
**Überprüfung der Authentizität von
Rindfleisch (Bio)
mit Hilfe der stabilen Isotope der Bioelemente**

Dissertation

zur

Erlangung des Grades: Dr. oec. troph.

der

Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

vorgelegt am: 2005-06-13

vom

Lebensmittelchemiker Markus Boner

aus

Jülich

Erklärung: Diese Arbeit wurde selbständig verfasst.
Es sind keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt worden.
Zitate sind kenntlich gemacht worden.

1. Gutachter: Prof. Dr. Galensa
2. Gutachter: Prof. Dr. Stehle
3. Gutachter: Prof. Dr. Förstel
Tag der Prüfung: 20. Januar 2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2006

Überprüfung der Authentizität von Rindfleisch (Bio) mit Hilfe der stabilen Isotope der Bioelemente

In der Lebensmittelanalytik spielt die Überprüfung der Authentizität von Agrarprodukten eine immer wichtigere Rolle. Eine Möglichkeit hierzu bieten die stabilen Isotope der Bioelemente, die in vorliegender Untersuchung zur Überprüfung von Rindfleisch, insbesondere aus dem ökologischen Landbau genutzt wurden. Die Authentizität des Rindfleisches umfasst dabei sowohl die Herkunft, als auch die Nahrungsgrundlage der Rinder.

Die Grundlage ist zum einen die Fraktionierung des schweren Sauerstoffs und Wasserstoffs im Wasserkreislauf. Daraus ergeben sich spezifische Isotopenverhältnisse im Grundwasser in den verschiedenen Regionen von Deutschland, welche sich über das Trink- und Gewebewasser der regionalen Futterpflanzen im Rind widerspiegeln.

Dabei müssen jahreszeitliche Effekte zu einer korrekten Differenzierung berücksichtigt werden. Mit diesen Isotopen kann sowohl Nord- und Süddeutsches Rindfleisch, als auch ausländisches Rindfleisch, wie z. B. aus Argentinien differenziert werden.

Durch die spezifischen Stickstoff- und Schwefelisotopenverhältnisse der Futterpflanzen, die zum einen durch die anthropogene Düngung des Bodens und zum anderen durch geologische Bedingungen vorgegeben sind, ergibt sich gerade in der ökologischen Landwirtschaft ein örtlicher Bezug, der sich in der weiterführenden Nahrungskette, d.h. im Rindfleisch widerspiegelt. So konnten Rindfleischproben von drei ökologischen Betrieben aus dem Großraum Köln über einen Zeitraum von 18 Monaten mit Hilfe dieser Isotope differenziert werden. Ist die Datenbasis der Rindfleischproben umfassend, können mit Hilfe dieser Isotope auch länderübergreifende Differenzierungen durchgeführt werden.

Bei der Anwendung der Isotope der Bioelemente sind gerade beim Stickstoff mögliche Spannweiten der Isotopenverhältnisse im Rind zu beachten. So konnte in der Einzeluntersuchung von 30 Rindfleischproben gemäß dem „Schweizer Schnitt“ eine Variabilität der Isotopenverhältnisse festgestellt werden.

Die Nahrungsgrundlage kann mit Hilfe der Isotopenverhältnisse des Kohlenstoffs nachvollzogen werden. Gerade in der ökologischen Landwirtschaft wird auf die Verfütterung von Maissilage verzichtet, welche jedoch in konventionellen Betrieben einen erheblichen Anteil darstellt. Dieser Fütterungsfaktor spiegelt sich wiederum in den spezifischen Isotopenverhältnissen des Kohlenstoffs wider.

In der Summe wird damit mit Hilfe der stabilen Isotope der Bioelemente eine physikalische Markierung über das Trinkwasser und die Nahrung weitergegeben. Somit ist auch möglich, bei gleichernährten Rindern Chargenüberprüfungen durchzuführen.

Danksagung

An dieser Stelle gilt es vielen Menschen, die mich während meiner Forschungsarbeit in welcher Form auch immer unterstützt haben, Dank zu sagen.

Ohne die tatkräftige Unterstützung und die pünktliche „Frischfleischversorgung“ durch die Biobauern, den deutschen Zoll und unsere chilenischen Freunde wäre meine Forschungsarbeit überhaupt nicht in Gang gekommen.

Herrn Prof. Dr. Hilmar Förstel, der mein Interesse an den stabilen Isotopen geweckt hat und mich während der gesamten Arbeit mit seinem Wissen und seiner langjährigen Erfahrung, aber auch mit manchem väterlichen Rat und aufmunternden Worten motiviert und begleitet hat.

Herrn Prof. Dr. Rudolf Galensa, für die freundliche Aufnahme in sein Doktorandenteam und die Übernahme meiner Arbeit. Nicht zuletzt danke ich auch für das mir entgegengebrachte Verständnis und die Geduld.

Frau Hanni Jansen, der Seele des Labors des ICG-5.

Meiner Frau Katy, die mich so häufig mit der Arbeit teilen musste aber immer Geduld und Verständnis hatte. Nur mit ihrer Liebe war diese Arbeit und sind zukünftige Aufgaben möglich.

Meinen Eltern Agnes und Hans Boner, für ihre Hilfe und ihr Vertrauen zu jeder Zeit und in allen Lebenslagen.

*Sein und Wissen ist ein uferloses Meer:
Je weiter wir vordringen, um so unermesslicher dehnt sich aus,
was noch vor uns liegt;
jeder Triumph des Wissens
schließt hundert Bekenntnisse des Nichtwissens in sich.*

Isaac Newton

ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME

U	Beschleunigungsspannung
z	Elementarladung
ν	Frequenz
A	Frequenzfaktor
B	Magnetfeldstärke
$\tilde{\nu}$	Vakuumwellenzahl
ω	Winkelgeschwindigkeit
p	Druck
ΔH	Reaktionsenthalpie
v	Geschwindigkeit
AP	Atomprozent
BBOT	2,5-Bis-(5-tert.-butyl-benzoxazol-2-yl)-thiophen
c	Lichtgeschwindigkeit
CF-IRMS	Continous Flow Isotope Ratio Mass Spetrometer
D_{eq}	Tiefe der Potentialmulde
E_A	Aktivierungsenergie
EA	Elementanalysator
G_m	Molare freie Reaktionsenthalpie
h	Planksche Konstante
ICPMS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
IRMS	Isotope Ratio Mass Spectrometer
K	Gleichgewichtskonstante
k	Kraftkonstante einer Bindung
PEP	Phosphoenolpyruvat
R	Gaskonstante
R_{eq}	Gleichgewichtsabstand
R_i	interatomarer Abstand
RUBISCO	Ribulose-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase
T	Temperatur
TIMS	Thermal ionisation source mass spectrometry
α	Fraktionierungsfaktor
μ	reduzierte Masse

1	EINLEITUNG	1
2	GRUNDLAGEN DER STABILEN ISOTOPE.....	5
2.1	BEGRIFF DER STABILEN ISOTOPE	5
2.1.1	<i>Messnotation</i>	6
2.1.2	<i>Internationale Referenz-Standards</i>	9
2.1.3	<i>Laborstandards</i>	10
2.2	ISOTOPENFRAKTIONIERUNGEN	13
2.2.1	<i>Equilibrierungsfractionierung</i>	13
2.2.2	<i>Kinetische Isotopenfraktionierung</i>	18
2.3	MESSUNG DER STABILEN ISOTOPE.....	20
2.3.1	<i>Technik der Massenauftrennung</i>	21
2.3.2	<i>Messtechnische Besonderheiten der Isotopenmessung</i>	23
2.3.2.1	<i>Ionenquelle</i>	23
2.3.2.2	<i>Analyser</i>	24
3	STAND DER FORSCHUNG	26
3.1	SAUERSTOFFISOTOPE ¹⁸ O UND ¹⁶ O UND WASSERSTOFFISOTOPE D UND H	26
3.1.1	<i>Isotopenvariation im Grund- bzw. Oberflächenwasser</i>	26
3.1.2	<i>Isotopenvariation in der Pflanze</i>	30
3.2	KOHLSTOFFISOTOPE ¹³ C UND ¹² C IN DER BIOSPHÄRE	32
3.2.1	<i>Fraktionierung der C3-Pflanzen</i>	33
3.2.2	<i>Fraktionierung der C4-Pflanzen</i>	35
3.3	STICKSTOFFISOTOPE ¹⁵ N UND ¹⁴ N IN DER BIOSPHÄRE.....	36
3.4	SCHWEFELISOTOPE ³⁴ S UND ³² S IN DER BIOSPHÄRE	38
3.5	ISOTOPENVERHÄLTNISSE IN HETEROTROPHEN ORGANISMEN	39
3.6	ANWENDUNGEN AUF DIE NAHRUNGSKETTE	42
4	MATERIAL UND METHODEN	43
4.1	PROBENLIEFERANTEN	43
4.2	PROBLEM DER PROBENMATRIX	46
4.3	PROBENAUFARBEITUNG DES RINDFLEISCHS.....	48
4.3.1	<i>Übersicht</i>	48
4.3.2	<i>Abtrennung der Wasserfraktion</i>	48
4.3.3	<i>Abtrennung der Fettfraktion.....</i>	50
4.3.4	<i>Aufarbeitung der Rohproteinfraktion.....</i>	50
4.4	EINGESETZTE MESSTECHNIK.....	51
4.4.1	<i>Bestimmung der ¹⁸O / ¹⁶O Isotopenverhältnisse im Wasser.....</i>	51
4.4.2	<i>Bestimmung der ¹³C / ¹²C und ¹⁵N / ¹⁴N Isotopenverhältnisse</i>	52
4.4.3	<i>Bestimmung der ³⁴S / ³²S Isotopenverhältnisse</i>	54
4.4.4	<i>Bestimmung der D/H Isotopenverhältnisse im Gewebewasser.....</i>	55
4.5	KORREKTUREN DER ISOTOPENMESSUNG	57
4.5.1	<i>Isotopenverhältnisse ¹⁸O / ¹⁶O und ¹³C / ¹²C.....</i>	57
4.5.2	<i>Isotopenverhältnisse ³⁴S / ³²S</i>	57
4.5.3	<i>Isotopenverhältnisse D/H.....</i>	58
4.6	REPRODUZIERBARKEITEN.....	58
4.7	STATISTIK	59
4.7.1	<i>Arithmetischer Mittelwert</i>	59
4.7.2	<i>Median.....</i>	59
4.7.3	<i>Standardabweichung.....</i>	59
4.7.4	<i>Spannweite</i>	60
4.7.5	<i>Quartile</i>	60

4.7.6	<i>Box-und-Whisker-Plots</i>	60
4.7.7	<i>Korrelationskoeffizient nach PEARSON</i>	61
4.7.8	<i>Hauptkomponentenanalyse</i>	61
4.7.9	<i>Diskriminanzanalyse</i>	62
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	63
5.1	ISOTOPENVERHÄLTNISSE IM MUSKELFLEISCH.....	63
5.2	EINFLUSS DER JAHRESZEIT	74
5.3	DIFFERENZIERUNG ZWISCHEN NORD- UND SÜDDEUTSCHEM RINDFLEISCH.....	82
5.4	DIFFERENZIERUNG ZWISCHEN ARGENTINISCHEM UND DEUTSCHEM RINDFLEISCH	87
5.5	DIFFERENZIERUNG ZWISCHEN CHILE, ÖSTERREICH UND DEUTSCHLAND	90
5.6	DAS 5 ‰ KONZEPT	93
5.7	ISOTOPE ¹⁵ N / ¹⁴ N UND ³⁴ S / ³² S ALS CHARAKTERISTIKA DES ORTES.....	94
5.8	FUTTER ALS KRITERIUM DER HALTUNGSFORM	105
5.9	TRANSPORTPROBLEM	110
5.10	CHARGENÜBERPRÜFUNG VON RINDFLEISCH	115
6	ZUSAMMENFASSUNG	118
7	ABSTRACT	121
8	LITERATUR	123

1 Einleitung

In Zeiten globaler Märkte ist es nicht verwunderlich, dass Lebensmittel aus allen Teilen der Welt an deutschen Ladentheken erhältlich sind: Käse aus Italien, Paprika aus Spanien und Rindfleisch aus Argentinien gehören zum Alltagsbild der Supermärkte. Mit der Herkunft der Lebensmittel werden dabei auch häufig qualitative Ansprüche verbunden. Mit der Vorstellung der riesigen Weiten der argentinischen Pampa mit urwüchsigen Rindern sind häufig höhere Preise zu erzielen als mit deutschem Rindfleisch. Zur Maximierung der Gewinnmarge liegt es nahe, deutsches Rindfleisch „auszubürgern“ und mit einem argentinischen Etikett wieder „einzuführen“. War dies in der Vergangenheit nur ein kommerzielles Vergehen, so erhält die Herkunft von Rindfleisch in Zeiten von BSE eine direkte gesundheitliche Bedeutung. Da ein verlässlicher BSE-Test fehlte, wurde kurzzeitig der Import von englischem Rindfleisch völlig untersagt. Die Kontrolle des Embargos erfolgte über Papiere, die bis heute nicht als fälschungssicher anzusehen sind. Sowohl der eingeführte Rinderpass, als auch die Durchführung von BSE-Tests bringen keine absolute Sicherheit. So ist in der Praxis die „Vermehrung“ von Rindfleisch durch Zumischung von Fremdrindfleisch nach der Zerlegung bekannt. Auch der Export des Rindes und Reimport des Fleisches zur Umgehung der BSE-Tests ist aktenkundig.

