend ihrer Gesamtanzahl an Kohlenstoffatomen getrennt werden. Die Triglyceride, welche insgesamt 24-54 Kohlenstoffatome haben, werden gemeinsam mit dem Cholesterinpeak berücksichtigt. Der Prozentanteil von jedem Triglycerid wird ermittelt und dann in fünf spezifische Formeln, welche von multiplen linearen Regressionen hergeleitet wurden, eingefügt. Diese Formeln produzieren fünf S-Parameter, die für echtes Kuhmilchfett in die

entsprechenden Grenzen fallen müssen. Sollte nur einer von diesen Parametern außerhalb der Grenzen liegen, wird das Milchfett als verfälscht beurteilt. Die Methode wurde aufgebaut indem gepackte Säulen verwendet wurden, aber verschiedene folgende Arbeiten zeigten seine Tauglichkeit ebenso mit der Aufnahme von moderneren Anordnungen, wie Kapillarsäulen, Einfachsäulen und PTV Injektionssysteme. Die offizielle Methode berichtet über spezifische Anforderungen betreffend der Kontrolle von Messungsbedingungen und von der Genauigkeit der Methode (Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit) [POVOLO et al., 2008].

In den vergangenen Jahren haben sich gaschromatographische Techniken und Messausrüstungen, welche die Analyse in einer sehr kurzen Zeit durchführen können, dank der Einführung der elektronischen Druckkontrolle des Trägergases und des Hochfrequenzflammenionisationsdetektors verbreitet. Die hauptsächlich instrumentellen Parameter, welche die Geschwindigkeit der Gaschromatographie beeinflussen, sind auf der einen Seite der Säuleninnendurchmesser und die Länge der Säule, auf der anderen Seite die Heizraten und die Fließgeschwindigkeiten. In der Forschungsarbeit von Povoletto et al. (2008) wurde die Ultrafast-Modul-Gaschromatographie (UFM-GC) für die Analyse von Triglyceriden entsprechend der offiziellen Methode getestet. Die UFM-GC Technik verwendet eine Kapillarsäule, welche direkt resistiv beheizt wird. Diese Säule ist vollständig mit einem Widerstand ausgekleidet, welcher sie beheizt. Diese besondere Apparatur ermöglicht Raten von bis zu 20°C/s und es können Analysezeiten von weniger als eine Minute erreicht werden. Pures Milchfett wurde gemeinsam mit Mischungen von Milchfett, welche vier verschiedene Fettarten (Kokosfett, Sonnenblumenöl, Schweinefett und Rindertalg) enthielten, analysiert. Diese Analysen wurden sowohl mit der konventionellen Kapillar-GC-Methode durchgeführt als auch mit der UFM-GC. Das Milchfett von Schaf, Ziege und Büffel wurde ebenso analysiert. Für die Kalibrierung wurde das Referenzmaterial CRM 519 verwendet [POVOLO et al., 2008].

Wiederholbarkeitswerte und Reproduzierbarkeitswerte lagen immer unter den Grenzen, welche in der offiziellen Methode angegeben wurden (siehe Abbildung 6). Damit wird demonstriert, dass die UFM-GC- Methode eine geeignete Analyse ist, um die Reinheit des Milchfettes zu bewerten. Die Untersuchung von Schaf-, Ziegen-, und Büffelmilchfett bestätigte, dass die S-Bereiche, welche für Kuhmilchfett kalkuliert wurden, für die Analyse der Echtheit von Milchfett, welches nicht von der Kuh stammt, nicht geeignet ist [POVOLO et al., 2008].

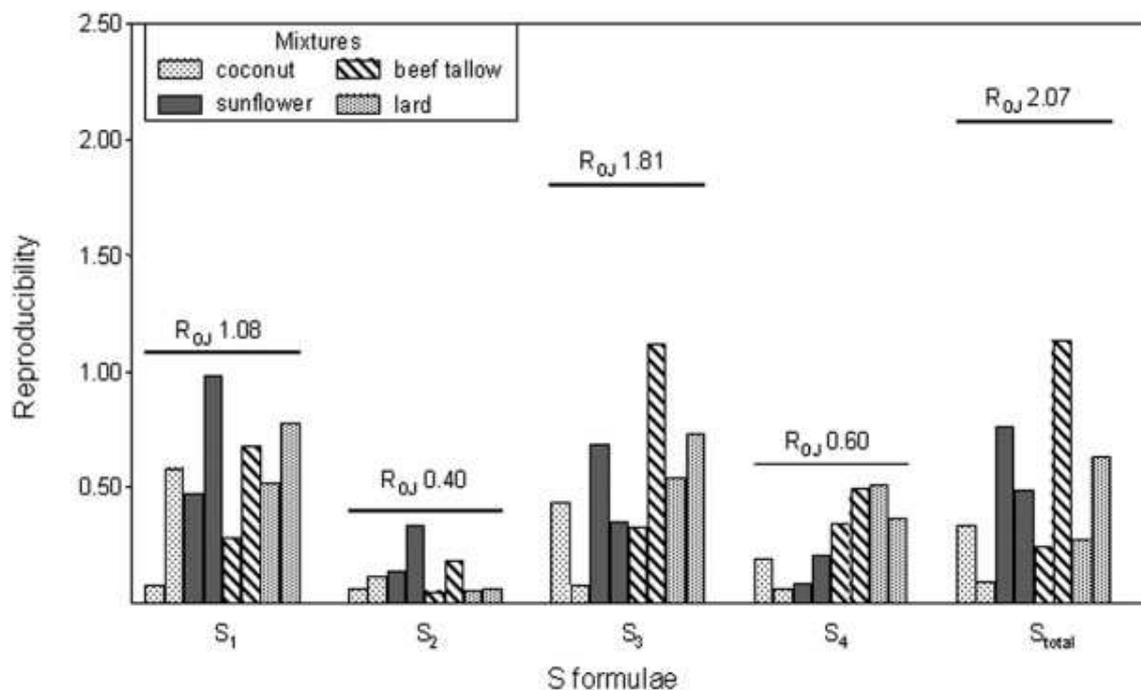


Abbildung 6: Reproduzierbarkeitswerte, welche mit den Ergebnissen der konventionellen GC und der UFM-GC berechnet wurden (ROJ, Reproduzierbarkeitsgrenzen, die von der offiziellen Methode berichtet wurden; der erste Balken beschreibt eine Zusatz von 7%, der zweite Balken einen Zusatz von 14% [POVOLO et al., 2008]

Verschiedene Methoden wurden in der Vergangenheit entwickelt, um die Reinheit von Milchfett zu ermitteln. Diese basieren hauptsächlich auf physikochemischen Konstanten, auf dem Fettsäureprofil, auf der Analyse von Sterolen und auf dem Verhalten der partiellen Kristallisierung. Aber all diese Methoden leiden mehr oder weniger unter Beschränkungen [KUMAR et al., 2009].

Der Lichtundurchlässigkeitstest zum Beispiel, welcher auf dem Verhalten der partiellen Kristallisierung beruht, wurde als einer der Kriterien verwendet, um die Verfälschung von Milchfett durch tierisches Fett nachzuweisen. Der Test wird ausgedrückt als die Zeit, die eine geschmolzene Fettprobe benötigt, um eine bestimmte Undurchsichtigkeit zu erreichen. Jedoch gibt dieser Test kein klar abgeschlossenes Konzept bezogen auf den Beginn der Kristallisation, daher entsteht eine gewisse Uneindeutigkeit. Dieser Test erfordert ebenso den Gebrauch eines Spektrophotometers oder eines Kalorimeters. Um solche Limitationen zu überwinden, untersuchten Kumar et al. (2008) in ihrer Forschungsarbeit das sichtbare Erstarrungsverhalten bezogen auf die Zeit, welche ein geschmolzenes Fett benötigt, um bei einer gegebenen Temperatur sichtbar zu erstarren. Es wurde also ein „sichtbarer Erstarrungstest“ entwickelt, um fremdes Fett und fremde Öle in Milchfett nachweisen zu können. Die Untersuchungen des Erstarrungsverhaltens von verschiedenen Ölen und Fetten, einschließlich des Milchfetts, bei einer definierten Temperatur deckten auf, dass die durchschnittlichen Werte der Erstarrungszeit für Büffelmilchfett bei 2min und 40s beträgt beziehungsweise für Kuhmilchfett 3min und 10s. Für Schweinkörperfett, Ziegenkörperfett und für hydrierte pflanzliche Fette lagen die durchschnittlichen Werte jeweils bei 1min 30s, 40s und bei 1min 50s. Es wurde herausgefunden, dass ein Zusatz von pflanzlichen Ölen einen Anstieg der Erstarrungszeitwerte von reinem Büffel- und Kuhmilchfett verursacht, während ein Zusatz von Körperfetten oder von hydrierten pflanzlichen Fetten ein Absinken der Werte verursacht [KUMAR et al., 2009].

Während Phytosterole pflanzliche Fette nachweisen können, werden tierische Fette in geringen Mengen nicht einfach gefunden. Verschiedene Methoden wurden vor Jahren von diversen Autoren vorgeschlagen, aber jede von ihnen hat ihre Grenzen.

Es wurde von chromatographischen Techniken berichtet, welche Mischungen von Glyceriden durch die Verwendung von verschiedenen Lösungsmittelsystemen trennen und identifizieren konnten, jedoch lieferte diese Methode keine zufrieden stellenden Ergebnisse hinsichtlich der Detektion von tierischem Fett. Durch Trennung der unverseifbaren Anteile der Fettsäuren mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender Gaschromatographie, wiesen Kuzdal et al. (1975) tierisches hydriertes Fett in Butter nach. Colombini et al. (1978) nutzten die UV-spektrometrische Analyse in einem Bereich von 220nm und 420nm um erfolgreich 10% Schweineschmalz in Butter nachzuweisen, jedoch konnte Rindertalg nicht detektiert werden. Die Grossfield Zahl oder die Buttersäurezahl, zum Beispiel, ist eine Messung der Buttersäure. Sie kann anstelle des Reichert-Meissel Wertes verwendet werden. Jedoch kann diese Methode tierisches Fett bei einem Gehalt von 10% oder weniger nicht nachweisen [SINGAHL et al., 1997].

4 Zusatz von Milch anderer Spezies

Die Milchindustrie ist verantwortlich für eine facettenreiche Gruppe von wirtschaftlich bedeutenden Produkten, wie Milch, Butter, Joghurt und Käse. Kuh-, Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch werden hauptsächlich für die Herstellung dieser Produkte verwendet. Die Mehrheit der westlichen Bevölkerung konsumiert Kuhmilch, daher ist sie auch die dominierende Milch am Markt. Gründe für das Vermeiden von Kuhmilch können folgende sein: Intoleranz oder Allergie; religiöse, ethische oder kulturelle Bedenken; persönliche Vorlieben; und dass Kuhmilch für Spezialprodukte, wie Feta oder Mozzarella-Käse nicht geeignet ist. Das Interesse an authentischen und richtig gekennzeichneten Produkten, vor allem bei sortenreinen traditionellen Produkten, steigt bei den Konsumenten immer mehr an [HURLEY et al 2004].

Hinsichtlich Lebensmittelauthentizität wurde die Artenidentifizierung von tierischen Produkten in den letzten Jahren zu einem wichtigen Thema. Ein Schutz gegen Substitution oder Zumischung von Arten ist wegen allergischen und religiösen Einschränkungen und auch wegen staatlichen Regulierungen von Bedeutung. Zum Beispiel wird Ziegenmilch, wegen der geringeren Kosten, oft zur Produktion von Käsesorten hinzugefügt, diese werden dann irreführend mit einer teureren milchproduzierenden Spezies deklariert, wie etwa „reine Schafsmilch“. Um unfairen Wettbewerb zu vermeiden und ehrliche Lebensmittelkennzeichnung zu gewährleisten, ist es nötig, gute analytische Methoden für die Milchindustrie und die Exekutivorgane zu entwickeln um die Verfälschung von Milch in Angriff nehmen zu können [LOPEZ-CALLEJA et al., 2005].

Der hauptsächliche Weg um Milch von verschiedenen Arten differenzieren zu können, liegt im unterschiedlichen molekularen Aufbau der Milchproteine. Um diese Unterschiede ausfindig zu machen, werden verschiedene analytische Methoden, wie diverse Formen der Elektrophorese, der Chromatographie oder der Immunchemie angewendet [LEES, 2003].

Elektrophoretische und immunologische Techniken sind wahrscheinlich die wichtigsten Methoden zur Artencharakterisierung von Milch und Milchprodukten. Amigo et al. (1992) führten einen Vergleich zwischen der Elektrophorese (PAGE), der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) und der Radialimmunodiffusion durch. Eine gute quantitative Übereinstimmung hatten PAGE- und IEF-Methoden.

Die Analysenmethode durch Immundiffusion stimmte qualitativ mit den anderen Methoden zu 90% der analysierten Fälle überein. Bedauerlicherweise wurden drei Proben, die Ziegenmilch enthielten und zwei Proben, die Kuhmilch enthielten, in 52 analysierten Proben von dieser einfachen und schnellen Methode nicht detektiert. In dieser Studie konnte man nur bei 36,5% der Proben echten Schafsmilchkäse nachweisen, 52% enthielten Ziegenmilch und 9,6% stammten von der Kuh [DENNIS, 1996]

4.1 Verschiedene Arten der Elektrophorese

Die Trennung der Milchproteine durch verschiedene Arten der Elektrophorese ist eine der meist angewandten Formen zur Authentifikation von Milchprodukten. Frühe Versuche von Aschaffenburg und Dance (1968), von Foissy (1976) und von Freimuth und Krause (1968) fixierten sich auf die höhere elektrophoretische Beweglichkeit von α_{s1} -Casein der Kuhmilch in Polyacrylamid-Gel (PAGE) verglichen mit der von Schaf- oder Ziegenmilch [LEES, 2003].