Ein Resultat der BSE-Krise war in Deutschland der Wunsch, eine DNA-Herkunftsdatenbank für Rinder zu etablieren. Die Zahl von 15 Millionen Rindern mit einem jährlichen Zuwachs von ca. 3 Millionen Jungtieren allein in Deutschland verdeutlicht jedoch, welcher analytischer Aufwand diese Datenerfassung beinhaltet. Die Rückverfolgung des Fleisches gelingt auch nur dann, wenn die Datenbank lückenlos geführt wird. Bei Fragestellungen der Herkunft von Rindfleisch außerhalb von Deutschland muss sie gänzlich versagen.

Eine andere Möglichkeit ist es, Eigenschaften der Probenmatrix selbst zu nutzen, die einen regionalen oder örtlichen Bezug haben. Diese Möglichkeit ist in den Bauelementen der Biomasse zu finden. Diese sogenannte Biomasse, also der chemische Anteil der Lebewesen, ist zu einem überwiegenden Anteil aus den chemischen Elementen Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel aufgebaut. Häufig wird die Tatsache vernachlässigt, dass diese Elemente mehrere Isotope aufweisen, da im allgemeinen diese Isotope nahezu identische chemische und physikalische Eigenschaften haben.

Eine Ausnahme bildet Wasserstoff. So zeigt „schweres“ Wasser ($^2\text{H}_2^{16}\text{O}$) eine geringere Lösungseigenschaft für Salze als „gewöhnliches“ Wasser ($^1\text{H}_2^{16}\text{O}$). Die Viskosität von schwerem Wasser ist um 23,2 % und der Siedepunkt um 1,4 °C höher als bei gewöhnlichem Wasser. Biochemische Prozesse werden im schwerem Wasser gebremst, so keimen Samen hierin nicht. Schweres Wasser ist dabei in seinem chemischen Verhalten reaktionsträger. Das alles erklärt sich daraus, dass die Atommasse von Deuterium doppelt so groß ist wie die Atommasse von Protium. Mit aufsteigender Ordnungszahl nivellieren sich zwar die Massenunterschiede der Isotope eines Elements, dennoch sind geringe physikalische und chemische Unterschiede aufgrund der Massenunterschiede nachweisbar, besonders bei unvollständigen chemischen und physikalischen Prozessen.

Einer dieser unvollständigen Prozesse ist der Wasserkreislauf der Erde. Ausgehend vom Wasserpool der Meere verdunstet der Hauptteil des Wassers in der Region des Äquators und wird von dort nach Süden und Norden durch die großräumigen Luftbewegungen transportiert. Besonders der Transport über die großen Landmassen mit steter Abregnung und wiederholter Verdunstung führt zu einer zunehmenden Veränderung der Isotopen Zusammensetzung des Wassers. So regnet z.B. das schwerere Isotop des Sauerstoffs (^{18}O) im Wasser früher ab als „normales“ (^{16}O)-Wasser. Der umgekehrte Effekt ist bei der Verdunstung zu beobachten.

Diese physikalische Besonderheit bewirkt ein differenziertes Isotopenmuster im Wasser aus unterschiedlichen Regionen. Pflanzen und Tiere einer Region, die dieses Wasser für ihre Ernährung nutzen, sollten tendenziell diese Isotopenverhältnisse des Sauerstoffs in ihrem eigenen Gewebewasser widerspiegeln.

Die Isotope des Wassers variieren jedoch nur in großräumigem Maßstab, für eine höhere Trennschärfe können die Isotope des Stickstoffs und des Schwefels hinzugezogen werden. Die Stickstoffisotopenverhältnisse der Pflanzen werden hauptsächlich von dem im Boden verfügbaren Stickstoffpool bestimmt. Ähnlich dem Wasserkreislauf sind auch im Boden vielfältige unvollständige Prozesse zu beobachten. Die Isotopenzusammensetzung dieses Pools ist dabei sowohl primär abhängig von geologischen Bedingungen, als auch sekundär von Düngung und Kultivierung. Diese Einflussgrößen verändern zusätzlich das Isotopenverhältnis des Bodenstickstoffpools. Ähnliches gilt auch für die Schwefelisotopenverhältnisse des Bodens, wobei sich die anthropogenen Einträge nicht allein auf Düngung oder Kultivierung beziehen, sondern auch in der Immission zu suchen sind. Beide Elemente werden von der Pflanze zur Bildung ihrer Biomasse genutzt und werden mit dem Futter an das Rind weitergegeben.

Kombiniert man diese Kenntnis, so sollte, sofern die Futterpflanzen aus dem lokalen Bereich stammen, eine Differenzierungsmöglichkeit von Rindfleisch im lokalen Bereich bestehen.

Die stabilen Isotope dieser Elemente liefern somit eine Möglichkeit, die Herkunft von Rindfleisch sowohl regional als auch örtlich zu überprüfen. Diese Möglichkeit ist gerade für Rindfleisch aus der ökologischen Landwirtschaft interessant, da das Futter überwiegend vom gleichen landwirtschaftlichen Betrieb stammt, und der höhere Preis beim Kunden nur durch Vertrauen in die Authentizität des ökologischen Rindfleischs erbracht werden kann.

Die Authentizität des Rindfleischs umfasst in diesem Zusammenhang nicht nur seine geographische Herkunft, sondern auch die Ernährungsbedingungen. So wird in der ökologischen Landwirtschaft weitgehend auf die Verwendung von Maissilage verzichtet. Maissilage ist jedoch ein häufiger Bestandteil in der kommerziellen Intensivmast. Sie unterscheidet sich im $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnis signifikant von dem übrigen Grünfutter. Die Überprüfung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotope kann damit Informationen über die Nahrungsgrundlage und damit Hinweise über die Haltungform liefern.

Die Überprüfung der Authentizität hat in jüngster Zeit einen hohen Stellenwert eingenommen, welches sich nicht zuletzt in der europäischen Verordnung 178/2002 widerspiegelt. Diese Verordnung verlangt eine lückenlose Rückverfolgbarkeit von Nahrungsprodukten, wozu auch Tierfutter gezählt wird.

Die Nutzung der stabilen Isotope der Bioelemente ist dabei eine der wenigen Methoden [Dennis 1998] die Möglichkeiten bietet, die Rückverfolgbarkeit über die gesamte Nahrungskette zu gewährleisten.

Es ist Ziel dieser Arbeit, die Anwendungsmöglichkeit der geographischen Herkunftsdifferenzierung mit Hilfe der stabilen Isotope am ökologischen Rindfleisch zu überprüfen. Dazu wird sowohl die großräumige regionale Differenzierung von Rindfleisch anhand der Isotope $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H mit Hilfe von Proben aus Nord- und Süddeutschland getestet, als auch die kleinräumige Differenzierung mit Hilfe der Isotopenzusammensetzung des Stickstoffs und Schwefels im Boden (Bodenfaktor). Zur kleinräumigen Differenzierung wurden Proben aus dem Großraum Köln untersucht. Die deutschen Rindfleischproben stammten ausschließlich aus der ökologischen Landwirtschaft.

Ferner werden die Möglichkeiten der Unterscheidung von deutschem zu fremdländischem Rindfleisch untersucht. Im Zentrum dieser Betrachtung steht argentinisches Rindfleisch, das am deutschen Rindfleischimport einen Hauptanteil besitzt. Die Möglichkeit der Unterscheidung von ökologischem zu konventionellem Rindfleisch wird neben der geographischen Differenzierung ebenfalls in die Untersuchung einbezogen. Als mögliches Kriterium der Unterscheidung werden dabei die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse im Fleisch genutzt.

Schließlich wird ein Rückverfolgbarkeitssystem auf Basis der stabilen Isotope der Bioelemente erörtert.

2 Grundlagen der stabilen Isotope

2.1 Begriff der stabilen Isotope

Die Elemente des Periodensystems sind aus verschiedenen Atomarten (Nukliden) aufgebaut, die zwar die gleiche Protonenzahl besitzen, aber verschiedene Neutronenzahlen aufweisen. Dies spiegelt sich im Atomgewicht wider. Derartige Nuklide werden als Isotope bezeichnet (griech. Iso = gleich, Topos = Ort). Aus chemischer Sicht hat diese Tatsache keine weitere Bedeutung, da letztlich die chemischen Eigenschaften nur auf die Protonen und Elektronen des Elements zurückzuführen sind. Jedoch führt in der Regel die erhöhte bzw. eine erniedrigte Neutronenzahl zu instabilen Elementen, die einem radioaktiven Zerfall unterliegen. Einige wenige zeigen diesen Kernzerfall nicht, sie werden deshalb als stabile Isotope bezeichnet, entsprechend gehören radioaktive Elemente zur den instabilen Isotopen.

In der Natur kommen die meisten chemischen Elemente als Isotopengemische vor, lediglich 21 Elemente bestehen aus nur einem stabilen Isotop. In der Tendenz zeigen die Elemente mit höherer Ordnungszahl eine Zunahme an Isotopen. Bei Elementen mit niedriger Ordnungszahl, wie zum Beispiel den „Bioelementen“ sind nur wenige Isotope vorhanden.

Die Verteilung bzw. die Häufigkeit der stabilen Isotope, ausgedrückt in Atomprozent, ist besonders bei den Bioelementen nicht konstant, sondern unterliegt in der Natur geringen Schwankungen, die auf geochemische, geophysikalische, biochemische und biophysikalische Fraktionierungsprozesse zurückzuführen sind. Bei der Angabe der natürlichen Häufigkeit der stabilen Isotope ist deshalb auf die Angabe der Herkunft zu achten. Die erwähnte Besonderheit der Bioelemente (nur zwei Isotope mit einem überwiegenen Isotop) ermöglicht es, die natürliche Varianz der Isotopenhäufigkeit in einer Kennzahl anzugeben, die im folgenden erläutert und in den weiteren Erörterungen angewendet wird.

2.1.1 Messnotation

Die isotope Zusammensetzung der Bioelemente variiert nur in geringem Maße, so dass Unterschiede erst auf der zweiten bzw. dritten Kommastelle der Atomprozentzusammensetzung vorkommen.

Verbindung	relative Häufigkeit in Atom-%		δ PDB [‰]
	^{12}C	^{13}C	
PDB	98,8887	1,1112	0
NBS-Kalkstein Nr. 20	98,8899	1,1100	-1,1
Teplitz, CSSR, Kalkstein	98,8920	1,1079	-2,9
Atmosphäre CO_2	98,8972	1,1027	-7,7
C3 – Zucker	98,9173	1,0826	-26,0

Tabelle 2-1: Die relative Häufigkeit von ^{12}C und ^{13}C in Atomprozent in Abhängigkeit von der Matrix. Am Beispiel des Kohlenstoffs werden geringe Abweichungen des ^{13}C Gehaltes in verschiedenen Matrices dargestellt. Eine Abweichung um +0,001 Atom-% entspricht etwa einer Anreicherung um 1 ‰.