Diese Autoren berichteten, dass der Zusatz von einem Prozent Kuhmilch in Ziegenmilch detektiert werden kann. Da das Casein während der Käsereifung teilweise abgebaut wird, verdecken neu gebildete Peptide zu einem gewissen Grad die Region des Kuh- α_{s1} -Caseins. Dadurch nimmt die Empfindlichkeit dieser Methode ab und die Ergebnisinterpretation wird viel diffiziler [LEES, 2003].

Alkalische Urea-Polyacrylamidgel Elektrophorese ist eine der ältesten Methoden zur Detektion von Milchsicherungen von verschiedenen Arten.

Wie in Abbildung 7 gezeigt wird, kann das α_{s1} -Casein der Kuhmilch als Marker für die Präsenz von Kuhmilch in Schafmilch und auch in Ziegenmilch dienen. In gereiften Käsesorten, welche einen gewissen Grad an Proteolyse zeigen, ist diese Technik jedoch nicht brauchbar, da verschiedene Abbauprodukte des Caseins, welche während der Reifung auftreten, ähnliche elektrophoretische Mobilität, wie die des α_{s1} -Caseins der Kuhmilch zeigen. Urea-PAGE kann daher nur als sichere Methode zur Detektion von Kuhmilch in Milch von anderen Arten dienen, wenn keine nennenswerten proteolytischen Veränderungen aufgetreten sind und darf nicht bei gereiften Käsesorten angewendet werden [MAYER, 2005].

Als Alternative zur Bestimmung von Kuh-Casein in Milch und Milchprodukten verwendeten Mayer und Hörtnner (1992) die diskontinuierliche Elektrophorese von β -Casein [LEES, 2003]. Störende Proteinbanden als Konsequenz von Reifeprozessen oder Veredelungsschritten wurden nicht entdeckt. Der Bereich der Quantifikation in Relation zum Gesamt-Casein erstreckt sich von 5 bis etwa 70% Kuh-Casein [MAYER und HÖRTNER, 1992].

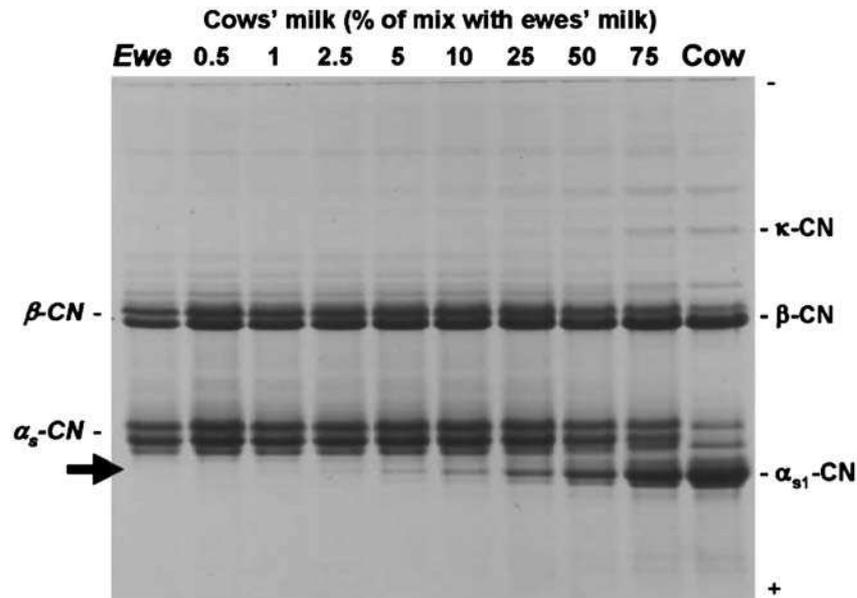


Abbildung 7: UREA-PAGE Analyse der Casein Fraktion von Standardmischungen von Kuh- und Schafmilch [MAYER, 2005]

Polyacrylamidgel-Isoelektrische-Fokussierung (PAGIF) wurde wegen seiner hohen Separationsrate zu einer bevorzugten Technik bei der Auftrennung von komplexen Proteinmischungen. Krause et al. (1982) nützten bei der Anwendung dieser Technik γ -Caseine, proteolytische Abbauprodukte von β -Casein, als Indikator zur Detektion von Kuhmilchbeimischung zu Schaf- und Ziegenmilch beziehungsweise zu Schaf- und Ziegenkäse. Bei dieser Analysenmethode kann zwischen Schaf- und Ziegenmilch nicht differenziert werden. Die absichtliche Zugabe von Plasmin zu Käsecasein, um ψ -Casein zu erzeugen und die darauf folgende Separation durch PAGIF, steigert die Empfindlichkeit der Methode maßgeblich. Diese Technik wurde offiziell angenommen (Commission Regulation EC No., 213/2001) um innerhalb der EU Käse zu kontrollieren [LEES, 2003].

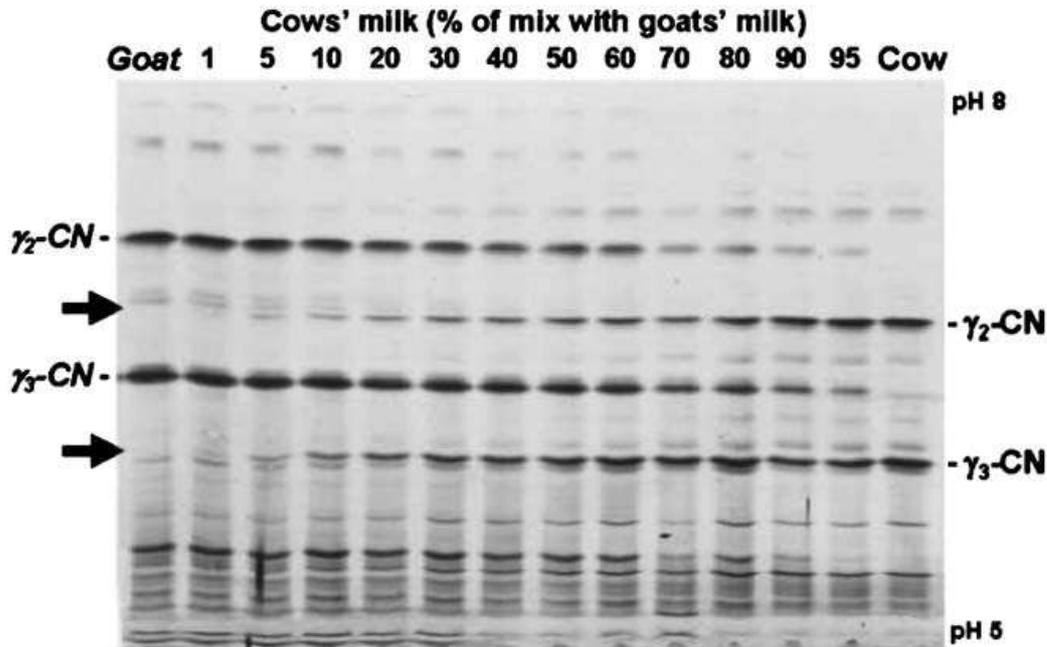


Abbildung 8: IEF Banden von γ -Caseine, die aus Mischungen von Kuh- und Ziegenmilch stammen [MAYER, 2005].

Die Auswertung wird durchgeführt, indem die Proteinmuster von der unbekannt Probe mit Referenzstandards verglichen werden. Der Nachweis von Kuhmilch in Käsesorten von Schaf-, Ziegen- oder Wasserbüffelmilch oder Mischungen von diesen wird anhand des γ_3 - und γ_2 -Caseins gemacht, dessen isoelektrische Punkte liegen zwischen pH 6.5 und pH 7.5. Dabei liegt die Nachweisgrenze bei weniger als 0.5%. Die Methode ist anwendbar für einen empfindlichen und spezifischen Nachweis von nativer und hitzebehandelter Kuhmilch und Caseinat in frischem und gereiftem Käse, hergestellt aus Nicht-Kuhmilch, jedoch kann sie nicht angewendet werden bei der Detektion von Milch und Käse, die durch Konzentrate von hitzebehandelter Kuhmolke verfälscht wurden [LEES, 2003].

PAGIF von para- κ -Casein erlaubt sowohl den Nachweis von zugesetzter Kuhmilch zu Käsesorten von verschiedenen Spezies, als auch die Differenzierung zwischen Käsesorten, die entweder vom Schaf oder von der Ziege stammen. Diese Analysenmethode kann auf andere Milchprodukte erweitert werden. Der Zusatz von Chymosin zu Schafsjoghurt um para- κ -Casein künstlich herzustellen und die folgende Auftrennung der Caseine durch kationische PAGE erlaubt den Nachweis von Kuhmilch bis zu einem Prozent [LEES, 2003].

4.1.1 Elektrophoretische Trennung der Molkenproteine

Die Differenzierung von Milch von verschiedenen Arten kann ebenfalls auf der analytischen Separation von Molkenproteinen basieren, zum Beispiel wird HPLC oder Elektrophorese angewendet [MAYER, 2005].

Durch die Proteolyse während der Käsereifung werden die Molkenproteine nicht sonderlich modifiziert. Um diese Eigenschaft ausreichend nutzen zu können, wurden Trennungssysteme entwickelt, die auf den unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten der Molkenproteine, im speziellen auf der Beweglichkeit des β -Lactoglobulins, beruhen [LEES, 2003].

In Abbildung 9 werden die elektrophoretischen Muster der Molkenproteine von Kuh-, Schaf-, Ziegen- und Stutenmilch gezeigt. Aufgrund der Tatsache, dass das β -Lactoglobulin der Kuhmilch eine viel höhere elektrophoretische Mobilität aufweist als alle anderen Proteinfractionen, kann der Nachweis von Kuhmilch in Mischungen, basierend auf nativer PAGE von Molkenproteine, äußerst erfolgreich sein [MAYER, 2005].

Der Nachteil dieser Methode ist, dass Hitzebehandlung die Proteine zu einem gewissen Ausmaß denaturiert und auf diese Weise die Testergebnisse beeinflusst [LEES, 2003].

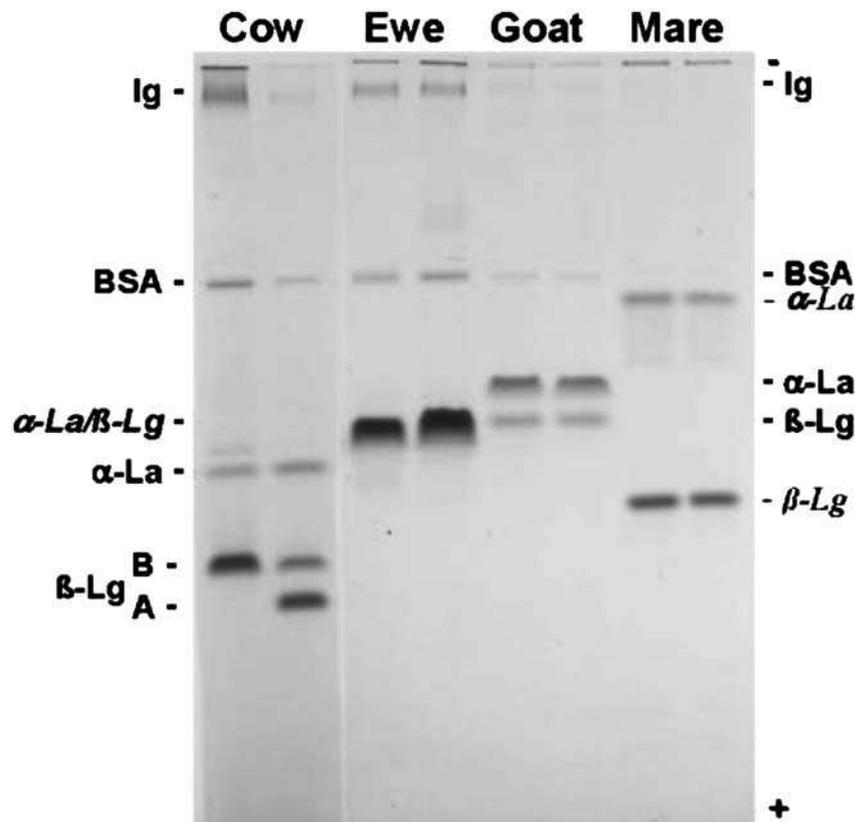


Abbildung 9: UREA-PAGE Analyse der Molkenproteine von Kuh-, Schaf-, Ziegen- und Stutenmilch [Mayer, 2005]

Die Isoelektrische Fokussierung von Molkenproteinen ist eine Standardmethode (DIN, 1995), welche für den Nachweis von Kuhmilch in Molkenkäse, wie Ricotta, empfohlen wird. Wie in Abbildung 10 gezeigt wird, konzentrieren sich α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin in der anodischen Region, während die Fraktionen der Molkenproteine von Schaf- und Ziegenmilch sich vermehrt bei den basischen isoelektrischen Punkten zeigen. Wird jedoch erhitzte Kuhmilch oder Caseinat zur Verfälschung von Käse verwendet, wird diese Methode vermutlich falsch negative Resultate zeigen [MAYER, 2005].

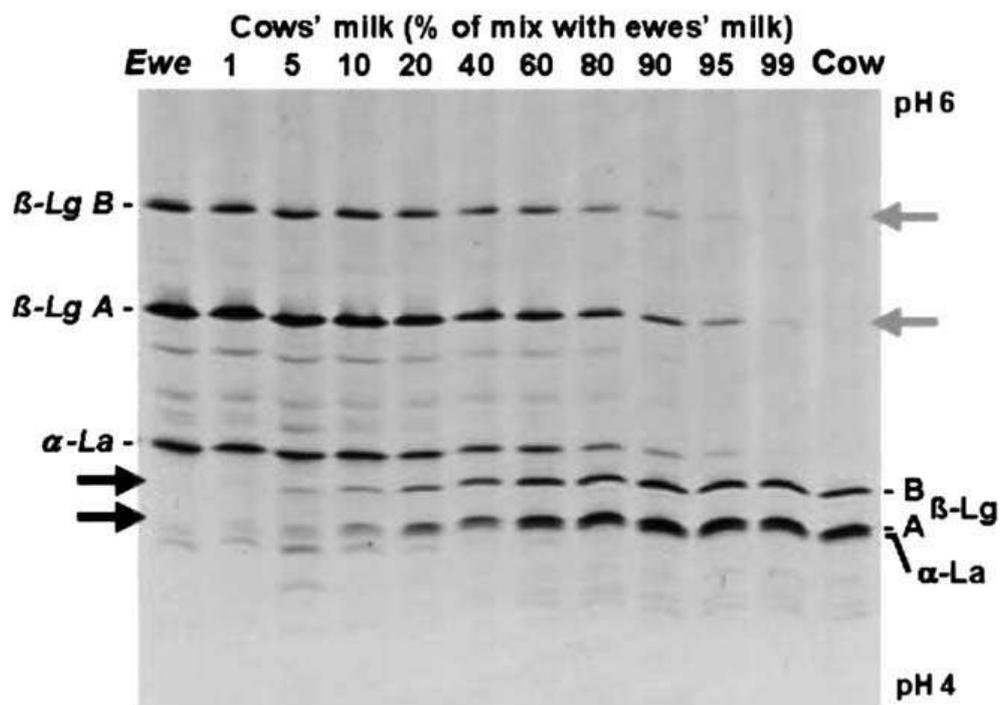


Abbildung 10: IEF-Banden der Molkenproteinfraktionen von Standardmischungen von Kuh- und Schafmilch [Mayer, 2005].

4.2 Immunchemische Nachweismethoden

4.2.1 Nachweis durch Immunoassays

Aufgrund der ausgezeichneten Empfindlichkeit und der minimalen Probenaufbereitung erfreuen sich immunchemische Methoden einer weiten Akzeptanz, um zwischen Milchsorten von verschiedenen Spezies zu unterscheiden. Viele der Analysen zielen das β -Casein der Kuhmilch an, da diese Fraktion das höchste allergische Potential unter allen Caseinarten hat. Für die meisten Analysen liegt die Detektionsgrenze bei 0.1-1.0%, abhängig vom jeweiligen Format. Am Markt finden sich kommerzielle Teststreifen, welche sich einer weit verbreiteten Anwendung erfreuen [LEES, 2003].

Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) kann in Abhängigkeit von der Art der Quantifizierung oder der Detektion der Antigene oder Antikörper an eine Vielzahl von Formaten angepasst werden. Bei einem direkten Test zum Beispiel ist der Analyt an einer soliden Phase gebunden und wird durch Addition an einen markierten Antikörper nachgewiesen. Die indirekte Methode weist den Analyten in der soliden Phase durch Bindung an einen primären Antikörper gefolgt von einem sekundären markierten Antikörper nach. Eine Form des direkten ELISAs ist der SANDWICH-ELISA bei dem der Analyt durch einen Antikörper, welcher auf einer Platte gebunden ist, eingefangen wird und durch einen zweiten markierten Antikörper, der spezifisch für ein fremdes Epitop des Analyten ist, detektiert. Kompetitive Tests können entweder direkt oder indirekt sein; sie beinhalten ein plattengebundenes Antigen, das in Konkurrenz um eine freie Antikörperbindungstelle mit dem Probeanalyten steht [HURLEY et al., 2004a].

In den zwei nachfolgenden Tabellen sind die Details der verschiedenen Immunotests, die zur Detektion von Kuh- oder Ziegenmilch in Milchsorten anderer Spezies entwickelt wurden, zusammengefasst

Verfälschte Probe	Zielantigen	Methoden	Detektionsgrenze der Verfälschung in Prozent
Schafmilch	Kuh-Casein	Sandwich-ELISA	1
Schafskäse	Kuh-Casein	Sandwich-ELISA	1
Schaf- oder Ziegenkäse	natives und hitzedenaturiertes β -Lactoglobulin der Kuh	Indirekter kompetitiver ELISA	0,1-1,2
Schaf- oder Ziegenmilch	Kuh- γ 3 Casein	Indirekter kompetitiver ELISA	0,1
Schaf- oder Ziegenkäse	Kuh- γ 3 Casein	Indirekter kompetitiver ELISA	0,1
Schafmilch	Kuh- β Casein	Immunostick-ELISA	1
Schafskäse	Kuh- β Casein	Immunostick-ELISA	0,5
Ziegen- oder Schafmilch	β -Lactoglobulin der Kuh	Sandwich-ELISA	0,1
Schafmilch	Kuh IgG	Immunoblotting	1
Ziegen-, Schaf- oder Büffelmilch	Kuh IgG	indirekter kompetitiver ELISA	0,1

Tabelle 2: Immunologische Methoden zur Detektion von Milchprodukten, die mit Kuhmilch verfälscht wurden [HURLEY et al., 2004a]

Verfälschte Probe	Zielantigen	Methoden	Detektionsgrenze der Verfälschung in %
Schafmilch	Ziegenmolkenprotein	Sandwich-ELISA	1
Schafmilch	Ziegenmolkenprotein	Indirekter ELISA	1
Schafmilch	Ziegen α_2 Casein	Indirekter ELISA	0,5

Tabelle 3: Immunologische Methoden zur Detektion von Milchprodukten, die mit Ziegenmilch verfälscht wurden [HURLEY et al., 2004a]

Caseine sind relativ hitzestabile Proteine und sind als solche gebräuchliche Zielantigene in ELISAs, um eine Verfälschung von hitzebehandelter Milch nachzuweisen. Trotzdem wurden zahlreiche Arten von Antigenen verwendet, wie zum Beispiel, Casein (β - oder γ -Casein), β -Lactoglobuline, Immunglobulin (IgG) oder andere Molkenproteine. Die Art der verwendeten Antikörper beeinflusst die Effizienz eines ELISAs, dabei sind die polyklonalen Antikörper normalerweise nicht so spezifisch wie monoklonale [HURLEY et al, 2004a].

Trotz des Problems der Differenzierung zwischen den Milchproteinen von nahverwandten Spezies, wie bei Kuh und Büffel, verwenden die meisten der immunologischen Methoden polyklonale Antiseren (β -CN, γ -CN, β -Lactoglobuline oder andere Molkenproteine), um eine Verfälschung von Milch nachzuweisen. IgG, ein weiteres Protein, das in Milch gefunden wurde, wurde erfolgreich als Zielantigen in einem einfachen ELISA verwendet. Zusätzlich wurden zahlreiche kommerzielle ELISAs entwickelt, die jedoch nicht zwischen Kuhmilch und Büffelmilch unterscheiden können [HURLEY et al., 2004b].

Tests, die polyklonale Antikörper verwendet haben, konnten Kuhmilch erfolgreich in folgenden Produkten nachweisen: in Schaf- und Ziegenmilch, in Schaf- und Ziegenkäse; außerdem konnte mit dieser Methodik Ziegenmilch in Schafmilch detektiert werden. Die polyklonalen Antikörper, welche in diesen Tests verwendet wurden, wurden nach ihrer Affinität aufbereitet [HURLEY et al., 2004a].

Eine alternative Methode ist die Produktion von monoklonalen Antikörpern. Kuhmilch wurde durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern in Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch und in Schafkäse erfolgreich nachgewiesen, der Zusatz von Ziegenmilch in Schafmilch konnte ebenso nachgewiesen werden. Alle Methoden, die in Tabelle 1 und 2 aufgelistet sind, erfüllen das Ziel der Europäischen Kommission, eine einprozentige Verfälschung nachzuweisen. Nur ein Test, basierend auf IgG, ist imstande, Kuhmilch in Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch nachzuweisen [HURLEY et al., 2004a].

Hurley et al. (2004b) entwickelten in ihrer Studie einen indirekten kompetitiven ELISA, der sowohl sensitiv als auch spezifisch ist, um Kuhmilch in Milch von anderen Spezies nachzuweisen. Dabei musste das Zielantigen und der Antikörper sorgfältig ausgewählt werden, um einen optimalen ELISA zu entwickeln. Immunglobulin G ist hoch immunogen und als Zielantigen für die Speziation der Milch geeignet. Das in dieser Studie verwendete antibovine IgG ist hoch spezifisch, hoch sensitiv und leicht anwendbar. Diese Studie hat gezeigt, dass dieser optimierte indirekte kompetitive ELISA Kuhmilch in Ziegen-, Schaf- oder Büffelmilch mit einer Detektionsgrenze von 0.1% nachweisen kann (Abbildung 11/12), wobei keine signifikanten Kreuzreaktionen aufgetreten sind. Diese Methode funktioniert ebenso bei pasteurisierter Kuhmilch, bei unerhitzter Milch wie auch bei zuvor eingefrorener Milch. Allerdings ist es nicht möglich, mit diesem Test bovines IgG in ultrahoch erhitzter Milch und in fettfreier getrockneter Milch, die rekonstruiert wurde, nachzuweisen [HURLEY et al., 2004b].

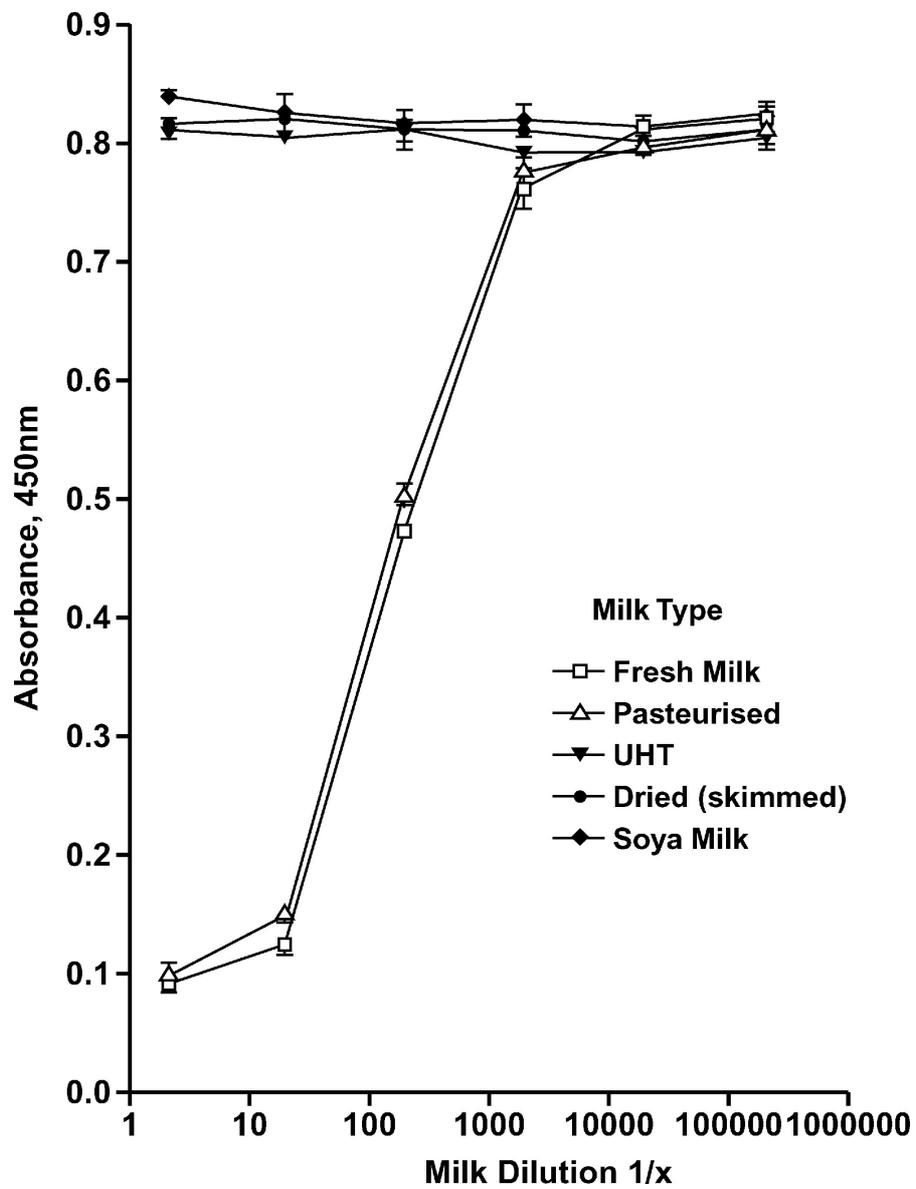


Abbildung 11: Nachweis von Kuhmilch in verfälschten Proben von Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch unter der Verwendung des optimierten indirekten kompetitiven ELISAs für bovines IgG [HURLEY et al., 2004b]