Als Maßzahl dieser Variation hat sich seit über 60 Jahren die Delta-Notation durchgesetzt, die die Abweichung von einem internationalen Referenzstandard (für $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: PDB) angibt. Die Isotopenzusammensetzung des internationalen Referenzstands dient als Bezugspunkt bzw. Nullwert der Skalierung.

Am Beispiel des Kohlenstoffs wird dies dargestellt:

$$(2-1) \quad \delta^{18}\text{O} = \left(\frac{R_{pr} - R_{ref}}{R_{ref}} \right) * 1000 \quad \text{mit} \quad R_{pr} = [\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}] / [\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}] \text{ in der Probe}$$

und $R_{ref} = [\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}] / [\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}]$ im Internationalen Standard

In der wissenschaftlichen Literatur hat sich die Angabe dieser Abweichung in Promille [‰] durchgesetzt und wird entsprechend auch für die übrigen Bioelemente angewendet.

Die Delta-Notation ist nicht SI konform. Eine Überführung in Atom-% (AP) wird deshalb verschiedentlich empfohlen [Slater 2001]. Die Konvertierung der Delta-Notation ist dabei wie folgt möglich:

$$(2-2) \quad AP \text{ } ^{13}\text{C} = \frac{100}{\frac{1}{\left(\frac{\delta}{1000} + 1\right) * R_{ref}} + 1}$$

So ist eine Abweichung um 1 ‰ im $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnis im SI-System mit einer Veränderung des ^{13}C um 11 ppm gleichzusetzen (Tabelle 2-1).

In der Routine wird die Bestimmung der Isotopenverhältnisse der Bioelemente nicht direkt gegen den internationalen Standard durchgeführt, sondern ein Laborstandard eingesetzt, der gegen die entsprechenden internationalen Standards kalibriert ist.

Die Ermittlung des Isotopenwertes einer Probe wird im einfachsten Fall durch eine Addition der Differenz des Laborstandards im Messlauf zum kalibrierten Isotopenwert durchgeführt.

Dies ist jedoch nur ein Annäherungsverfahren. Für die Ermittlung des korrekten Isotopenwertes ist zu berücksichtigen, dass die Probe gegen einen internationalen Standard vermessen werden muss. Es gilt damit:

$$(2-3) \quad \delta_{\text{Probe}} = \left[\frac{R_{\text{Probe}}}{R_{\text{Int. Standard}}} - 1 \right] * 1000$$

In der Routine wird jedoch ein Laborstandard eingesetzt, der gegen einen internationalen Standard kalibriert ist. Damit gelten die Gleichungen:

$$(2-4) \quad \delta_{\text{Probe2}} = \left[\frac{R_{\text{Probe2}}}{R_{\text{Laborstandard}}} - 1 \right] * 1000$$

$$(2-5) \quad \delta_{\text{Laborstandard}} = \left[\frac{R_{\text{Laborstandard}}}{R_{\text{Int. Standard}}} - 1 \right] * 1000$$

Aus den Gleichungen ist herzuleiten, dass zur Ermittlung des Isotopenwertes einer Probe folgende Gleichung anzuwenden ist:

$$(2-6) \quad \delta_{(Probe)} = \delta_{(Probe2)} + \delta_{(Laborstandard)} + \frac{\delta_{(Probe2)} * \delta_{(Laborstandard)}}{1000}$$

Diese Gleichung unterscheidet sich lediglich durch den zusätzlichen Bruch-Term vom einfachen additiven Korrekturverfahren. Bedenkt man, dass die Isotopenskalierung der Bioelemente (Ausnahme: Wasserstoff) für natürliche Isotope nur in engen Grenzen +/- 40 ‰ variiert, so ergeben sich unter Betrachtung des zusätzlichen Terms nur geringe Korrekturen, die im allgemeinen unter 0,1 ‰ liegen. Dies erklärt, warum diese Gleichung (2-6) in der Literatur zu den stabilen Isotopen der Bioelemente nur wenig Beachtung findet.

Im Folgenden wird die δ -Notation angewendet, um mit der internationalen Literatur kompatibel zu sein. Internationale Ring- und Proficiencytests garantieren den Anschluss an diese international akzeptierte Notation.

2.1.2 Internationale Referenz-Standards

Als Bezugsstandards der Delta-Notation werden internationale Referenzmaterialien genutzt, die bei der IAEA (International Atomic Energy Agency) erhältlich sind. Diese Primärstandards (Tabelle 2-2) legen mit ihrer spezifischen isotypen Zusammensetzung als Bezugspunkt die Delta-Skalierung fest.

Name	Isotope	δ in [‰]	Bemerkung
Primärstandards			
PDB	$^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$	0	Fossiler Tintenfisch (<i>Bellemnitella americana</i>) aus South Carolina, USA, (nicht mehr erhältlich)
SMOW	$^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$ D / H	0 0	Standard Mean Ocean Water (nur noch Restbestände)
VSMOW	$^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$ D / H	0 0	Vienna-SMOW, nachgemischter SMOW-Standard
CDT	$^{34}\text{S} / ^{32}\text{S}$	0	Mineralischer Triolite vom Canyon Diabolo Meteorit
IAEA-N ₂	$^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$	0	Atmosphärischer Stickstoff
Sekundärstandards			
IAEA-CH-7	$^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$	-31,8 v.s. PDB	Polyethylenfolie (PEF)
IAEA-CH-6	$^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$	-10,4 v.s. PDB	Rohrzucker
GISP	$^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$ D / H	-24,8 v.s. VSMOW -189,5 v.s. VSMOW	Greenland Ice Sheet Precipitation
SLAP	$^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$ D/H	-55,5 v.s. VSMOW -428,0 v.s. VSMOW	Standard Light Antarctic Precipitation
IAEA-S1	$^{34}\text{S} / ^{32}\text{S}$	-0,3 v.s. CDT	Silbersulfid
IAEA-N-1	$^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$	+20,3 v.s. IAEA-N ₂	Ammoniumsulfat
IAEA-N-2	$^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$	+4,7 v.s. IAEA-N ₂	Ammoniumsulfat

Tabelle 2-2: Beispielhafte Aufzählung verschiedener Isotopenstandards für die stabilen Isotope der Bioelemente. Die Primärstandards, bis auf den atmosphärischen Stickstoff, sind nur noch in Restbeständen vorhanden. Der VSMOW (Vienna-SMOW) stellt dabei eine Besonderheit dar, er wird von der IAEA angeglich am SMOW nachgemischt. Die nachfolgenden Standards wurden in internationalen Ringtests gegen diese Primärstandards kalibriert und können als Alternativen bei der IAEA erworben werden.

Aus der Tabelle ist zu ersehen, dass zwei „SMOW“ Standards in Gebrauch sind. Der VSMOW ist ein nachbereiteter, auf den Ur-SMOW gemischter Standard. Hier liegt im übrigen eines der Hauptprobleme der Delta-Notation. Diese „Null“-Standards sollten in ausreichender Menge vorliegen, so dass diese über einen langen Zeitraum zur Verfügung stehen. Leider sind verschiedene Nullstandards heute nicht mehr erhältlich (PDB, SMOW), so dass heute Folgestandards genutzt werden müssen.

Für die Bestimmung der Isotopenverhältnisse von Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel reicht für die Kalibrierung der Analytik ein „Null-Standard“ aus. Die D/H Isotopenverhältnisse zeigen jedoch eine enorme Varianz, so dass stark abweichende Proben bei einer Einpunktkalibrierung stark fehlerbehaftet sind. Gelöst wurde dieses Problem durch die Etablierung einer VSMOW-SLAP Skalierung [**Gonfiantini 1978**]. Dabei dient der VSMOW weiterhin als „Null“-Standard, daran angeglichen wurden die Messungen eines stark abgereicherten Standards (SLAP) und eines „Mittel“-Standards (GISP), d.h. eines Standards, welcher Isotopenverhältnisse aufweist, die etwa in der Mitte zwischen SLAP und GISP liegen.

2.1.3 Laborstandards

Die bereits erwähnten internationalen Standards können nicht routinemäßig eingesetzt werden, da sie nur alle drei Jahre und nur in geringen Mengen erworben werden können. In der Praxis dienen sie als Kalibrierstandard des Arbeitsstandards im Labor. Leider sind die erhältlichen Stabil-Isotopenstandards meist nur für eine Stabil-Isotopen-Spezies, selten für zwei nutzbar. Da sich die meisten Stabil-Isotopen-Labore auf die Vermessung eines stabilen Isotops der Bioelemente spezialisiert haben und die Stabil-Isotopen-Systeme auf die Vermessung von nur einem Isotop pro Messlauf ausgelegt waren, fiel dieser Umstand bisher nicht ins Gewicht. Heute ist es jedoch möglich, bis zu drei Isotope in einem Messlauf zu vermessen. So können sowohl die stabilen Isotope O, H, N per Hochtemperaturpyrolyse, als auch C, N und S per 2-Trennsäulen-Elementaranalyse in einem Run bestimmt werden.

Außerdem macht die Multielement-Isotopen-Analytik die Nutzung eines einzigen Multielement-Isotopenstandards für organische Verbindungen wünschenswert. Im Zuge dieser Arbeit wurde deshalb ein Multielement-Isotopen-Standard *2,5-Bis-(5-tert.-butyl-benzoxazol-2-yl)-thiophen*, kurz BBOT, als Arbeitsstandard etabliert.

Die chemischen und physikalischen Kenndaten von BBOT sind der folgenden Tabelle 2-3 zu entnehmen:

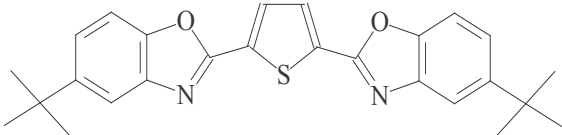
	Chemische und physikalische Daten
Bezeichnung	2,5-Bis-(5-tert.-butyl-benzoxazol-2-yl)-thiophen
Formel	C ₂₆ H ₂₆ N ₂ O ₂ S
Molare Masse	430,57
Schmelzpunkt	200-201°C
Reinheit	> 99,5 %
Struktur	feines Pulver
Chemische Strukturformel	

Tabelle 2-3: Chemische und physikalische Kenndaten des verwendeten Labor-Isotopenstandards.

Dieser Multi-Element-Isotopenstandard bietet entscheidende Vorteile. Es sind alle Bioelemente in dieser chemischen Verbindung vorhanden, und die quantitative Zusammensetzung der Elemente entspricht weitgehend der Zusammensetzung von organischem Gewebe. Er ist nicht hygroskopisch, von hoher Reinheit, homogen, sehr stabil in seiner Lagerung und untoxisch. Die Einwaage wird durch die feine Pulverstruktur erleichtert, so dass Mengen von 0,1 mg noch problemlos eingewogen werden können. Entscheidend ist jedoch, dass die Isotopenverhältnisse der Bioelementzusammensetzung weitgehend im natürlichen Varianzbereich natürlicher Verbindungen liegen (Abbildung 2-1), denn eine zu große Diskrepanz zwischen Arbeitsstandard und Messprobe erhöht die Fehlerbehaftung der Isotopenmesswerte (siehe Gleichung 2-6).

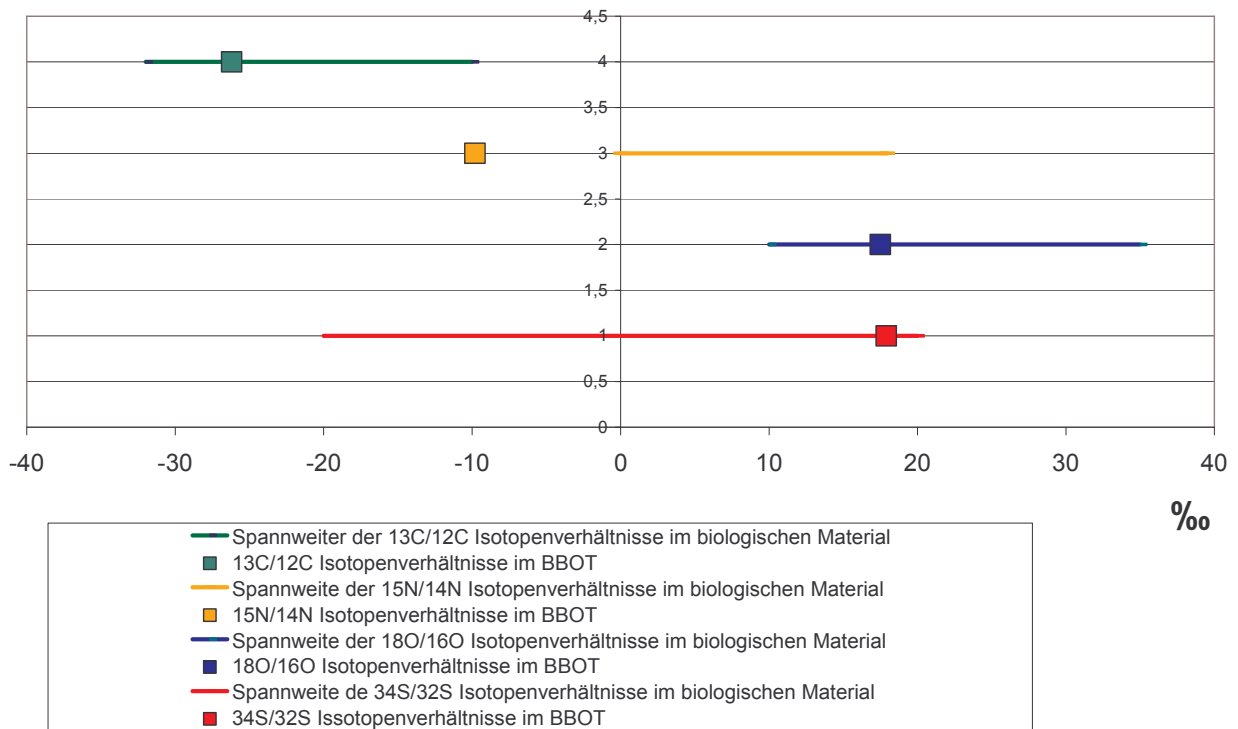


Abbildung 2-1: Isotopenverhältnisse des Arbeitsstandards BBOT im Vergleich zu den Isotopenverhältnissen in biologischem Material.

2.2 Isotopenfraktionierungen

Die möglichen Isotopenfraktionierungen beruhen auf Massenunterschieden, die durch kinetische und thermodynamische Effekte zu Isotopenfraktionierungen führen. Eine Übersicht zur Isotopenfraktionierung und deren physikalische Grundlagen findet sich bei R. Criss [Criss 1999].

Die kinetischen Isotopeneffekte sind die auffälligsten Fraktionierungen. Zwingend für diese Fraktionierung ist, dass kein vollständiger Umsatz erfolgt. Aber auch Systeme im Gleichgewichtszustand weisen Isotopenfraktionierungen auf, die als Equilibrierungseffekt bezeichnet werden.

2.2.1 Equilibrierungsfractionierung

Idealisiert und vereinfacht lassen sich diese Isotopenfraktionierungen quantenmechanisch durch den anharmonischen Oszillator erklären [Bigeleisen, 1965].

Dieser beschreibt angenähert die Potentialkurve eines 2-atomigen Moleküls mit der Möglichkeit der Dissoziation der Atome. Die Potentialenergie ergibt unter der Anwendung des Morse-Potentials die Form:

$$(2-7) \quad V = hcD_{eq} \left[1 - e^{-a(R_i - R_{eq})} \right]^2 \quad \text{mit } a = \left(\frac{\mu}{2hcD_{eq}} \right)^{1/2} * \omega \quad \text{und} \quad \omega = \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Wird das Morse-Potential mit der Schrödinger Gleichung gelöst, so findet man die Schwingungsterme:

$$(2-8) \quad G(v) = (v + 1/2) \tilde{\nu} - (v + 1/2)^2 \chi_{eq} \tilde{\nu} + (v + 1/2)^3 \gamma_{eq} \tilde{\nu} + \dots$$

mit $\tilde{\nu} = \omega/2\pi c$ gilt:

$$(2-9) \quad G(v) = (v + 1/2) \omega/2\pi c - (v + 1/2)^2 \chi_{eq} \omega/2\pi c + (v + 1/2)^3 \gamma_{eq} \omega/2\pi c + \dots$$

Die χ_{eq} und γ_{eq} werden als Anharmonizitätskonstanten bezeichnet, die empirisch ermittelt werden und spezifisch für das jeweilige Molekül sind. Die Terme der Anharmonizitätskonstanten werden bei höheren Schwingungsniveaus immer einflussreicher und bewirken letztlich eine Konvergenz der Energieniveaus. Die Zahl der Schwingungsniveaus ist diskret ($v = 0, 1, \dots, v_{max}$) und endlich. Aus der Gleichung ist zu schließen, dass eine Nullpunktschwingungsenergie existiert:

$$(2-10) \quad \frac{1}{2} (1 - \frac{1}{2} \chi_{eq}) \omega/2\pi c \approx \frac{1}{2} \omega/2\pi c$$

Die Dissoziationsenergie D_0 unterscheidet sich gerade um diese Nullpunktschwingungsenergie vom D_{eq} des Potentialminimums und damit:

$$(2-11) \quad D_0 = D_{eq} - \frac{1}{2} \omega/2\pi c$$

D_0 hat die Einheit cm^{-1} , die Energieeinheit [J] ergibt sich aus dem Produkt der Lichtgeschwindigkeit und der Plankschen Konstanten mit der resultierenden Nullpunktenergie:

$$(2-12) \quad E_0 = \frac{1}{2} \hbar \omega = \frac{1}{2} h \nu = \frac{1}{2} h c \tilde{\nu}$$

Der zweite Term der Gleichung D_0 erhält für die Isotopenfraktionierung nun die entscheidende Bedeutung, da ω definiert ist als:

$$(2-13) \quad \omega = \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

mit angenommener konstanter Kraftkonstanten (die Bindungsverhältnisse, gegeben durch die Elektronen ändern sich durch die Substitution eines schweren Isotops nicht) gilt:

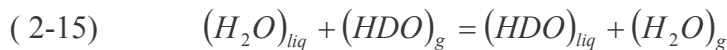
$$(2-14) \quad D_0 = D_{eq} - f \left(\frac{1}{\mu} \right)^{\frac{1}{2}} \text{ mit } f = \frac{k^{\frac{1}{2}}}{4\pi c}$$

Daraus ist abzuleiten, dass im Vergleich das Molekül D₂ eine größere Dissoziationsenergie benötigt als sein leichteres Pendant H₂, da der zweite Term der Subtraktion durch die größere reduzierte Masse kleiner wird (Abbildung 2-2).

Außerdem ist zu folgern, dass bei einer Molekülbildung das schwere Isotop immer die Verbindung mit der höchsten Kraftkonstanten anstrebt, da hierbei der Energiegewinn maximiert wird.

Diese Grundüberlegungen lassen sich durch thermodynamische Daten nachvollziehen.

Als Beispiel einer typischen Austausch-Reaktion lässt sich das Gleichgewicht zwischen gasförmigem (g) und flüssigem (liq) Wasser berechnen; es gilt die Reaktion:



Nachdem sich bei dieser Reaktion ein Gleichgewicht eingestellt hat, gilt eine Gleichgewichtskonstante K, die über eine abgeleitete Gibbs - Gleichung berechenbar ist:

$$(2-16) \quad G_m = -RT \ln K$$

Nach der Tabelle 2-4 ergibt sich demnach für G_m ein Wert von -45. Damit ist aus der Gleichung 2-16 eine Gleichgewichtskonstante von 1,079 zu errechnen.

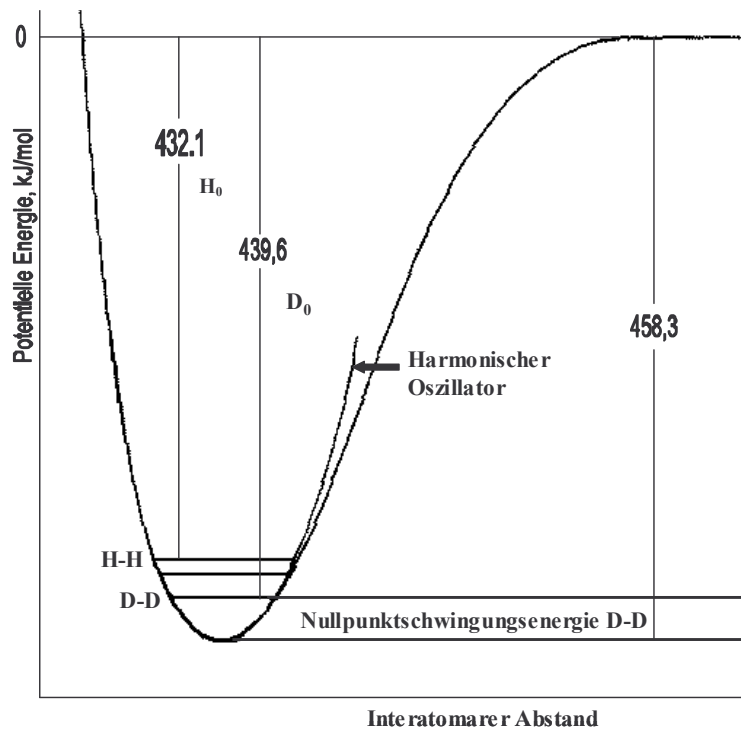


Abbildung 2-2: Potentialkurve Die Bindungsdissoziationsenergien sind entnommen: D. E. Gray, American Institute of Physics Handbook. McGraw-Hill 1972.

Substanz	$\Delta_B G / \text{kJ mol}^{-1}$
H ₂ O _(l)	-237,13
H ₂ O _(g)	-228,57
HDO _(l)	-241,86
HDO _(g)	-233,11

Tabelle 2-4: Freie Standardbildungsenthalpien von Wasser [Atkins 1996].

Mit $K > 1$ ist zwar anzunehmen, dass die Austauschreaktion mehr auf der Produktseite liegt, aber die Gleichgewichtskonstante, resultierend durch die zugrundeliegende, geringe freie Bildungsenergie, ist nur unwesentlich von 1 verschieden. Üblicherweise sind die Unterschiede von K mit 3 Dekaden höher anzutreffen. Dies verdeutlicht die vorhandenen, aber sehr geringen Isotopenunterschiede in dieser Austauschreaktion.

Praktisch kann man diese Austauschreaktion zur Bestimmung der H/D Isotopenverhältnisse im Wasser nutzen. Als Katalysator wird Platin eingesetzt, das in einer Wasserstoff-Atmosphäre ein spezifisches Gleichgewichtsisotopenverhältnis des Atmosphärenwasserstoffs mit dem Wasserstoff im Wasser generiert [Koehler 2000].