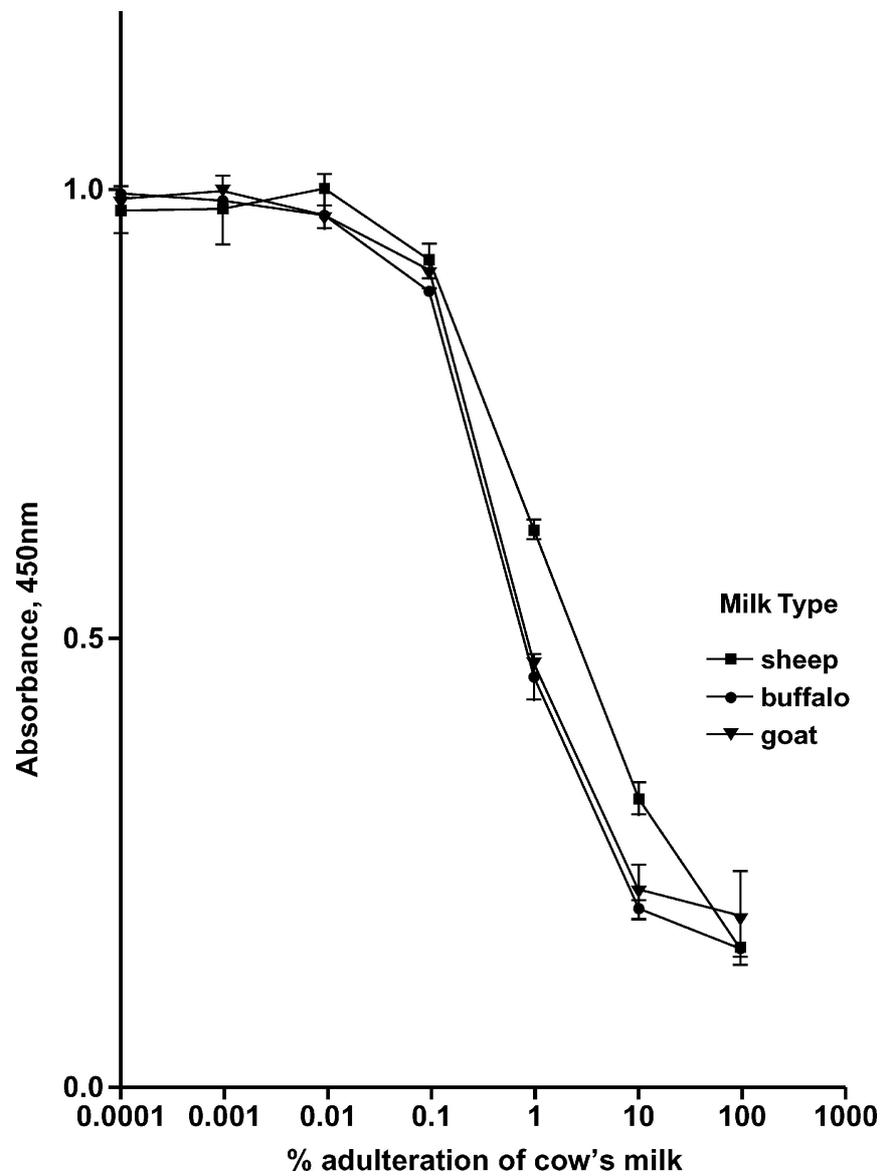


Abbildung 12: Ergebnis des optimierten indirekten kompetitiven ELISAs bei bovinem IgG unter der Verwendung von verschiedenen, behandelten Milcharten als Inhibitoren [HURLEY et al., 2004b]

4.2.2 Nachweis durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Während der letzten Jahre wurden zahlreiche Methoden, welche auf der Analyse der DNA basieren, verwendet, um die Verfälschung von Produkten tierischen Ursprungs zu überwachen. Die meist verbreiteten Techniken involvieren PCR-Amplifikation von einem konservierten Genfragment, das von einer Speziesgruppe stammte, unter der Verwendung von universellen Primern oder DNA-Amplifikation mit spezifischen Primern, um einen definierten Zielorganismus zu identifizieren [LOPEZ-CALLEJA et al., 2005].

Genomische DNA von somatischen Zellen bleibt in Milch und sogar in gereiftem Käse bestehen [HURLEY et al., 2004a]. Die DNA von somatischen Milchzellen kann durch Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt werden und findet so für die Analyse zur Artenunterscheidung Verwendung. Um die korrespondierende genomische DNA in Milch und Käse zu entdecken, wurden von Plath et al. (1997) Primer verwendet, welche eine Teilsequenz des β -Caseins kodierten. Das PCR-Produkt der β -Casein-DNA, das vom Schaf oder von der Ziege stammte, enthielt eine spezifische Restriktionsenzymstelle, die nicht in der β -Casein-DNA der Kuh enthalten war. Die Restriktionsenzyme wurden analysiert und anschließend wurden die Fragmente durch PAGE aufgetrennt. Dadurch fand man heraus, dass die β -Casein-DNA der Kuh als zusätzliches Band auftritt, sofern Kuhmilch präsent ist.

Eine ähnliche Vorgehensweise wurde beschrieben; um Wasserbüffel-, Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch in Käse zu identifizieren. Diese Methode basiert auf der Amplifikation des 359bp Fragments des Cytochrom b-Gens und auf der Analyse des Kettenlängenpolymorphismus des Restriktionsfragments [LEES, 2003].

Von Bania et al. (2001) wurde eine single step PCR-Methode beschrieben; um Kuhmilch in Ziegenmilch nachzuweisen, dabei wurden Kuh-spezifische für ein Bruchstück des Cytochrom b-Gens verwendet. Um die Herkunft der Milch nachzuweisen, extrahierten Bottero et al. (2002) genomische DNA von Käse. Eine PCR mit doppelsträngigen Amplifikationen wurde ausgeführt, dabei wurden verschieden passende Primer-Sets artenspezifischer DNA Amplifikation verwendet [LEES, 2003].

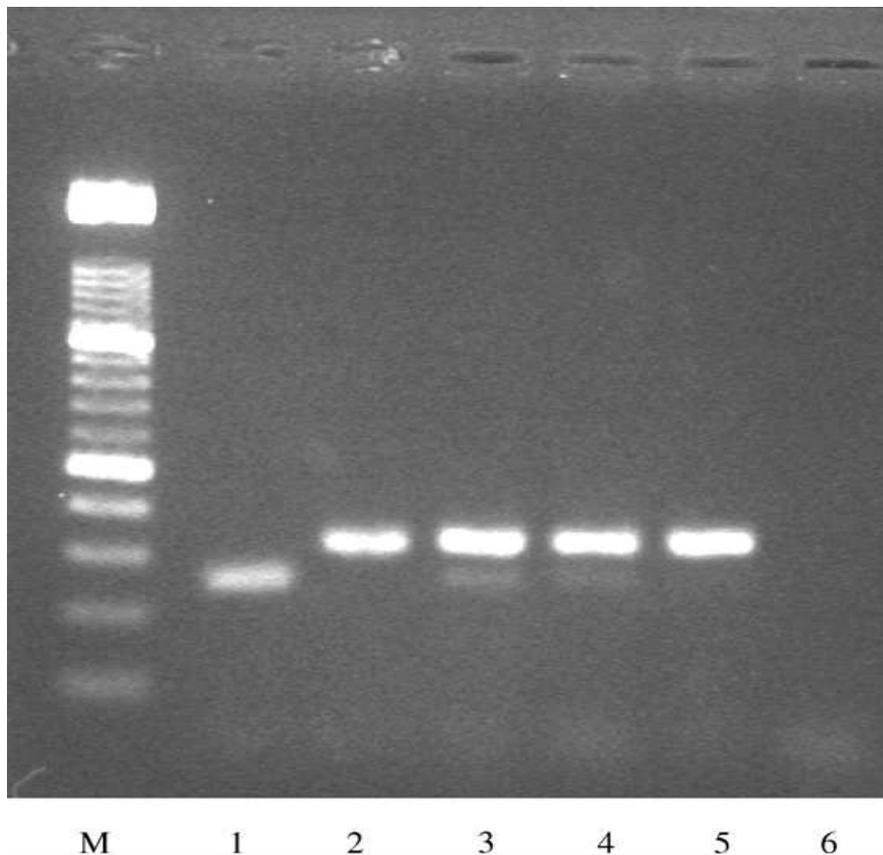


Abbildung 13: Agarosegelelektrophorese von PCR Produkten amplifiziert durch Käsebruch, der durch die Mischung von Kuh- und Ziegenmilch erhalten wurde. M, 100bp Stufe; Linie 1, Kuhmilch (100%); Linie 2, Ziegenmilch (100%); Linie 3, Mischung von Kuhmilch (1%) und Ziegenmilch (100%); Linie 4 Mischung von Kuhmilch (0.5%) und Ziegenmilch; Linie 5, Mischung von Kuhmilch (0.1%) und Ziegenmilch; Linie 6, Kontrollreagens [BOTTERO et al., 2003]

Viele Studien verwenden mitochondrial-kodierte Gene, wie Cytochrom b-Gen, da sich die Sequenzen bei zahlreichen Nucleotiden sogar zwischen nahverwandten Arten unterscheiden [HURLEY et al., 2004].

Darüber hinaus ist die Anzahl der Kopien der mitochondrialen DNA viel höher als die der genomischen DNA. Kuh-spezifische Primer wurden entwickelt, um die Kontrollregion der mitochondrialen DNA anzuzielen und das resultierende PCR-Produkt von 413bp wurde durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Nachweisgrenze von Kuhmilch in Schafskäse lag bei weniger als 0.1% [LEES, 2003]. Jedoch gibt es noch immer Probleme mit der Quantifizierung bei der PCR, da die Anzahl der Mitochondrien, abhängig von Zelltyp und den Umweltbedingungen, in jeglichen Zellen sehr variieren kann [HURLEY et al., 2004a].

Lopez-Calleja et al. (2005) entwickelten einen PCR-Test für den Nachweis von Ziegenmilch in Schafsmilch unter der Verwendung von ziegenspezifischen Primern, welche das mitochondriale 12S rRNA-Gen anzielen. Dieser Marker wurde wegen seiner Variabilität, wegen des Vorhandenseins von vielen Daten von mitochondrialen Sequenzen, welche von Wirbeltieren stammten und wegen der hohen Anzahl von Vervielfältigungen von mitochondrialer DNA im Verhältnis zu anderen Genen gewählt [LOPEZ-CALLEJA et al., 2005].

Um den Nachweis von Ziegenmilch-DNA eindeutig zu machen, wurde ein ziegenspezifisches Primerset im Anschluss an Sequenzabgleich und Anpassung der 12S rRNA-Fragmente entwickelt. Wie von der Sequenzanalyse erwartet, verstärkte das Primerpaar 12SCH-DIR-12SCH-INV ein 122-bp Bruchstück von Ziegen-DNA, während keine Verstärkungsbanden bei Schaf, Kuh und Wasserbüffel auftraten (Abbildung 14) [LOPEZ-CALLEJA et al., 2005].

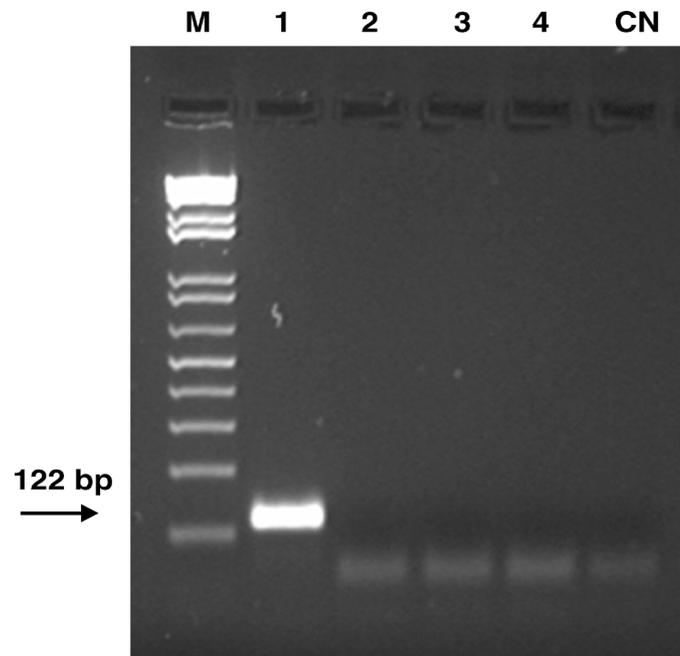


Abbildung 14: Elektrophoretische Analyse von ziegenspezifischer 12S rRNA Amplifikation von Milchproben unter der Verwendung von Primer 12SHC-DIR und 12SHC-INV. Die Proben sind: Ziege (Linie 1), Schaf (2), Kuh (3) und Wasserbüffel(4). CN = Negativkontrolle; M = Molekulargewicht-Marker 1kb plus DNA-Leiter [LOPEZ-CALLEJA et al., 2005]

Als Teil dieser Studie wurde ebenso die Sensitivität dieses Tests zum Nachweis von Ziegenmilch in Schafmilch evaluiert. Für diesen Zweck wurde PCR-Amplifikation von binären rohen Mischungen von Ziegen-/Schafmilch, bestehend aus 0.1, 0.5, 1, 5, 10 und 100% (vol/vol) aus Ziegenmilch durchgeführt.

Je niedriger der Anteil an Ziegenmilch war, desto schwächer war das erhaltene Band in der PCR mit dem ziegenspezifischen Primerpaar (Abbildung 15/16). Die Nachweisgrenze dieses Tests lag bei 0.1% der Ziegenmilch in der aus Schaf- und Ziegenmilch bestehender Mischung. Zuvor beschriebene PCR-basierende Methoden zur Authentifikation von Milchprodukten wiesen geringere oder ähnliche Sensitivität auf [LOPEZ-CALLEJA et al., 2005].

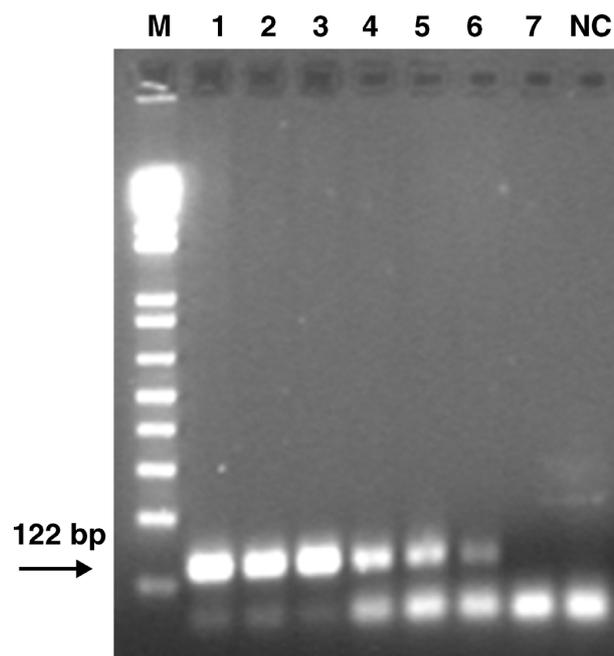


Abbildung 15: Elektrophoretische Analyse von den 12S rRNA PCR-Produkten, erhalten von rohen binären Mischungen aus Ziegen- in Schafmilch, unter der Verwendung der Primer 12SHC-DIR und 12SHC-INV. Proben: 100% Ziege (1), 10% Ziege (2), 5% Ziege (3), 1% Ziege(4), 0.5% Ziege (5), 0.1% Ziege (6) und 100% Schaf (7). NC = Negativkontrolle; M = Molekulargewicht-Marker 1kb plus DNA-Leiter [LOPEZ-CALLEJA et al., 2005].

Einer der klaren Vorteile von Methoden, die auf PCR-Technik basieren, gegenüber anderen Techniken ist, dass ein hoher Grad an Substratspezifität mit der Fähigkeit bei hoch verarbeiteten Proben zuverlässig zu funktionieren kombiniert wird. Obwohl DNA, wie Protein, bei höheren Temperaturen oder bei anderen Verarbeitungsschritten denaturiert, kann DNA noch immer durch Bruchstück Amplifikation nachgewiesen werden [LOPEZ-CALLEJA et al., 2005].

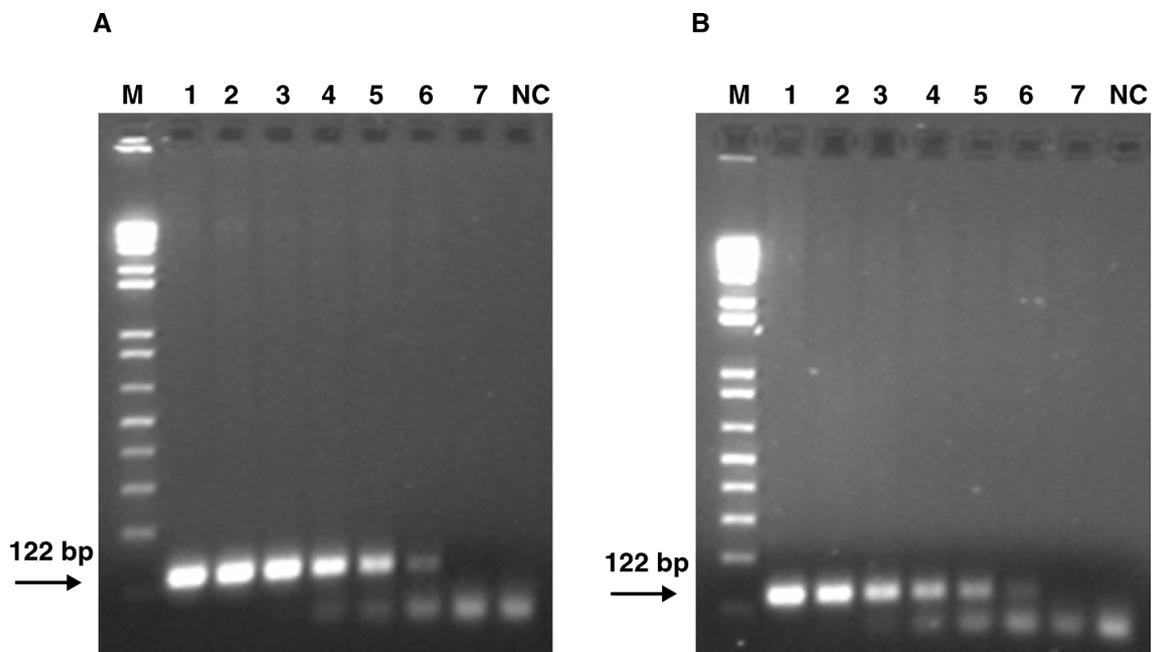


Abbildung 16: Elektrophoretische Analyse von den 12S rRNA PCR-Produkten, erhalten von hitzebehandelter Milch aus binären Mischungen von Ziegen- in Schafmilch, unter der Verwendung der Primer 12SHC-DIR und 12SHC-INV.A: Pasteurisierte Probe (65°C, 30min); und B: Sterilisierte Probe (120°C, 20min). Die Linien sind: 100% Ziege (1), 10% Ziege (2), 5% Ziege (3), 1% Ziege(4), 0.5% Ziege (5), 0.1% Ziege (6) und 100% Schaf (7). NC = Negativkontrolle; M = Molekulargewicht-Marker 1kb plus DNA-Leiter [LOPEZ-CALLEJA et al., 2005].

4.3 Nachweis durch Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Ein anderer Weg zur Proteinseparation ist die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), welche erfolgreich angewendet wurde, um individuelle Milchproteine zu bestimmen. Verschiedene Formen der Chromatographie wurden für die Proteine der unterschiedlichen Tierarten entwickelt. Sowohl Ionenaustauschersäulen als auch Reversed-Phase-Säulen wurden angewendet, um entweder Caseine, Molkenproteine oder die gesamten Milchproteine zu fraktionieren [LEES, 2003].

Das Ziel der Studie von Ferreira und Cacote, 2003 war die Separation und Identifikation von homologen Molkenproteinen in binären Milchmischungen und die Bestimmung der Anteile von Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch in gereiftem rohen Käse mittels HPLC-Analyse der β -Laktoglobuline. Binäre Mischungen von roher Kuh- und Schafmilch oder von roher Kuh- und Ziegenmilch, die 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50, 75 und 95% (vol/vol) Kuhmilch enthielten, sowie Mischungen von Ziegen und Schafmilch, die 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50, 75 und 95% (vol/vol) Ziegenmilch enthielten, wurden für die Käseherstellung verwendet. Traditionellen Methoden entsprechend wurden die Käseproben zubereitet und gereift. Analysiert wurden die Milchmischungen frischer und gereifter Käse. Um die bestmögliche Trennung der Molkenproteine von Kuh-, Schaf- oder Ziegenmilch zu erzielen, wurde eine Gradientenelution mit einer Fließgeschwindigkeit von 0.5ml/min und einer Temperatur von 45°C durchgeführt. Verwendet wurde eine Mischung aus zwei Lösungsmitteln: Lösung A: 0.1% Trifluoressigsäure in Wasser und Lösung B: 0.09% Trifluoressigsäure in 80% wässrigem Acetonitril [FERREIRA und CACOTE, 2003].

Unter diesen Bedingungen wurden die Fraktionen der β -Laktoglobuline und die α -Laktalbumine, welche von roher Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch stammten, gut fraktioniert und es wurden unterschiedliche Chromatographiemuster erhalten. Die Analyse von β -Laktoglobulin in den binären Mischungen, die definierte Mengen an roher Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch enthielten, lieferten interessante Ergebnisse. Wie erwartet lieferte jede Mischung unterschiedliche Chromatographieprofile. Für jede Milchemischung und der entsprechenden frischen oder gereiften Käseprobe wurden ähnliche Chromatographieprofile erhalten. Bei gereiftem Käse konnte zwar der Effekt der Proteolyse festgestellt werden, jedoch störte dieser nicht die Peaks des β -Laktoglobulins. Mit dieser HPLC-Methode konnten 2% Kuhmilch in Schafskäse nachgewiesen werden. Es war nicht möglich, das β -Laktoglobulin der Kuh in gereiftem Käse, dem 1% Kuhmilch zugesetzt wurde, zu identifizieren. Diese Technik ermöglichte eine Quantifikation von Milcharten in einem Konzentrationsbereich von 5-95% [FERREIRA und CACOTE, 2003].

Enne et al. (2005) entwickelten eine Methode, um den betrügerischen Zusatz von Kuhmilch zu Wasserbüffel-Mozarella nachzuweisen. Dabei wurde eine Gradienten-HPLC angewendet, welche auf der Messung der Mengenverhältnisse der β -Laktoglobulin Proteinfractionen beruht.

Unter der Verwendung von C₄-Säulen und UV-Detektion wurden rohe Milch, Käsegrundmasse und vorherrschende Käseflüssigkeit untersucht. Diese Arbeit zeigte, dass der Zusatz von Kuhmilch während der Käseproduktion in der vorherrschenden Flüssigkeit von Mozarella sowohl in roher Milch als auch in Käsegrundmasse nachgewiesen werden kann und das unter der gesetzlichen EU-Grenze von einem Prozent. Ein Zusatz von weniger als 0.5% Kuhmilch konnte nachgewiesen werden [ENNE et al., 2005].

Im Vergleich mit den korrespondierenden Milchproben wurde eine signifikante Abnahme der Peakflächen und der Peakhöhe von der Käsegrundmasse und der Käseflüssigkeit beobachtet; möglicherweise aufgrund des Proteinabbaus während des Käsereifungsprozesses [ENNE et al., 2005].

Ferreira und Cacote (2003) beobachteten den Einfluss der Proteolyse; dabei wirkten sich die Abbauprodukte der Proteine nicht störend auf die β -Laktoglobulin Peaks aus. Außerdem werden die Peakverhältnisse - daher auch nicht die Quantifizierung - in binären Mischungen durch den Grad der Proteolyse nicht beeinflusst. Die Ergebnisse zeigten im Gegensatz zu früheren Studien, dass der Gebrauch einer matrixspezifischen Kalibrationskurve essentiell ist, um eine geeignete Quantifizierung der β -Laktoglobulin Proteine durchzuführen, die es erlaubt, auf den Kuhmilchzusatz zu schließen [ENNE et al., 2005].

Um mögliche Verfälschungen nachzuweisen, benötigt es eine klare analytische Charakterisierung jeglicher Art von Kuhmilch. Bordin et al. (2001) führten die Trennung der Hauptmilchproteine mittels Ionenpaar-Reversed-Phase-HPLC und Photodiodenarray-Detektion durch. Durch die Retentionszeit, die Peakflächenverhältnisse und die UV-Spektren der Derivate wurde jedes Protein identifiziert. Die Kalibrationskurve wurde durch gereinigte Proteine bestimmt; diese wurde zur Quantifizierung herangezogen. Bei dieser Analysenmethode ist es möglich, die sieben Hauptproteine (κ -Casein, α_{s2} -Casein, α_{s1} -Casein, β -Casein, α -Laktalbumin, β -Laktoglobulin B und β -Laktoglobulin A) in einem Lauf zu trennen und zu quantifizieren, außerdem kann die Gesamtprotein-konzentration bestimmt werden [BORDIN et al., 2001].

Veloso et al. (2002) verwendeten für die Separation und Quantifizierung von bovinen κ -, α - und β -Caseinen ebenso HPLC-UV unter der Verwendung von Reversed-Phase-Säulen. Es wurde eine Gradientenelution mit einer Fließgeschwindigkeit von 1ml/min bei einer Temperatur von 46°C durchgeführt. Verwendet wurde eine Mischung aus zwei Lösungen; Lösung A: 0.1% Trifluoressigsäure in Wasser sowie Lösung B, bestehend aus Acetonitril-Wasser-Trifluoressigsäure in einem Verhältnis von 95:5:0.1.

Ein UV-Detektor überwachte die Elution bei 280nm. Die Bestimmungen wurden in einem linearen Messbereich von 0.038-0.377mg/ml für κ -Casein, 0.188-1.883mg/ml für α -Casein und 0.151-1.506mg/ml für β -Casein durchgeführt. Die Nachweisgrenzen lagen jeweils bei 0.006, 0.019 und bei 0.015mg/ml für κ -Casein, α -Casein und für β -Casein. Die Wiederfindungsraten lagen bei Kuhmilch in einem Bereich von 91-100%.

Dieselbe HPLC-Methode wurde angewendet, um die Caseine von Schaf und Ziege zu trennen. Binäre Mischungen (Kuh/Schaf und Kuh/Ziege) mit unterschiedlichen Mengenverhältnissen wurden vorbereitet und analysiert. In Abbildung 17 werden typische Chromatographieprofile gezeigt. Für Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch wurden unterschiedliche Chromatographieprofile erhalten. Die zugesetzte Menge an Kuhmilch in den verfälschten Proben konnte durch Integration der bovinen α -Casein Peakfläche berechnet werden. Dazu wurden Standardkurven mit verfälschten Proben, von denen die Mischverhältnisse bekannt waren, vorbereitet. Jedoch war es nur möglich, einen Zusatz von 5% oder mehr an Kuhmilch in Ziegenmilch nachzuweisen und zu quantifizieren [VELOSO et al., 2002].

In Analogie zu der offiziellen EC-Methode fügten Volitaki und Kaminarides (2001) Plasmin zu den isolierten Caseinen hinzu, um die γ -Casein Fraktion zu verstärken und separierten die Mischung durch Reversed-Phase-HPLC.