Diese Gleichgewichtskonstante ist in diesem Fall identisch mit dem Fraktionierungsfaktor α . Der Fraktionierungsfaktor kann auch errechnet werden nach:

$$(2-17) \quad \alpha = \frac{R_A}{R_B} \quad \text{mit} \quad R_{(\text{Verbindung})} = N_{(\text{schweres Isotop})} / N_{(\text{leichtes Isotop})}$$

oder angenähert:

$$(2-18) \quad \delta_A - \delta_B = \Delta_{A-B} = 10^3 \ln \alpha_{A-B}$$

Diese Beziehung kann schon aus der Grundgleichung (2-1) abgeleitet werden, denn es gilt:

$$(2-19) \quad \delta_A = \frac{R_A - R_{STD}}{R_{STD}} * 1000 = \left[\frac{R_A}{R_{STD}} - 1 \right] * 1000$$

und nach R_A aufgelöst:

$$(2-20) \quad R_A = (\delta_A + 1000) * R_{STD} / 1000$$

ermittelt man die Differenz zweier Isotopenverhältnisse $\delta_A - \delta_B$ und formt nach (2-18) um, ist abzuleiten:

$$(2-21) \quad \alpha = \frac{R_A = (\delta_A + 1000) * R_{STD} / 1000}{R_B = (\delta_B + 1000) * R_{STD} / 1000} = \frac{(\delta_A + 1000)}{(\delta_B + 1000)}$$

subtrahiert man beide Gleichungsseiten um 1 ergibt sich:

$$(2-22) \quad \alpha - 1 = \frac{(\delta_A - \delta_B)}{\delta_B + 1000}$$

da δ_B bei den stabilen Isotopen der Bioelemente gegenüber 1000 annähernd zu vernachlässigen ist, kann die Gleichung vereinfacht werden:

$$(2-23) \quad \alpha - 1 = \frac{(\delta_A - \delta_B)}{1000} = \Delta_{A-B}/1000$$

Der Fraktionierungsfaktor ist, wie am Beispiel (2-16) dargelegt, kaum von 1 verschieden. Deshalb lässt sich $\alpha - 1$ durch die Funktion: $\ln \alpha$ angenähert vereinfachen. Damit erhält man schließlich die Gleichung (2-18).

Im Resultat ergibt sich, dass die Differenz der Isotopenverhältnisse zweier Phasen annähernd den Fraktionierungsfaktor zwischen ihnen widerspiegelt.

2.2.2 Kinetische Isotopenfraktionierung

Die kinetische Isotopenfraktionierung kann auf der Grundlage der klassischen Mechanik erklärt werden. Die kinetische Energie eines idealen Gasteilchens ist hierin gegeben durch:

$$(2-24) \quad E = \frac{1}{2} m \cdot v^2$$

Bei konstanter Energie ist die Geschwindigkeit indirekt-proportional zur Masse, d. h. es gilt:

$$(2-25) \quad \frac{1}{m} = \sqrt{v}$$

Die notwendige Konsequenz ist, dass eine ansteigende Masse geringere Geschwindigkeiten bei konstanter Energie ergibt. Betrachtet man zwei unterschiedlich schwere Teilchen, so erhält man das Grahamsche Gesetz der Diffusion:

$$(2-26) \quad \frac{v_1}{v_2} = \sqrt{\frac{m_2}{m_1}}$$

Daraus ergibt sich, dass die höchste Isotopenfraktionierung bei den Teilchen Prometium und Deuterium zu beobachten ist (theoretisch: 1,41). Höhere Isotope weisen aufgrund der geringeren Massenunterschiede, d.h. Quotient strebt gegen 1, nur noch sehr geringe Isotopenfraktionierungen auf.

Um so bemerkenswerter ist die Tatsache, dass diese Diffusionsfraktionierung zur Abtrennung des Uran 238 vom Uran 235 als Uranhexafluorid großtechnisch genutzt wurde. Der theoretische Trennkoeffizient liegt dabei lediglich bei 1,0043. Bedenkt man, dass das Isotopengemisch am Anfang ca. 0,720 % Uran 235 enthält, so steigt der Anteil nach der ersten Trennstufe nur auf 0,722 % an [**Finkelstein 1978**].

Aufgrund der verschiedenen Nullpunktenergien der Isotope eines Elements weisen Moleküle mit dem schweren Isotop höhere Dissoziationsenergien auf als Moleküle mit dem leichteren Isotopenpendant, sie sind damit stabiler. Dies hat Auswirkungen auf chemische Reaktionen, da die Bindung des leichteren Isotops (C-H) mit geringerer Energie aufzubrechen ist als die Bindung mit dem schweren (C-D). Bei nicht vollständig abgelaufenen Reaktionsumsätzen kommt es damit zu Isotopenfraktionierungen, wie z. B. der Abreicherung des Kohlenstoffs in Pflanzen.

Mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung lässt sich diese Isotopenfraktionierung am Beispiel von D₂ und H₂ beschreiben und die Temperaturabhängigkeit aufzeigen:

$$(2-27) \quad k = A e^{\frac{E_A}{RT}}$$

bzw. ohne molare Betrachtung:

$$(2-28) \quad k = A e^{\frac{E}{kT}}$$

Setzt man die beiden Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation von H₂ und D₂ ins Verhältnis, ergibt sich (siehe Nullpunktenergie, mit T= 298K):

$$(2-29) \quad \frac{k_{(D-D)}}{k_{(H-H)}} = e^{-\frac{hc(\tilde{\nu}_{(H-H)} - \tilde{\nu}_{(D-D)})}{2kT}} = 0,04528$$

Diese Gleichung zeigt, dass bei einer Temperatur von 25° C der Bruch einer H-H Bindung ungefähr 22mal schneller erfolgt als der Bruch einer D-D Bindung. Erhöht sich jedoch die Temperatur um 100° C, so vermindert sich das Verhältnis auf 10 : 1, d. h. die Isotopenfraktionierung wird durch höhere Temperaturen abgeschwächt.

Die Betrachtung gilt für alle Isotope gleichermaßen, jedoch ist aufgrund der geringen Massenunterschiede und damit ähnlicher Wellenzahlen die Isotopenfraktionierung noch wesentlich geringer.

2.3 Messung der stabilen Isotope

Als Methode zur Messung von stabilen Isotopen hat sich die Massenspektrometrie, neben der NMR, besonders bewährt. Massenspektrometer sind in fast allen Feldern der Naturwissenschaft etabliert und verbreitet. Einen guten Überblick hierzu liefert Burlingame [Burlingame 1996].

Der hier untersuchte Einsatzbereich liegt in der Messung stabiler Isotope, die im wesentlichen mit drei Arten von Massenspektrometern durchgeführt wird (TIMS, ICP-MS mit Multikollektor und IRMS), da sie die stabilen Isotope mit der nötigen Genauigkeit und Reproduzierbarkeit detektieren können. Die beiden ersteren können zur Bestimmung der höheren stabilen Isotope eingesetzt werden und sollen daher im weiteren nicht näher erläutert werden. Anzumerken ist jedoch, dass gerade die Weiterentwicklung der ICP-MS zur Bestimmung der höheren Isotope in der letzten Zeit enorme technische Fortschritte (z. B. Kollisionszelle) verzeichnet [Becker 2000].

Das Anwendungsgebiet der IRMS-Systeme (Isotope Ratio Mass Spectrometer) liegt in der Bestimmung der „leichten“ Elemente, besonders der stabilen Isotope der Bioelemente. Zur Detektion im Massenspektrometer ist es notwendig, die stabilen Isotope der Bioelemente (N₂, CO₂, SO₂, H₂, CO) dem Massenspektrometer in Gasform zuzuführen, weshalb gelegentlich der Zusatz (GIRMS = gasIRMS) verwendet wird.

Die IRMS-Systeme untergliedern sich in zwei verschiedene Messanordnungen: Zum einen die Dual-Inlet-Systeme (DI-IRMS), deren Aufbau schon 1950 definiert wurde [Mc Kinney 1950] und zum anderen die Continuous-Flow-Systeme (CF-IRMS). Die Unterscheidung liegt in der Art der Probenzuführung. Das CF-IRMS verwendet ein Trägergas (Helium) zur Probenzuführung, während im Dual-Inlet-System das Probengas aus einem im Volumen verstellbaren Gasvorratsgefäß über eine Restriktionskapillare in das Hochvakuumsystem des IRMS diffundiert. Das Referenzgas liegt in einem zweiten verstellbaren Gasvorratsbehälter vor und wird durch Wechselschaltung der Einlassventile dem MS zugeführt. Durch Verstellung der Volumina der beiden Gasvorratsgefäße und damit gleichzeitigem Druck und resultierender Flusserrhöhung ins MS erfolgt der Abgleich der Proben und des Referenzgases auf die gleichen Intensitäten des Mayor Peaks (z. B. Kohlendioxid = Masse 44 = ¹²C¹⁶O¹⁶O) und abwechselnder Messung des Referenz- und Probengases. Durch den Intensitätenabgleich umgehen die Dual-Inlet-Systeme weitgehend

eines der Hauptprobleme der CF-IRMS-Systeme, die Inlinearität. Dies und die höhere Reproduzierbarkeit sind kennzeichnend dafür, dass auch heute noch DI-IRMS-Systeme bei extrem geringen Isotopendifferenzbestimmungen, z. B. in der Ozeanographie eingesetzt werden. Auch ist die Messung der H/D Isotopenverhältnisse wesentlich einfacher, da kein Helium-Trägergas (siehe Kapitel 4.4.4) genutzt wird. Der wesentliche Nachteil der DI-IRMS liegt in der zeit- und arbeitsintensiven Vorbereitungszeit der Messgase [Hachey 1987], da sie in einem Offline-Prozess in einer hohen Reinheit dargestellt werden müssen.

Verbesserungen wurden zwar angestrebt, aber erst Preston und Owens [Preston 1983] beschrieben in ihren Arbeiten eine Online-Lösung in Form eines Elementanalysators mit einem IRMS, das Helium als Trägergas nutzte. Eingesetzt wurde dieses Dual-Cup-System zur Messung von $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen im Boden. Kurze Zeit später wurden die Messungen auch auf $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ organischer Verbindungen erweitert [Preston 1985]. Die CF-IRMS in Kombination mit Elementanalysatoren ist derzeit die Standardkombination zur Gesamtmessung der stabilen Isotope der Bioelemente aus festen und flüssigen Proben.

2.3.1 Technik der Massenauftrennung

Die Ablenkung geladener Teilchen im Magnetfeld unterliegt zwei grundlegenden physikalischen Mechanismen.

Zum einen wird die kinetische Energie eines Teilchens im elektrischen Feld beeinflusst durch die angelegte Spannung (U) und die Elementarladung (z) des elektrisch geladenen Teilchens, daraus ergibt sich:

$$(2-30) \quad \frac{m \cdot v^2}{2} = U \cdot z$$

Das Teilchen bewegt sich damit mit einer Geschwindigkeit von:

$$(2-31) \quad v = \sqrt{\frac{2 \cdot U \cdot z}{m}}$$

Die Geschwindigkeit der elektrisch geladenen Teilchen bei vorgegebener konstanter Spannung ist abhängig von ihrem z/m Verhältnis.

Die zweite Komponente ist zum anderen der Einsatz eines Magnetfeldes, das die Ablenkung der Teilchen bewirkt. Das Magnetfeld wird dabei senkrecht zur Flugrichtung der elektrisch

geladenen Teilchen angelegt. Durch dieses senkrechte Querfeld wirkt die Lorentz-Kraft auf die elektrisch geladenen Teilchen:

$$(2-32) \quad F_L = z(v \times B)$$

Die Lorentzkraft steht senkrecht zur Geschwindigkeit v und ändert lediglich die Richtung, nicht aber die Teilchengeschwindigkeit. Damit ergibt sich die Möglichkeit, geladene Teilchen abzulenken. Durchlaufen geladene Teilchen einen Kreis mit dem Radius r , so ist die Zentrifugalkraft gleich der Lorentz-Kraft:

$$(2-33) \quad \frac{m \cdot v^2}{r} = z \cdot v \cdot B$$

Wird diese Gleichung nach r aufgelöst ergibt sich:

$$(2-34) \quad r = \frac{m}{z} \cdot \frac{v}{B}$$

Die Geschwindigkeit des geladenen Teilchens ist nach Gleichung 2-30 abhängig vom angelegten elektrischen Feld. Daraus erhält man die grundlegende Gleichung:

$$(2-35) \quad \frac{m}{z} = \frac{B^2 \cdot r^2}{2 \cdot U} \quad \text{mit} \quad \frac{B^2}{2 \cdot U} = \text{konstant} \quad \text{folgt:} \quad \frac{m}{z} = r^2$$

Daraus ergibt sich, dass bei konstanter Magnetfeldstärke (B) und Hochspannung (U) das Masse-zu-Ladungsverhältnis den Flugradius des geladenen Teilchens vorgibt.