Die Caseinmakropeptide der verschiedenen Arten sind durch HPLC trennbar und können als Marker dienen. Ebenso ist die HPLC-Analyse der Molkenproteine interessant zur Artenunterscheidung [LEES, 2003].

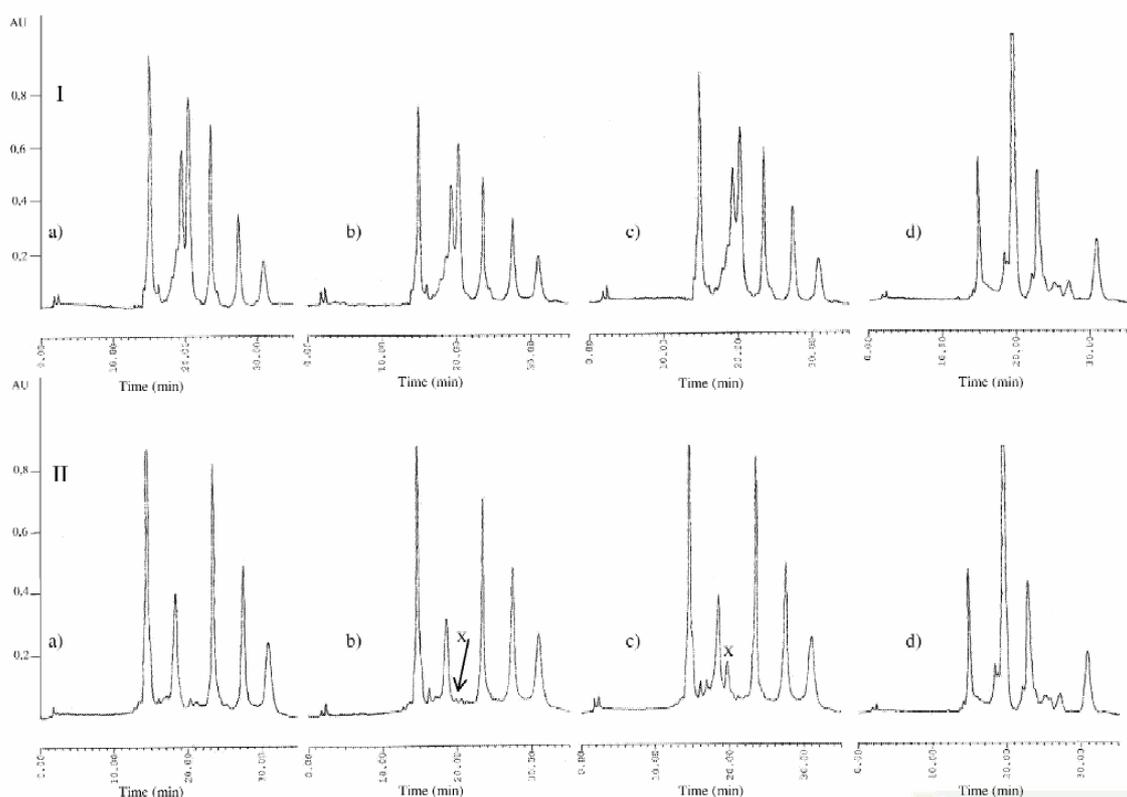


Abbildung 17: Chromatographische Darstellung von Kuh- und Ziegengesamtcasein, erhalten durch RP-HPLC bei 280nm, 20 μ l-Injektionsvolumen: (a) rohe Ziegenmilch; (b) 5% Verfälschung; (c) 20% Verfälschung; (d) rohe Kuhmilch; Chromatographische Darstellung von Kuh- und Schafgesamtcasein, erhalten durch RP-HPLC bei 280nm; 20 μ l-Injektionsvolumen: (a) rohe Ziegenmilch; (b) 5% Verfälschung (c) 20% Verfälschung; (d) rohe Kuhmilch [VELOSO et al., 2002].

5 Verfälschung durch Wasserzusatz

5.1 Das Wasser in der Milch

Der Hauptbestandteil von Milch ist Wasser, vorrangig dient es hier als Lösungsmittel für die Inhaltsstoffe. Einerseits kommt es als freies Wasser verteilt im Produkt vor, andererseits kann es in Milchprodukten, wie Butter oder Käse, auch als chemisch gebundenes Wasser, zum Beispiel als Hydratwasser am Eiweiß oder an Laktosekristallen gebunden, vorkommen. Die Textur, die physikalischen und die mechanischen Eigenschaften, werden insgesamt vom Wassergehalt beeinflusst. Milch ist ein disperses System und zwar ein polydisperses, da die Einzelbestandteile in verschieden großen Teilchen und unterschiedlichen Verteilungsgraden, so genannten Dispersionsgraden, im Wasser vorkommen. Je nach Teilchengröße des dispergierten Stoffes resultieren unterschiedliche Eigenschaften der Milch [SPREER, 2005].

5.2 Verdünnung der Milch mit Wasser

Das Zufügen von Wasser zu einem Getränk ist der Inbegriff der Lebensmittelverfälschung. Die Verdünnung mit Wasser verändert die Dichte der Milch, den Brechungsindex des Laktoserums und - am wichtigsten - den Gefrierpunkt. Die Bestimmung des Gefrierpunktes von roher Milch mittels kryoskopischen Thermistor ist wahrscheinlich die am meisten verbreitete und die am häufigsten angewendete Technik, um die Authentizität von Lebensmittel zu überprüfen [LEES, 2003].

Die Originalarbeit an Gefrierpunkten wurde von Hortvet, der Quecksilberthermometer verwendete, durchgeführt. Jüngere Arbeiten haben gezeigt, dass die Messungen von Hortvet ein wenig ungenau waren. Da jedoch viele der früh aufgezeichneten Daten auf den Messungen der Hortvet-Apparatur basieren, vermessen manche Länder entsprechend der Hortvet-Skala, während andere die wahre Celsius-Skala verwenden. Mit folgender Formel ist es möglich die Ergebnisse der einen Methode auf die andere zu korrigieren:

$$^{\circ}\text{C} = 0.96418^{\circ}\text{H} + 0.00085$$

$$^{\circ}\text{H} = 1.03711^{\circ}\text{C} - 0.00085 \text{ [HARDING, 1995].}$$

Der osmotische Druck oder die Balance der Salze einer Kuhmilch muss mit dem des Blutes der Kuh im Gleichgewicht stehen. Da der osmotische Druck des Kuhblutes nur in sehr engen Grenzen schwanken kann, kann der Gefrierpunkt, welcher ja durch die Salzbalance bestimmt ist, nur in engen Grenzen variieren [HARDING, 1995].

Der Gefrierpunkt von echter unverarbeiteter Milch schwankt nur zwischen engen Grenzen. Zu den wichtigsten Faktoren, die den Gefrierpunkt beeinflussen, zählen die Rasse, die Stufe der Laktation, die Fütterungsart, die Eutergesundheit, die Produktionsregion, die Saison und die Melkzeit [LEES, 2003].

Daten von vielen Ländern wurden gesammelt, um die wahren Schwankungen des Gefrierpunktes der Milch festzulegen. Zwischen den Ländern, zwischen den Rinderrassen oder zwischen den Jahreszeiten gibt es geringe Unterschiede [HARDING, 1995].

Durchschnittliche Gefrierpunktwerte wurden für verschiedene Länder in einem Bereich von -0.5310 und -0.5209°C berichtet [LEES, 2003].

Die allgemeinen Rückschlüsse über die Gefrierpunkte, welche in der Literatur berichtet wurden, sind, dass die Gefrierpunkte von Ziegen- und Schafmilch generell ein wenig unter denen von Kuhmilch liegen und dass Büffelmilch einen Gefrierpunkt hat, der ähnlich dem der Kuhmilch ist.

In dem französischen Standard NF V04-205 von 1990 wird ein kryoskopischer Thermistor beschrieben, in welchem die Probe bis zu einer festgelegten Temperatur unterkühlt wird, gefolgt von Kristallisationsinduktion mittels mechanischer Vibration. Diese Methode ist empfindlich genug, um 3% des zugesetzten Wassers nachzuweisen [SINGHAL et al., 1997].

Es wurde berichtet, dass jedes zu frischer Milch zugesetzte Prozent an Wasser den Gefrierpunkt der rohen frischen Milch um 0.006°C steigen lässt. Manche Autoren empfehlen - um die Ergebnisse zu vereinfachen - die Milligrade zu verwenden und das Negativzeichen wegzulassen, so dass -0.525 zu 525 wird. Alle Werte unter 525 würden die Verdünnung mit Wasser vermuten lassen. Der Wert des Gefrierpunktes muss korrigiert werden, wenn der Säuregehalt zwischen $7-8^{\circ}\text{SH}$ (Soxlet-Henkel-Grade) liegt, und darf nicht beachtet werden, wenn der Säuregrad mehr als 8°SH beträgt. Niedrige Säuregehalte ($<5.3^{\circ}\text{SH}$) selbst dienen als Indikator für einen möglichen Wasserzusatz [SINGHAL et al., 1997].

Es ist normal, den titrierbaren Säuregehalt bei der gleichen Zeit zu testen, bei der der Gefrierpunkttest durchgeführt wird, um zu gewährleisten, dass die entdeckte Acidität die Messung nicht beeinflusst und den Nachweis einer Verfälschung nicht maskiert [HARDING, 1995].

Das Pennsylvania Department of Agriculture hat sogar eine Regelung angenommen, die festlegt, dass Milch mit einem Gefrierpunkt über -0.525°C als verfälscht betrachtet wird, sofern nicht bewiesen wurde, dass sie frei von zugesetztem Wasser ist [SINGHAL et al., 1997].

Diese Methode wurde seit 1965 in Colorado, wo ein Geldstrafenschema praktiziert wurde, angewendet. Abgeleitet vom Gefrierpunkt wurde der Prozentsatz an zugefügtem Wasser ermittelt und dementsprechend wurden die Farmer bezahlt. Dieses Verfahren war ziemlich erfolgreich, um Verfälschungen zu verringern. In der Schweiz wurde diese Methode ebenso als exakt erachtet und wurde in die offiziellen Lebensmittelqualitätskontrollen inkludiert [SINGHAL et al., 1997].

Rhom et al. (1992) fanden einen durchschnittlichen Wert für österreichische Milch bei $-0.52757^{\circ}\text{C} \pm 0.00659^{\circ}\text{C}$. Ein Durchschnittswert von -0.543°C wurde für UK-Milch gefunden [DENNIS, 1996].

International akzeptierte Interpretationen der Gefrierpunktserniedrigung sind: wenn die Gefrierpunktserniedrigung größer als -0.535°C ist, wird angenommen, dass die Lieferung frei von zugesetztem Wasser ist; wenn die Erniedrigung zwischen -0.530°C und -0.534°C liegt, wird der Produzent aufgefordert, seinen Betrieb zu kontrollieren; wenn die Gefrierpunktserniedrigung zwischen -0.525°C bis -0.529°C liegt, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass fremdes Wasser anwesend ist und wenn die Gefrierpunktserniedrigung bei -0.525°C oder weniger liegt, wird der Landwirt dazu verpflichtet, seine Unschuld zu beweisen [SINGHAL et al., 1997].

Im Jahr 2003 entwickelten Mabrook und Petty eine neue Methode unter der Verwendung von elektrischen Leitfähigkeitsmessungen mit Singlefrequenz, um zugesetztes Wasser nachzuweisen. Die Leitfähigkeit der Milch ist hauptsächlich auf die Anwesenheit von Ionen zurückzuführen, insbesondere Natrium-, Kalium- und Chlorionen. Der Salzgehalt der Milch bleibt konstant, wobei jedoch die relativen Konzentrationen der verschiedenen Ionen variieren können [MABROOK und PETTY, 2003].

Sie werden durch verschiedene Faktoren, wie Tierrasse, Jahreszeit, Fütterung und Laktationsstufe beeinflusst. Die Verteilung von Calcium, Magnesium und Phosphat zwischen den löslichen und kolloidalen Phasen wird ebenso durch diese Faktoren beeinflusst und das wiederum beeinflusst die frei leitfähigen Ionen der Milch. Ein weiterer Einflussfaktor auf die elektrische Leitfähigkeit der Milch ist die Anwesenheit von Fett. Wenn der Prozentanteil des Fettes der Milch ansteigt, sinkt die Leitfähigkeit der Milch; so ist die Leitfähigkeit von entrahmter Milch um 7-10% höher als von Vollfettmilch. Der Grund dafür ist, dass das meiste Milchfett in Form von großen Kügelchen vorkommt, welche von einer dünnen, nicht leitfähigen Membran umgeben werden. Diese Milchfettkügelchen füllen den Inhalt des leitenden Mediums aus und behindern so die leitfähigen Ionen sich zwischen den Elektroden zu bewegen. Die Werte der gemessenen Leitfähigkeit bei 8°C und 100kHz für Mischungen von Vollfettmilch und entrahmter Milch mit Wasser werden in Abbildung 18 gezeigt [MABROOK und PETTY, 2003].

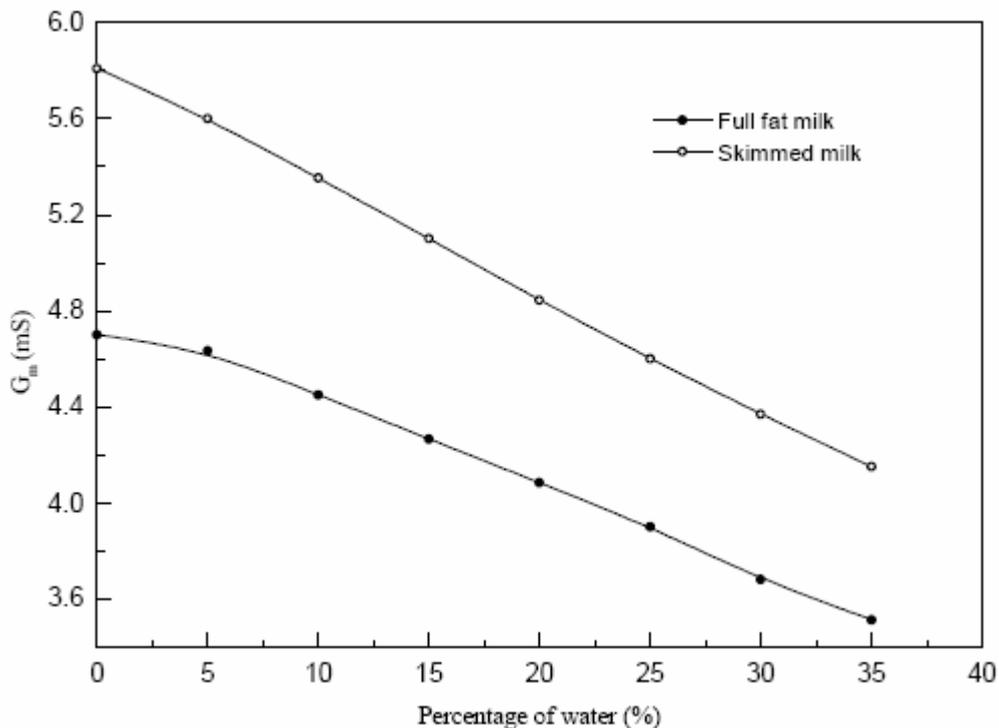


Abbildung 18: Die Veränderung der Leitfähigkeit von Milch als eine Funktion der Zugabe von Wasser in Milch bei 8 °C [MABROOK und PETTY, 2003]

Die Leitfähigkeit von entrahmter Milch nimmt linear mit dem Anstieg des Wassergehaltes ab, da die Leitfähigkeit von Wasser - verglichen mit der von entrahmter Milch - sehr gering ist. Vollfettmilch verhält sich bezüglich ihrer Leitfähigkeit ähnlich der entrahmten Milch, aber erst bei Wasserkonzentrationen höher als 10%. Die Leitfähigkeit von Vollfettmilch sinkt beim Zusatz von weniger als 1% Wasser und steigt scharf bei 2% an zugesetztem Wasser (Abbildung 19); die restlichen Wasserkonzentrationen zeigen lineare Abnahme mit steigendem Wassergehalt, in ähnlicher Weise wie entrahmte Milch [MABROOK und PETTY, 2003]

Der scharfe Anstieg der Leitfähigkeit bei 2% an zugefügtem Wasser lässt sich möglicherweise durch die Hydrolyse von MilCHFett in seine Untereinheiten erklären. Hydrolyse ist eine chemische Reaktion, bei der durch das Zufügen von Wasser chemische Bindungen gebrochen werden. Gewöhnlich wird diese Reaktion durch die in Milch anwesenden Salze katalysiert. Da MilCHFett aus drei Fettsäuren, welche durch Esterbindungen kovalent an ein Glycerinmolekül gebunden sind, zusammengesetzt ist, hydrolysieren diese Bindungen möglicherweise beim Zusatz von 1-2% Wasser und produzieren die Natrium- und Calciumsalze dieser Fettsäuren. Die Anzahl an leitfähigen Ionen in der Milchlösung steigt durch diesen Vorgang an und folglich steigt die Leitfähigkeit. Außerdem werden aufgrund der Hydrolysereaktion, die freie Phosphationen produziert, durchschnittlich 50% der Phospholipide, die in den Fettkügelchenmembranen vorkommen, in die Milchlösung losgelassen.

Durch diese Resultate kann gesehen werden, dass die Leitfähigkeit von Vollfettmilch mit 1% an zugefügtem Wasser geringer ist, als die Leitfähigkeit von Milch mit einem höheren Gehalt an Wasser [MABROOK und PETTY, 2003].

Dieses Phänomen wurde von den Autoren als Messschema für den Nachweis von zugesetztem Wasser ausgenutzt. Wenn zum Beispiel der Widerstand von Vollfettmilch mit 2% zugefügtem Wasser größer ist als der Widerstand bei 1%, dann ist die Milch „gut“. Wenn dagegen die Leitfähigkeit von Vollfettmilch mit 2% zugefügtem Wasser niedriger ist als der Widerstand bei 1% zugefügten Wasser, wurde zumindest 1% Wasser zur Originalmilch hinzugefügt. Diese Messtechnik könnte die Basis für die Entwicklung eines kostengünstigen Instruments für die Kontrolle von Milchqualität sein [MABROOK und PETTY, 2003].

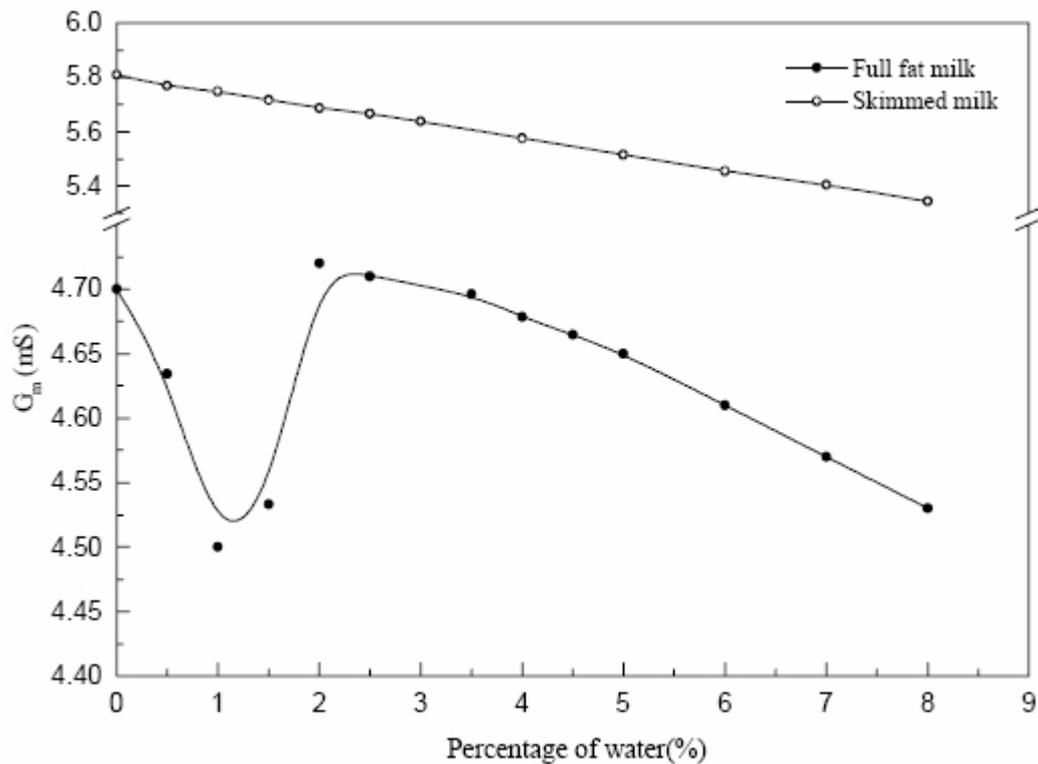


Abbildung 19: Die Veränderung der Leitfähigkeit der Milch als Funktion des Anteils an Wasser in Milch bei 8°C; Daten für Wasserkonzentrationen weniger als 10% [MABROOK und PETTY, 2003]

Kasemsumram et al. (2007) verwendeten Nah-Infrarotspektroskopie (NIRS), um Verfälschungen von Milch nachzuweisen (Abbildung 20). Zwei Verfälschungsarten von Kuhmilch mit Wasser, beziehungsweise mit Molke, wurden vorbereitet. Die NIR Spektren von verfälschten und natürlichen Milchproben wurden im Bereich von 1100-2500nm gesammelt. Die Klassifizierung von Milchverfälschungen und von natürlicher Milch wurde durchgeführt, indem diskriminierende Partial Least Squares (DPLS) und Soft Independent Modelling of Class Analogy (SIMCA) Methoden verwendet wurden.

Die in dieser Studie erhaltenen Ergebnisse haben gezeigt, dass Nah-Infrarotspektroskopie in Kombination mit einer chemometrischen Methode sehr brauchbar ist, um Verfälschungsmittel, wie Wasser oder Molke nachzuweisen und ihren Gehalt in der Milch zu bestimmen [KASEMSUMRAM et al., 2007].

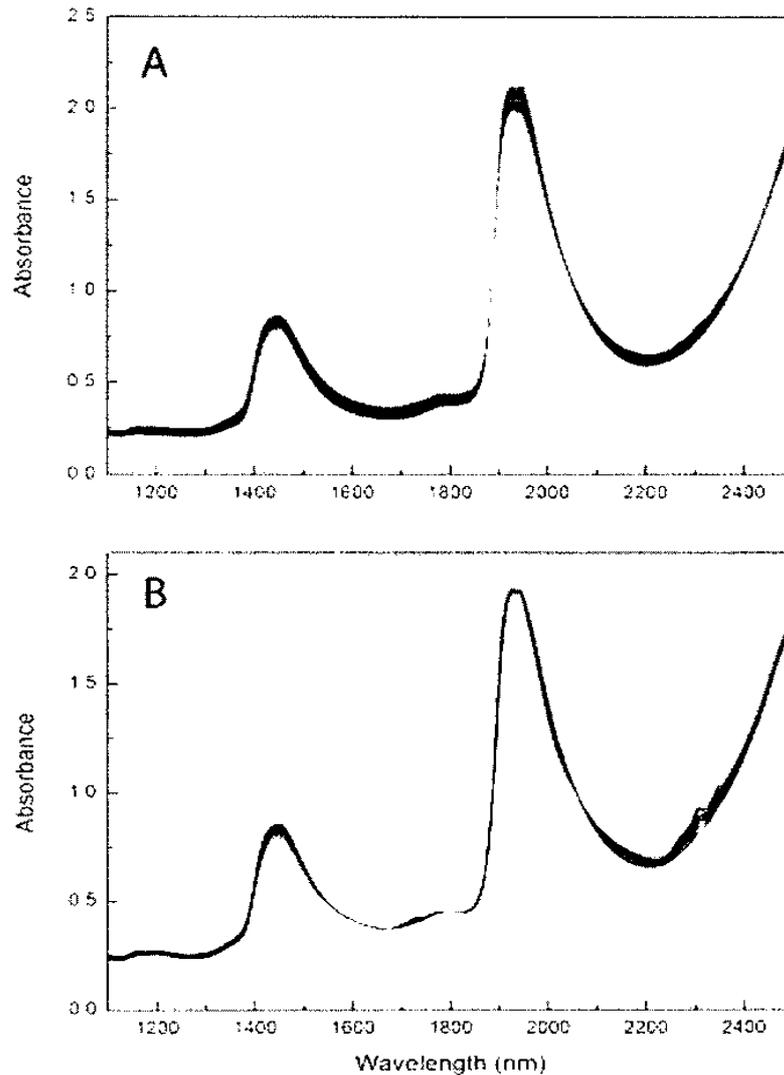


Abbildung 20: NIR Spektrum von verfälschten Milchproben in dem Bereich von 1100-2500nm; A, durch Wasser verfälschte Milch; B, durch Molke verfälschte Milch [KASEMSUMRAM et al., 2007].

6 Schlussbetrachtung

Verfälschungen von Milch- und Milchprodukten sind wirtschaftlich gesehen deshalb so reizvoll, weil sich damit Produktionskosten senken lassen und dadurch Wettbewerbsvorteile erzielt werden können. Der Melaminskandal in China, bei welchem Säuglingsanfangsnahrung vorsätzlich durch diese Substanz verfälscht wurde, zeigt deutlich wie skrupellos Produzenten vorgehen können, um Gewinn zu erzielen.

Die gesundheitlichen Konsequenzen des Konsums dieser kontaminierten Nahrung reichten von leichteren Nierenerkrankungen bis hin zum Todesfall von mindestens sechs Kleinkindern. Da die üblichen Analysemethoden nicht zwischen Proteinstickstoff und Nicht-Proteinstickstoff, welcher vom Melamin stammt, in der Milch unterscheiden können, war es notwendig, neue, spezifische und schnelle Analysemethoden für die Quantifizierung von Protein zu entwickeln. Die Nachweismethoden für Melamin bedienen sich verschiedener technischer Möglichkeiten; Gaschromatographie, gekoppelt mit diversen Detektoren, ist ebenso ein analytisches Instrument wie zum Beispiel die Flüssigkeitschromatographie.

Um Melamin schnell bestimmen zu können, wurden spezielle Techniken entwickelt einschließlich der „Direkten Analyse in Echtzeit“ (DART), Niedrigtemperatur-Plasma-Untersuchung kombiniert mit Tandem-Massenspektrometrie (LTP-MS/ MS) und extraktive Elektrospray-Massenspektrometrie (EESI-MS), jedoch sind diese speziellen Verfahren in gewöhnlichen Laboratorien weitgehend nicht anwendbar. Ganz neue Studien beschäftigten sich mit elektrophoretischen Verfahren sowie ELISA-Techniken, um die gesundheitsgefährdende Substanz Melamin schnell und exakt nachweisen zu können.