Mit zunehmender Masse und gleichbleibender Ladung wird damit zunehmend der Radius der geladenen Teilchen größer. Unterschiedliche Massen können letztlich durch ihre unterschiedlichen Flugradien aufgetrennt werden.

Als weitere Einflussgrößen verbleiben die Magnetfeldstärke (B) und Hochspannung (U). Durch ihre Variationen ist es möglich, unterschiedliche Massen auf gleiche Flugradien zu bringen und damit detektierbar zu machen.

2.3.2 Messtechnische Besonderheiten der Isotopenmessung

Im wesentlichen basiert der Aufbau der Isotopenmassenspektrometer auf dem Design von Nier [Nier 1947].

Eingesetzt werden Sektorfeldgeräte, die sich durch ihre hohen Ionisierungsraten und die Optimierung auf maximale Transmission und maximale Stabilität der Messung der Ionengase auszeichnen. Eine schematische Darstellung des Aufbaus dieser Sektorfeldgeräte ist in Abbildung 2-3 wiedergegeben.

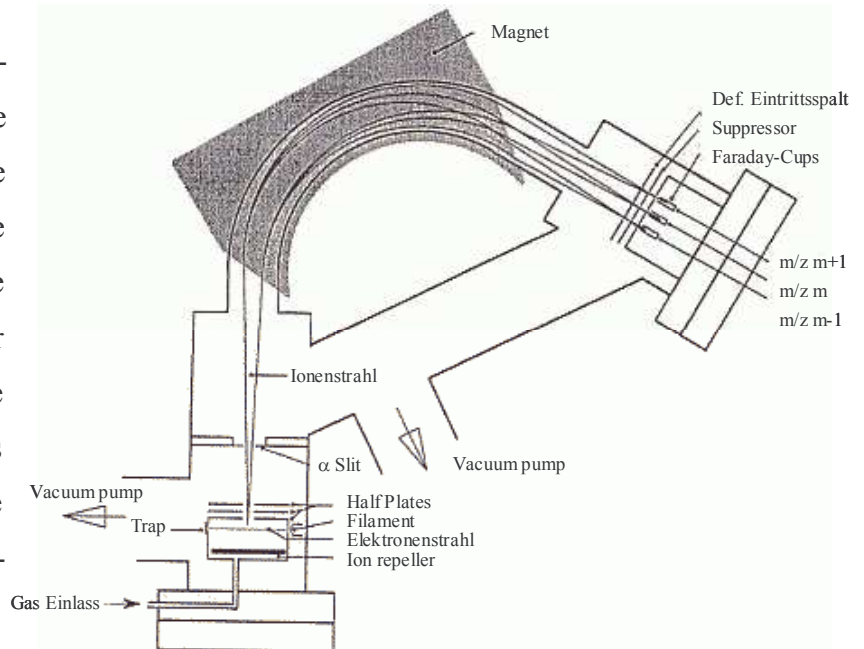


Abbildung 2-3: Aufbau eines Sektorfeldgerätes zur Bestimmung der stabilen Isotope der Bioelemente.

2.3.2.1 Ionenquelle

Das Design der Ionenquelle ist auf eine hohe Ionisierungsrate ausgelegt, so dass Ionisierungen von 1 Ion auf 1000 Moleküle üblich sind. Im Gegensatz hierzu weisen organische Massenspektrometer eine um 3 Potenzen geringere Ionisierungsrate auf. In der Praxis wird meist die maximale Elektronenstoß-Ionisation von 100 eV benutzt, da diese die beste Linearität des Isotopenmassenspektrometers gewährleistet.

Die dargestellten Ionen werden mit Hilfe des *Ion Repeller* aus der Ionenquelle entfernt, mit Hilfe der *Plates* fokussiert und mit einer Beschleunigungsspannung von 2 - 10 keV in die *Flight Tube* überführt, in der letztlich die Auftrennung der Ionenströme mit Hilfe des elektromagnetischen Feldes erfolgt.

Üblicherweise ist der Eintrittspalt der Isotopenmassenspektrometer auf einer Größe gefertigt, der nur eine geringe Auflösung von $m/\Delta m=100$ erlaubt. Diese Auflösung ist gerade ausreichend, die einfachen Gase der Bioelemente aufzutrennen.

Organische Massenspektrometer weisen Eintrittspalte auf, die mindestens eine um den Faktor 10 höhere Auflösung gewährleisten. Die höhere Auflösung und die geringe Ionisierung

münden in einer geringen Intensität der Ionenströme ($< 10^{-12}$ A). Dagegen arbeiten IRMS mit starken Ionenströmen von 10^{-11} bis 10^{-8} Ampere.

2.3.2.2 Analyser

Die starken Ionenströme bedingen im Vergleich zu den organischen Massenspektrometern ein anderes Kollektorenkonzept, da Elektronenmultiplier übersteuert bzw. beschädigt würden. Deshalb werden die unempfindlicheren Faraday-Auffänger eingesetzt, an die die Ionen ihre spezifische Ladung abgeben, die über hochohmige Widerstände abfließt. Dieses Verfahren liefert im Vergleich zu den Elektronenmultipliern zusätzlich ein höhere Reproduzierbarkeit der Messung. Die verstärkten Ionenströme werden schließlich durch Spannung-/ Frequenzkonverter mit hoher Linearität digitalisiert.

Mögliche Elektronenüberschläge bei der Entladung werden durch den Einsatz von Supressoren verhindert, die durch Anlegung einer Spannung (50 V) am Eingang der Faraday-Auffänger diese Überschläge ausschließen.

Besonders charakteristisch für Isotopenmassenspektrometer sind der Einsatz von mehreren Faraday-Kollektoren und die Breite des Eintrittschlitzes. Sie sind deutlich größer als der einfallende Ionenstrom. Im Ergebnis erhält man einen typischen „Flat-Top-Peak“ (Beispiel CO_2 - Abbildung 2-4). Verschiebungen der Ionenströme während der Messung, induziert durch z. B. Temperaturschwankungen, können so weitgehend kompensiert werden.

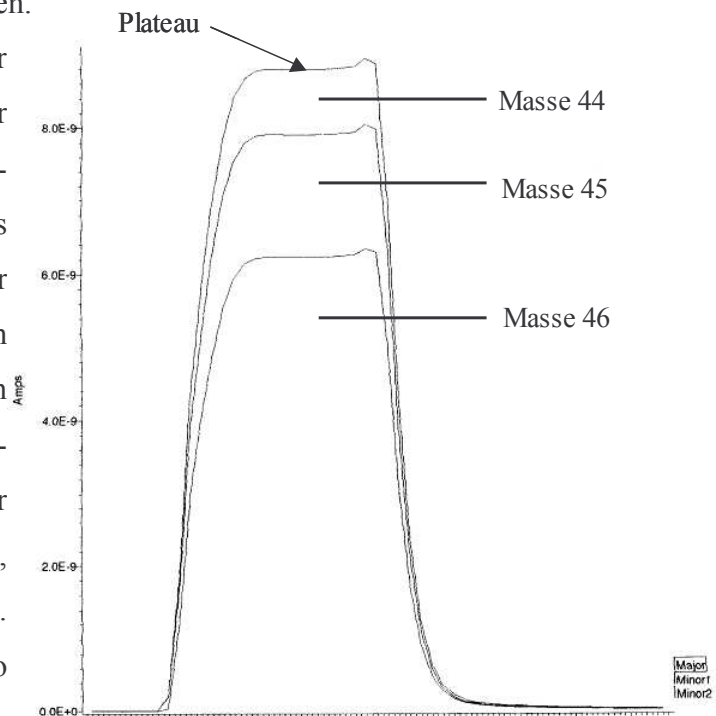


Abbildung 2-4: Chromatogramm einer Referenzgasmessung von Kohlendioxid.

Erkennbar sind die typischen Plateaus der Isotopenmessung. Der leichte Puls am Ende des Plateaus ist auf die Ventilschaltung zurückzuführen. Die ähnlichen Höhen der drei Plateaus sind kein Hinweis auf ähnliche Intensitäten der Massen. Die Darstellung des Auswertungsprogramms passt die Intensitäten in einer Grafik an.

Organische Massenspektrometer weisen dagegen einen sehr kleinen Eintrittsspalt mit lediglich einem Kollektor auf. Einkollektorsysteme mit einer sequenziellen Messung der einzelnen Ionenströme zeigen Reproduzierbarkeiten in der stabilen Isotopenmessung von maximal 5 % [Otsuki 1983], dagegen weisen Multikollektorensysteme Reproduzierbarkeiten auf, die mindestens um den Faktor 20 besser sind. Durchgesetzt hat sich bei den IRMS-Systemen ein 3-Kollektoren System

folgender Bauart (Abbildung 2-5): Zwei breite Faraday-Kollektoren (Major und Minor 2) umgeben einen Faraday-Kollektor mit einer engeren Breite (Minor 1).

Der Minor 1 ist der zentrale Kalibrierkollektor, der zum Abgleich des optimalen Ionenstromeinfalls der betreffenden Massen genutzt wird. Einen vertiefenden Einblick zum Design der Ionenquelle und des Analysers erhält man in der Arbeit von Prosser [Prosser 1993].

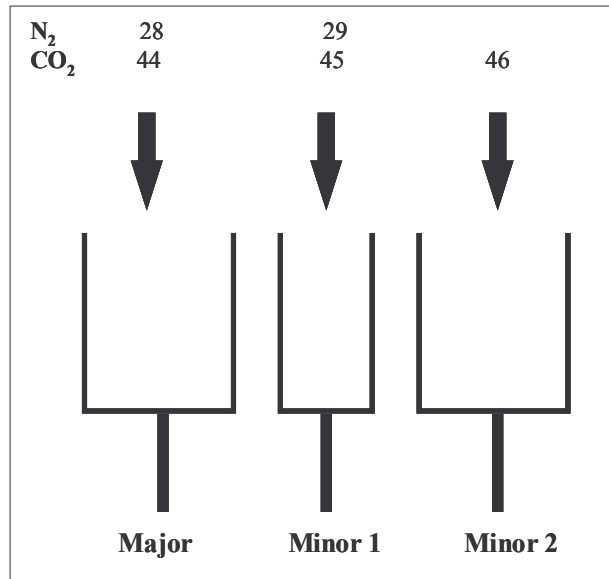


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung des universalen Kollektorsystems in IRMS-Systemen mit der beispielhaften jeweiligen Massendetektion für Stickstoff und Kohlendioxid.

3 *Stand der Forschung*

3.1 *Sauerstoffisotope ^{18}O und ^{16}O und Wasserstoffisotope D und H*

3.1.1 *Isotopenvariation im Grund- bzw. Oberflächenwasser*

Wasser ist ein Grundbaustein des Lebens, doch nur ein geringer Anteil dessen, ca. 0,002 %, ist direkt als Oberflächensüßwasser nutzbar. Der weitaus größte Anteil ist mit einem Volumen von $1.37 \cdot 10^9 \text{ km}^3$ in den Weltmeeren zu finden. Aus stabil-isotoper Sicht sind die Weltmeere hinsichtlich der Isotope $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse als weitgehend homogen anzusehen. So schwanken die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ bzw. D/H Isotopenverhältnisse nur unwesentlich um Null [Graig 1965]. Dagegen zeigt das Süßwasser erhebliche Varianzen, die im $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenwert einen Bereich von + 4 bis – 55 ‰, bzw. im D/H Isotopenwert einen Bereich von + 40 bis – 500 ‰ abdecken können.

Die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse sind dabei korreliert mit den D/H Isotopenverhältnissen. Diese Korrelation etablierte sich als „*meteoric water line*“ [Graig 1961] mit der mathematischen Darstellung:

$$(3-1) \quad \delta D = 8\delta^{18}\text{O} + 10$$

Physikalische Grundlage dieser Varianz ist die Rayleigh-Fraktionierung, die die Isotopenvarianz in den Niederschlägen bewirkt. Im Kern regnet das schwere Wasser früher ab als das leichte mit einer gleichzeitigen Verarmung der Wolke an schwerem Wasser:

Es gilt:

$$(3-2) \quad \delta = 1000(f^{\alpha-1} - 1)$$

f = Verhältnis des $^{16}\text{O}(\text{H})$ -zurückgebliebenen Wassers zur Ausgangsbasis
 α = Fraktionierungsfaktor

Der Fraktionierungsfaktor ergibt sich aus den unterschiedlichen Dampfdrücken des ^{16}O - bzw. ^{18}O -Wassers bei gegebenen Temperaturen. Die beiden Phasengrenzlinien flüssig/gasförmig sind mit Hilfe der Clausius Clapeyronschen Gleichung beschreibbar:

$$(3-3) \quad \frac{d \ln p}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}$$

Sie ergeben für den Fraktionierungsfaktor die Beziehung:

$$(3-4) \quad \alpha = Ae^{B/RT} \quad \text{mit } B, A = \text{Konstante}$$

Es ist ersichtlich, dass die Abregnungsisotopenwerte sowohl für $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ als auch D/H temperaturabhängig sind. Dansgaard [Dansgaard 1964] hat dies in einer einfachen empirischen Gleichung festgehalten:

$$(3-5) \quad \delta^{18}\text{O}_{\text{Avg.}} \approx 0,695T_{\text{Avg.}} - 13,6$$

Der mittlere Isotopenwert ist also korreliert mit der mittleren Jahrestemperatur an einem bestimmten Ort. Neben der Temperatur sind jedoch weitere Einflussgrößen vorhanden. So ist der Kontinentaleffekt ein weiterer wichtiger Effekt, der beschreibt, dass die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse im Wasser mit zunehmendem Abstand von der Küste durch Abregnung stetig abgereicherte Werte annehmen [Craig 1961]. In der Höhe über N. N. liegt eine weitere Einflussgröße, da die Wolke in höhere Atmosphärenschichten aufsteigt und somit die

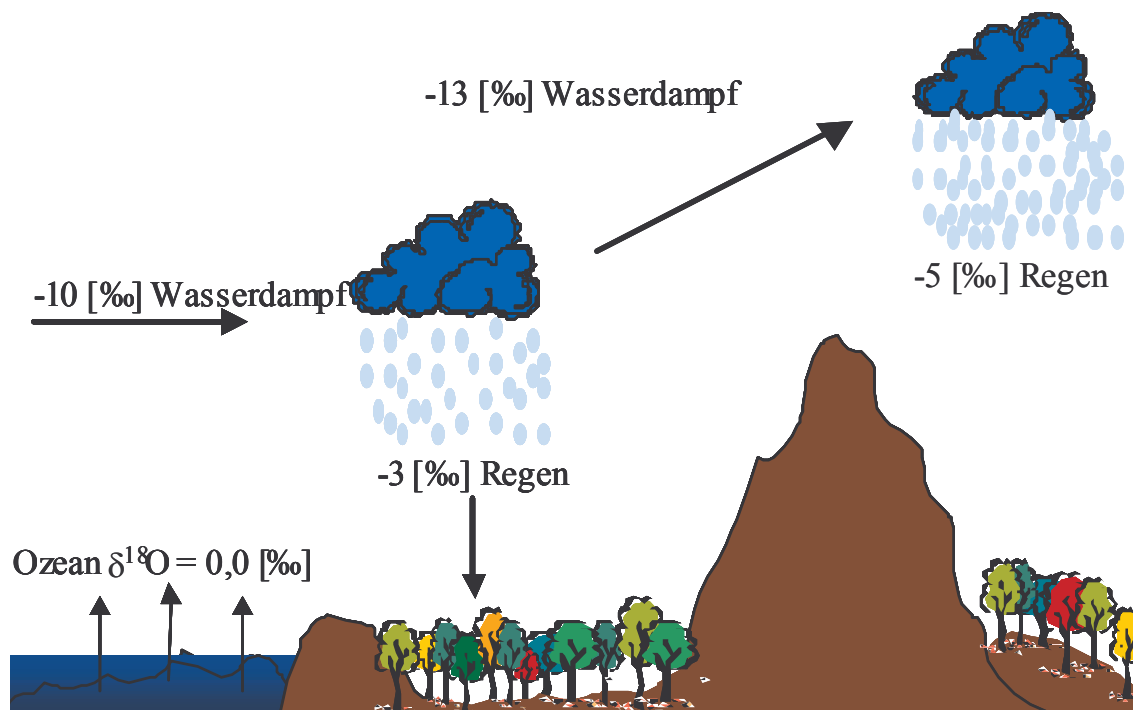


Abbildung 3-1: Vereinfachte Isotopenfraktionierung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotope im Wasserkreislauf.

Kondensation durch die niedrigere Temperatur begünstigt wird [Ziegler 1976]. Als besonders gravierend sind dabei topographische Einschnitte beispielsweise Gebirgszüge zu bewerten, da sie unterschiedliche Isotopenverhältnisse im Wasser auf den durch die Erhebung getrennten Seiten bewirken [Siegenthaler 1980].

Schließlich hat auch die jährliche Niederschlagsmenge einen wenn auch geringen Einfluss auf die Isotopenverhältnisse des Wassers [Förstel 1984]. Vereinfacht dargestellt gibt die Abbildung 3-1 den Mechanismus der Isotopenvariation im Wasser wieder. Sehr ausführliche und detaillierte Diskussionen des Wasserkreislaufs sind bei Gat und Araguas-Araguas zu finden [Gat 2000, Araguas-Araguas 2000].

Für Deutschland ergibt sich damit ein signifikantes Abregnungsmuster im Grundwasser (Abbildung 3-2).

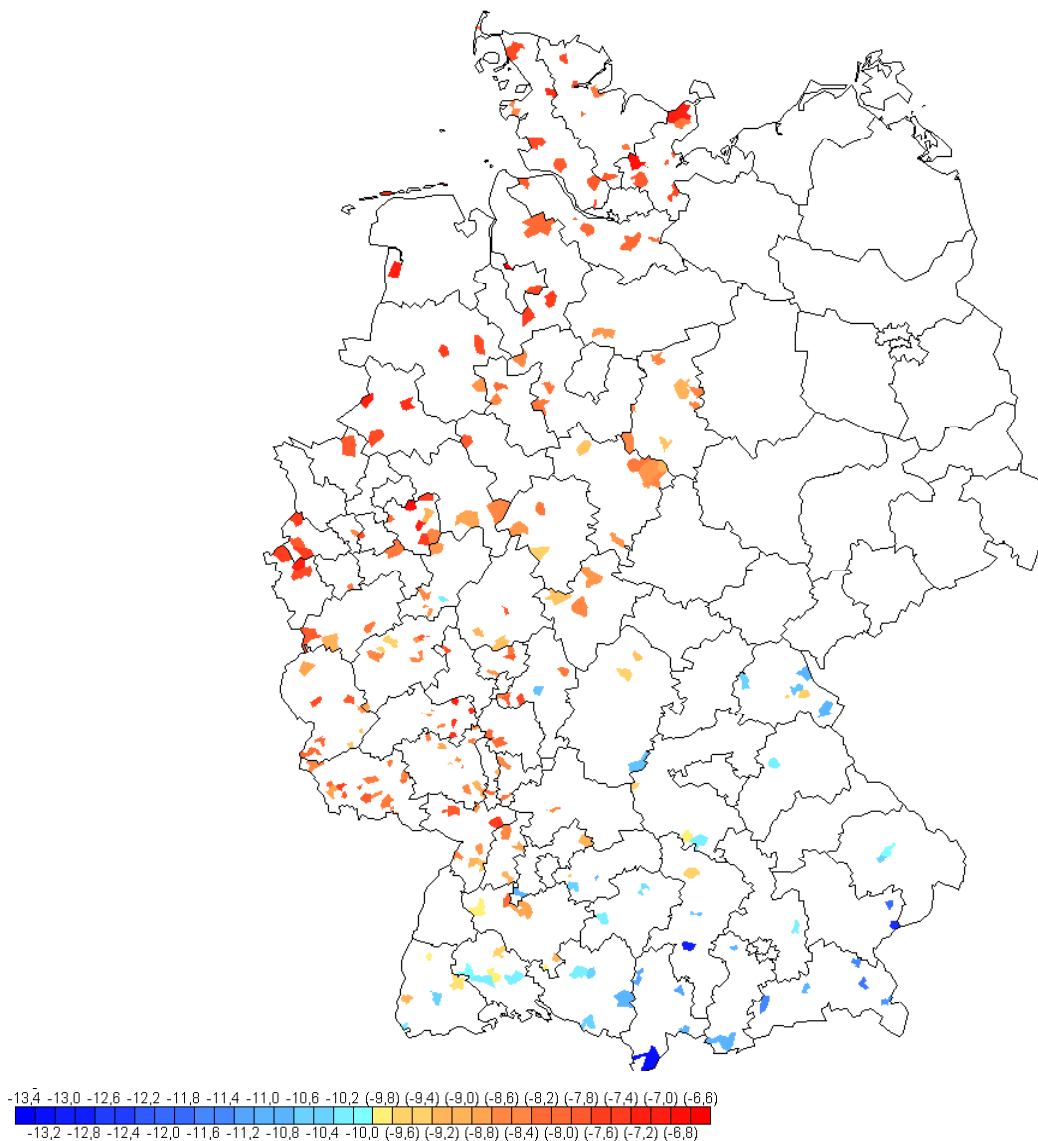


Abbildung 3-2: $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse im Grundwasser von Westdeutschland. Gemäß der Hauptwindrichtung von Nordwest nach Südost, sind abgereicherte $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse im Grundwasser zu finden [Förstel 1982].

Daraus zeigt sich, dass die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse im Grundwasser mit der Tendenz Südost zunehmend an ^{18}O -Isotopen angereichert sind.

Pflanzen und Tieren, die in den jeweiligen Regionen heranwachsen, stehen damit hinsichtlich der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse im Wasser unterschiedliche Wasserpools in der Versorgung zur Verfügung.

Zu beachten ist dabei, dass lediglich das Grundwasser zeitlich konstante $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse liefert. Oberflächenwasser zeigt jahreszeitliche Einflüsse bedingt durch die Winter- und Sommertemperaturen und damit abgeleitete angereicherte $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ bzw. D/H Niederschlägen im Sommer [**Dawson 1991**].

Zusätzlich kann die Herkunft des Niederschlages jahreszeitlich differieren und somit ebenfalls zu unterschiedlichen jahreszeitlichen Isotopenzusammensetzungen des Oberflächenwassers führen. Im Wasser des Bodens kompensieren sich die jahreszeitlichen Effekte erst ab einer Tiefe von 60 cm [**Brodersen 2000**]. Flachwurzeln Pflanzen können damit während der Vegetationsperiode unterschiedlich angereicherte Wasserpools zur Verfügung stehen [**Allison 1982**].

3.1.2 Isotopenvariation in der Pflanze

Bei der Wasseraufnahme bzw. beim Wassertransport in den Pflanzen tritt nach derzeitigem Kenntnisstand keine Isotopenfraktionierung auf [Dawson 1991]. Dagegen zeigt der Wasserpool der Blätter aufgrund der Transpiration durch die Spaltöffnungen während der CO₂-Aufnahme erhebliche Isotopenanreicherungen, da während der Verdunstung die Wassermoleküle mit den Isotopen ¹⁶O und H geringfügig schneller verdunsten. Verstärkt wird die Fraktionierung durch die nicht turbulente Atmosphäre über den Blättern, die eine zusätzliche diffusionsabhängige Fraktionierung induziert.