Aber nicht nur gesundheitliche Folgeerscheinungen einer Milchverfälschung machen den Nachweis dieser zu einem so wichtigen Thema. Das Interesse an authentischen und richtig gekennzeichneten Produkten, vor allem bei sortenreinen traditionellen Produkten, steigt bei den Konsumenten immer mehr an. Ein Schutz gegen Zumischung oder Substitution ist wegen allergischen und religiösen Einschränkungen, aber auch wegen staatlichen Regulierungen von großer Bedeutung. In der Literatur werden zahlreiche Möglichkeiten beschrieben, um die Authentizität eines Lebensmittels nachzuweisen. Die Techniken reichen von verschiedenen Arten der Elektrophorese, immunchemischen Nachweismethoden bis hin zur Detektion mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie.

Durch die Behandlung des Themas dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verfälschung von Milch- und Milchprodukten nach wie vor ein brisantes Problem ist. Die Entwicklung von immer genauer werdenden Analysetechniken ermöglicht den Nachweis von vorsätzlich verfälschten Produkten immer exakter, wodurch authentische Lebensmittel in den meisten Fällen sichergestellt werden können.

7 Literaturverzeichnis

1. ANDERSEN W. C., TURNIPSEED S. B., KARBIWNYK C. M., CLARK S. B., MADSON M. R., GIESEKER C. M., MILLER R. A., RUMMEL N. G., REIMSCHUESSEL R. Determination and confirmation of melamine residues in catfish, trout, tilapia, salmon, and shrimp by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008; 56: 4340-4347
2. Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe(BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Melamin(Nr. 105; Stand: Juni1992), BUA- Stoffberichte 105-108 Kurzberichte),(Beratergremium für Umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft Deutscher Chemiker), S. Hirzel wissenschaftliche Verlagsgesellschaft , Stuttgart, 1993; 1-15.
3. BELITZ H.-D., GROSCH W., SCHIEBERLE P., Milch und Milchprodukte, In: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2001; 490
4. BORDIN G., RAPOSO F.C., CALLE B., RODRIGUEZ A.R. Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*,2001; 928: 63-76
5. BOTTERO M.T., CIVERA T., NUCERA D., ROSATI S., SACCHI P., TURI R.M. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows',goats' and sheep's milk in dairy products. *International Dairy Journal* 2003; 13: 277-282
6. COOK H. A., KLAMPFL C. W., BUCHBERGER W. Analysis of melamine resins by capillary zone electrophoresis with electrospray ionization-mass spectrometric detection. *Electrophoresis*, 2005; 26: 1576- 1583
7. CROSSLEY S.J., PETERSEN B., BAINES J. Backgroundpaper on dietary exposure assesment, prepared for the WHO expert meeting on toxigolocical and health aspects of melamine and cyanuric acid, Health Canada, Ottawa, Canada; 1-4 Dezember 2008 (http://www.who.int/foodsafety/fs_management/Melamine_4.pdf, Stand 30.Juli 2009)

8. DENNIS M. J., Milk and Milkproducts In: Food Authentication, (Ashurst und Dennis), Blackie Academic& Professional, London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, 1996; 378-384
9. DESTAILLATS F., WISPELAERE M., JOFFRE F., GOLAY P. A., HUG B., GIUFFRIDA F., FAUCONNOT L., DIONISI F. Authenticity of milk fat by fast analysis of triacylglycerols. Application to the detection of partially hydrogenated vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 2006; 1131: 227-234
10. ENNE G., ELEZ D., FONDRINI F., BONIZZI I., FELIGINI M., ALEANDRI R., High-performance liquid chromatography of governing liquid to detect illegal bovine milk's addition in water buffalo Mozzarella: comparison with results from raw milk and cheese matrix. *Journal of Chromatography A*, 2005; 1094: 169-174
11. FERREIRA I. M. P. L. V. O., Cacote H., Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. *Journal of Chromatography A*, 2003; 1015: 111-118
12. FILIGENZI M. S., TOR E. R., POPPENG A. R. H., ASTON L. A., PUSCHNER B. The determination of melamine in muscle tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007; 21: 4028
13. FOX J. R., DUTHI H.A. and WULF S., Precision and sensitivity of a test for vegetable fat adulteration of milk, *Journal of Dairy Science*, 1988; 71:572-581
14. HARDING F. , Adulteration of milk, In: Milk quality (Harding F.), Blackie Academic and Professional, London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, 1995; 60-73

15. HILTS C. und PELLETIER L., Backgroundpaper on occurrence of melamine in foods and feed, prepared for the WHO expert meeting on toxicological and health aspects of melamine and cyanuric acid, Health Canada, Ottawa, Canada; 1-4 Dezember 2008 [http://www.who.int/foodsafety/fs_management/Melamine_3.pdf; Stand 30. Juli 2009]
16. HURLEY I.P., COLEMAN C.R., IRELAND E.H., WILLIAMS J.H.H. Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration. *Journal Dairy Science* 2004a; 87: 543-549
17. HURLEY I.P., IRELAND H.E., COLEMAN R.C. und WILLIAMS J.H.H. Application of immunological methods for detection of species adulteration in dairy products; *International Journal of Food Science and Technology*, 2004b; 39: 873-878
18. KASEMSUMRAM S., THANAPASE W., KIATSOONTHON A. Feasibility of near-infrared spectroscopy to detect and to quantify adulterants in cow milk; *Analytical Sciences*, 2007; 23: 907-910
19. KEENEY, M., BACHMANN K. C., TIKRITI H.H., KING R.L. Rapid vitamin E method for detection of adulteration of dairy products with non-coconut oils. *Journal Dairy Science* 1971; 54: 1702
20. KUMAR A., GHAI D. L., SETH R., SHARMAR V. Apparent solidification time test for detection of foreign oils and fats adulterated in clarified milk fat, as affected by season and storage. *International Journal of Dairy Technology*, 2009, 62: 33-38
21. LEES M., Milk and dairy products, In: *Food authenticity and traceability*, Woodhead Publishing, Cambridge 2003; 356-377
22. LI J., YANG QI H., PING SHI Y. Determination of melamine residues in milk products by zirconia hollow fiber sorptive microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2009; 1216: 5468

23. LOPEZ-CALLEJA I., GONZALEZ I., FAJARDO V., MARTIN I., GARCIA, HERNANDEZ P.E. und MARTIN R. Application of polymerase chain reaction to detect adulteration of sheep' s milk with goat's milk. *Journal Dairy Science*, 2005; 88: 3115-3120
24. MABROOK M. F., PETTY M. C. A novel technique for the detection of added water to full fat milk using single frequency admittance measurements. *Sensors and Actuators B*, 2003; 96: 215-218
25. MAYER H. K. Milk species identifikation in cheese varieties using elctrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal*, 2005; 15: 595-604
26. MAYER W., HÖRTNER H. Discontinuous electrophoresis of β -caseins for the determination of bovine caseins in milk and dairy products. *Electrophoresis*, 1992; 13: 803-804
27. MOLKENTIN J. Detection of foreign fat in milk fat from different continents by triacylglycerol analysis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2007; 109: 505-510
28. OECD (1998) Screening Information Data Set for Melamine, CAS N°: 108-78-(<http://www.inchem.org/documents/sids/sids/108781.pdf> ,Stand 9.Juli 2009)
29. POVOLO M., PELIZZOLA V., CONTARINI G. Directly resistively heated-column gas chromatography for the evaluation of cow milk fat purity. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2008; 110: 1050-1057
30. SINGHAL R.S.; KULKARNI P.R., REGE D.V., Milk and milk products, In: *Handbook of indices of food quality and authenticity*, Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington, Cambridge, England, 1997; 131-194

31. SPREER E., Milch als Rohstoff und Lebensmittel, In: Technologie der Milchverarbeitung. B. Behr's Verlag, Hamburg, 2005; 35-39
32. TITTEMIER S. Background paper on methods for the analysis of and related compounds in foods and animal feeds, prepared for the WHO expert meeting on toxicological and health aspects of melamine and cyanuric acid, Health Canada, Ottawa, Canada; 1-4 Dezember 2008 (http://www.who.int/foodsafety/fs_management/Melamine_1.pdf; Stand 14. September)
33. TÖPEL A., Lipide- Milchfett In: Chemie und Physik der Milch, B. Behr's Verlag, Hamburg, 2004; 133-194
34. TSAI I.-L., SUN S.-W., LIAO H.-W., LIN S.-C. KUO C.-H. Rapid analysis of melamine in infant formula by sweeping-micellar electrokinetic chromatography. Journal of Chromatography A, 2009; 1216: 8296-830
35. VELOSO A. C. A., TEIXEIRA N., FERREIRA I. M. P. L. V. O. Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis: Detection of milk adulterations. Journal of Chromatography A, 2002; 967: 209-218
36. WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO), FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), Toxicological and health aspects of melamine and cyanuric acid, report of who expert meeting , in collaboration with FAO, supported by HEALTH CANADA, Ottawa; 1-4 Dezember 2008 (http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597951_eng.pdf, Stand Juli 2009f)
37. WORLD HEALTH ORGANISATION Melamin and Cyanuric Acid: Toxicity, preliminary risk assessment and guidance on levels in food 25.09.2008 – updated 30.10.2008 (http://www.who.int/foodsafety/fs_management/Melamine.pdf, Stand Juli 2009)

38. XU X., REN Y., ZHU Y., CAI Z., HAN J., HUANG B., ZHU Y. , Direct determination of melamine in dairy products by gas chromatography/mass spectrometry with coupled column separation. *Analytica Chimica Acta*, 2009; 650: 39-43
39. YAN N., ZHOU L., ZHU Z., CHEN X. Determination of melamine in dairy products, fish feed, and fish by capillary zone electrophoresis with diode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009; 57: 807-811

8 Anhang

8.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, sich mit dem Thema Verfälschung von Milch und Milchprodukten näher zu beschäftigen, wobei der Melaminskandal im Jahre 2008 als Anlass dafür herangezogen wurde. Aufgrund des Konsums von melaminkontaminierter Säuglingsanfangsnahrung und ähnlichen Milchprodukten wurden über 51900 Säuglinge und Kleinkinder in China ins Spital gebracht. Chemische und physikalische Eigenschaften der Substanz Melamin wurden in dieser Arbeit genau beschrieben, ebenso wurde auf die Toxikologie des Stoffes eingegangen. Melamin kann auf verschiedene Arten ein Lebensmittel kontaminieren, entweder unbeabsichtigt durch Migration oder aber auch durch vorsätzlichen Zusatz, um preisliche Vorteile zu erzielen. Die verschiedenen Methoden, welche entwickelt wurden, um den Melamingehalt in unterschiedlichen Proben zu ermitteln und zu quantifizieren, wurden ausführlich dargestellt.

Auf die üblichen Verfälschungsmethoden wurde in den nächsten Kapiteln eingegangen. Dabei wurde die Verfälschung durch fremdes Fett, sowohl durch pflanzliches als auch durch tierisches, näher erörtert, wobei ein Hauptaugenmerk auf die Nachweismöglichkeiten dieser gelegt wurde.

Hinsichtlich der Lebensmittelauthentizität wurde die Artendifferenzierung von tierischen Produkten in den letzten Jahren zu einem immer wichtiger werdenden Thema. Diese ist deshalb so wichtig, um ehrliche Lebensmittelkennzeichnung zu gewährleisten. Die Nachweismöglichkeiten, welche für den Zusatz von Milch anderer Spezies vorhanden sind, wurden daher ebenso in dieser Arbeit beschrieben. Zum Abschluss wurden die verschiedenen Möglichkeiten behandelt, welche es erlauben, eine vorsätzliche Verwässerung der Milch nachzuweisen.

8.2 Abstract

The aim of the present work was to characterize the issue of adulteration of milk and dairy products in detail. The motive of writing this work was the scandal about melamine in the year 2008.

More than 51900 infants and young children in China were hospitalized because of the consumption of melamine contaminated infant formula. The chemical and physical characteristics of melamine were described precisely in this work. The toxicological effects of melamine on the human organism were also specified. Foods can be contaminated by melamine on various ways, on one hand the contamination accrues unintended because of migration, but on the other hand the admixture of melamine is carried out intentionally for getting benefits in price. Many diverse methods for the detection and quantification of melamine in different samples of food were developed. These techniques were illustrated in detail.

The following chapters were discussing the common methods of adulteration. By this way the adulteration with vegetable fats as well as the adulteration with animal body fats were described, a main focus of these chapters was to show the different options for detecting those adulterations.

Species identification of animal products has become an important issue with regard to food authentication over the last few years. It is fundamental for ensuring an honest labeling policy. Because of this, methods for species identification of milk and dairy products were also characterized. Finally, several methods, which allow the detection of added water in milk, were discussed.

8.3 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Winterleitner Nina
Geburtsdatum:	12. April 1982
Geburtsort:	Leoben
Nationalität:	Österreich
Familienstand:	Ledig

Ausbildung

1988 – 1992	Volkschule in Leoben
1992 – 2000	Bundesgymnasium/ Bundesrealgymnasium Leoben 1
2000 – 2010	Studium Ernährungswissenschaften Universität Wien (Wahlfach Lebensmitteltechnologie und –produktion)

Berufserfahrung

1997 – 2001	Knapp System Integration GmbH Ferialpraktika in den Sommermonaten
2000 – 2001	Sales Crew Verkaufsförderung GmbH Promotions für Ikea
2001 – 2006	Sellinx, Agentur für Verkaufsförderung Promotions für Telekom Austria, A1, Sony
12.02 – 02.03. 2007	Karl Landsteiner Institut für Stoffwechselerkrankungen & Nephrologie Mitarbeit an einer Studie zu Blutlipidwerten
16.07 – 21.09. 2007	Versuchsanstalt für Getreideverarbeitung Chemische Analysen von Mehl, Teigphysikalische Untersuchungen
Seit 01.10.2007	Versuchsanstalt für Getreideverarbeitung Chemische Analysen von Mehl, Teigphysikalische Untersuchungen

Wien, März 2010