Im Gleichgewichtszustand ist diese Isotopenanreicherung zu beschreiben als [Förstel 1978, Zundel 1978]:

$$(3-6) \quad \delta = (\varepsilon + \eta + \delta_l) + h(\delta_g - \eta - \delta_l)$$

mit δ_l = Isotopenverhältnis des Wassers in der flüssigen Phase
 δ_g = Isotopenverhältnis des Wassers in der Gasphase
 ε = Austauschfraktionierungsfaktor, basierend auf den unterschiedlichen Dampfdrücken der schweren (¹⁸O, D) und leichten (¹⁶O, H) Isotopenzusammensetzung des Wassers
 η = diffusionsabhängige kinetische Fraktionierung
 h = relative Luftfeuchte

Aus der theoretischen Grundgleichung lässt sich erkennen, dass die relative Luftfeuchtigkeit einen dominierenden Faktor darstellt. So reichert sich das Blattwasser aufgrund der niedrigeren Luftfeuchtigkeit während der Morgenstunden an und durch die erhöhte Luftfeuchtigkeit am Nachmittag ab [Allison 1985, Förstel 1978, Zundel 1978]. Die theoretische Grundgleichung ist idealisiert und kann die Isotopenzusammensetzung des Blattwassers nur annähernd beschreiben. Verbesserungen wurden durchgeführt, indem das Blattwasser nicht als homogen, sondern in Pools unterteilt aufgefasst wird, die unterschiedlich fraktionieren bzw. miteinander im Austausch stehen [Yakir 1990].

Die Früchte der Pflanzen unterliegen wegen der geringen Anzahl an Spaltöffnungen und des kompakteren Aufbaus einer geringeren und konstanteren Fraktionierung. Die Isotopenanreicherung in den Früchten ist dabei nicht konstant, sondern unterscheidet sich in den Pflanzenarten schon aufgrund physiologischer und anatomischer Unterschiede [Dunbar 1983].

Die spezifischen Anreicherungen der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse des Gewebewassers in den Pflanzen verdeutlichen, dass es schwierig ist, von den konstanten $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen des Grundwassers einer Region auf die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse der Pflanze zu schließen, besonders auch deshalb, da die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse des Gewebewassers in den verschiedenen Pflanzenteilen (Frucht, Blatt, Stiel, Wurzel) nicht identisch sind, sondern schwanken können [Förstel 1985].

Dennoch unterscheiden sich die Isotopenverhältnisse des Wassers und die mittlere relative Luftfeuchtigkeit von Regionen signifikant. Eine Pflanzenart spiegelt dies unter Berücksichtigung von spezifischen Anreicherungen wider. Verwendet man deshalb Referenzmaterialien einer Region, so sind auf dieser Grundlage geographische Herkunftsaussagen von spezifischen Pflanzenprodukten möglich.

So wurde gezeigt, dass die Herkunft von Wein [Holbach 1994], Kartoffeln [Förstel 2000] oder Orangen-Direktsaft [Houerou 1999] mit Hilfe der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse zu bestimmen ist.

Für die Herkunftsbestimmung ist es nicht nur entscheidend, authentische pflanzliche Referenzmaterialien einer spezifischen Region zu verwenden, sondern entsprechende Hintergrundinformationen haben einen hohen Stellenwert. So ist der Erntezeitpunkt eine entscheidende Zusatzinformation. Zum einen können Weintrauben einer Region beispielsweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet werden und zum anderen sind gerade in mediterranen Ländern häufig mehrere Ernten verfügbar. Dies kann zu einer erheblichen Isotopenspannweite der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse der Referenzwerte einer Region führen [Roßmann 1996]; werden diese Zusatzinformationen nicht ausreichend berücksichtigt, sind Fehlinterpretationen leicht möglich.

3.2 Kohlenstoffisotope ^{13}C und ^{12}C in der Biosphäre

Der Kohlenstoff der Biomasse ist im wesentlichen ein Produkt der Photosynthese der Pflanzen und damit ein Resultat des atmosphärischen Kohlendioxids. Das Kohlendioxid zeigt gegenüber dem internationalen Referenzstandard eine Abreicherung von -8 ‰ [Keeling 1995]. Dieser Wert ist nicht konstant, sondern wurde aufgrund des abgereicherteren Prozesskohlendioxids der Industrialisierung in den letzten 200 Jahren von $-6,5\text{ ‰}$ [Leuenberger 1992] stetig abgereichert.

Die Isotopenverhältnisse des atmosphärischen Kohlendioxids werden in der Pflanze nicht wiedergefunden, sondern die gebildete Biomasse zeigt in ihren $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnissen deutliche Abreicherungen. Das Maß der Abreicherungen variiert im wesentlichen durch die Art des Photosynthesystems. So zeigen C₃-Pflanzen mit dem Calvin-Zyklus abgereicherte $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse von -22 bis -32 ‰ mit einem Mittel von -27 ‰ und C₄-Pflanzen mit dem Hatch-Slack-Zyklus weniger abgereicherte $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenwerte von -9 ‰ bis -15 ‰ mit einem Mittel von -13 ‰ [O'Leary 1988].

Die CAM-Pflanzen können beide Photosynthesewege verwenden, so dass ihre $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse zwischen den C₄- und C₃-Pflanzen liegen bzw. die Vereinigungsmenge bilden. Beiden Photosynthesewegen gemeinsam ist die diffusionsabhängige Fraktionierung des Kohlendioxids durch die Stomata in den Interzellularen, die mit dem Grahamschen Diffusionsgesetz (mit den reduzierten Massen) zu berechnen sind und einen theoretischen Wert von $-4,4\text{ ‰}$ ergeben [Farquhar 1982].

3.2.1 Fraktionierung der C3-Pflanzen

Die diffusionsabhängige Fraktionierung reicht jedoch nicht aus, um die abgereicherten Isotopenverhältnisse der C3-Pflanzen zu erklären. Diese Abreicherung ist das Resultat einer reaktionskinetischen Fraktionierung des CO₂-Akzeptor-Enzyms RUBISCO, welches zu einer Abreicherung von 29 ‰ führt [Roeske 1984, Guy 1993].

Die Varianz der Isotopenverhältnisse der C3-Pflanzen ergeben sich nun durch das begrenzt variable Konzentrationsgefälle zwischen der CO₂-Konzentration der Außenluft und den Interzellularen.

Die Isotopenfraktionierung lässt sich damit wie folgt beschreiben [Farquhar 1982]:

$$(3-7) \quad \delta_{Pflanze} = \delta_{Atmosp.} - a - (b - a) \left[\frac{c_i}{c_a} \right]$$

mit	$\delta_{Atmosp.}$	= -8 ‰
	a	= Diffusionsfraktionierung: 4,4 ‰
	b	= Enzymfraktionierung (RUBISCO) = 29 ‰
	c_i/c_a	= CO ₂ in der Atmosphäre / CO ₂ in den Interzellularen

Zwei Extremfälle sind abzuleiten, in dem zum einen CO₂ nicht limitierend ist: $c_i/c_a \approx 1$ und damit die Fraktionierung enzymabhängig ist ($\delta_{Pflanze} = -37,0‰$) und zum anderen CO₂ limitiert ist: $c_i/c_a \approx 0$ und damit die Fraktionierung (CO₂ wird dabei vollständig vom RUBISCO-Enzym umgesetzt) diffusionsabhängig ist ($\delta_{Pflanze} = -12,4‰$).

In der Natur liegt die Abreicherung zwischen den beiden genannten Fällen. Davon abweichende Extrembedingungen können künstlich in Gewächshäusern erreicht werden. Zur Ertragssteigerung wird gelegentlich die CO₂-Konzentration in der Gewächshausatmosphäre künstlich erhöht (Luft: 0,04 Volumen-% Kohlendioxid). Damit verschiebt sich der Quotient von c_i/c_a im Vergleich zu den natürlichen Bedingungen in Richtung von eins. Als Kohlendioxidlieferant macht man sich im einfachsten Fall die Methangasverbrennung der vorhandenen Gasheizung zu nutze. Aus der Verbrennung entstehendes Kohlendioxid ist in den ¹³C/¹²C Isotopenverhältnissen stark abgereichert: ca. -50 ‰ [Schoell 1980]. Als Resultat beider Faktoren können in den ¹³C/¹²C Isotopenverhältnissen der Pflanzen deshalb Isotopenverhältnisse entstehen, die gegen -37 ‰ streben [Schnieders 2001].

In der Natur wird c_i/c_a durch klimatische Bedingungen direkt beeinflusst. Die Grundlage ist das Gas-Wasser-Problem der Pflanzen: Werden die Stomata weit geöffnet, um die CO₂-Aufnahme für die Photosynthese möglichst wenig zu behindern, nimmt zwangsläufig die Transpiration und damit die Gefahr des Austrocknens der Pflanze zu. Schließt die Pflanze jedoch die Stomata, um dieser Gefahr zu begegnen, so wird auch die CO₂-Aufnahme blockiert. Die Folge ist, dass das vorhandene CO₂ in den Interzellularen nahezu vollständig umgesetzt wird, c_i/c_a strebt damit gegen Null und die ¹³C/¹²C Isotopenverhältnisse der Photosyntheseprodukte werden angereicherter.

Deshalb zeigen Pflanzen einer Art in ariden Gebieten angereichertere ¹³C/¹²C Isotopenverhältnisse in der Biomasse als in gemäßigten Gebieten [Körner 1991, Clay 2001].

3.2.2 Fraktionierung der C4-Pflanzen

Im Hatch-Slack Zyklus dient als CO₂-Akzeptor im Cytoplasma der Mesophyllzellen nicht das RUBISCO-Enzym, sondern die PEP-Carboxylase, die eine um den Faktor 7 höhere Affinität zum Kohlendioxid aufweist [Lüttge 1994]. Gebildet wird dabei die C4-Verbindung Malat, die in den Bündelscheiden decarboxyliert wird und das freigesetzte CO₂ im Calvin-Zyklus durch die RUBISCO wiederum fixiert und umgesetzt wird. Die PEP-Carboxylase weist in der Summe eine geringere Fraktionierung [-3,1‰] als die RUBISCO auf, denn sie nutzt im Unterschied zur RUBISCO das im Wasser gelöste Bikarbonat, welches um 9 ‰ angereicherter ist [Whelan 1973]. Deshalb ist in der Summe die Isotopenfraktionierung der PEP-Carboxylase mit +5,9 ‰ eine Anreicherung. Außerdem kommt es in den Bündelscheiden zu einem nahezu vollständigen Kohlendioxidumsatz, so dass die Isotopenfraktionierung der RUBISCO gegen Null strebt. Dennoch ist zu beachten, dass durch die Fixierung des CO₂ als Malat die CO₂-Konzentration in den Bündelscheiden um das 15 bis 20 fache höher ist als in der Außenluft, so dass Verluste kaum auszuschließen sind.

Formal lässt sich die Isotopenfraktionierung der C3-Pflanzen erweitern und wie folgt beschreiben [Farquhar 1983]:

$$(3-8) \quad \delta_{Pflanze} = \delta_{Atmosp.} - a - (b_3 + b_2 - a) \left[\frac{c_i}{c_a} \right]$$

mit

- a = Diffusionsfraktionierung: 4,4 ‰
- b_3 = PEP-Carboxylase-Fraktionierung
- b_2 = $b * \Phi$ (RUBISCO-Fraktionierung korrigiert mit Faktor aus CO₂ Verlusten)
- Φ = 0,2 bis 0,3 Faktor des CO₂-Verlustes.

Die Summe ($b_3 + b_2 - a$) ist um den Faktor 5 kleiner als die C3-Summe, so dass C4-Pflanzen eine geringere Spannweite an Isotopenwerten aufweisen.

3.3 Stickstoffisotope ^{15}N und ^{14}N in der Biosphäre

Der Stickstoffpool im Rind ist letztlich ein Produkt der Pflanzenbiomasse und damit abhängig von den Verhältnissen zweier Stickstoffpools, denen des Bodens und der Atmosphäre. Der Stickstoff wird in der Regel als Nitrat, seltener als NH_4^+ von der Pflanze aufgenommen und schon in der Wurzel bzw. in den Blättern durch die Nitrat-Reduktion dem Glutamatsyntheseyklus nutzbar gemacht.

Die Aufnahme des Nitrats zeigt keine Isotopenfraktionierungen [Yoneyama 1989], so dass verallgemeinert davon ausgegangen werden kann, dass die Isotopenverhältnisse der Pflanze die Isotopenverhältnisse des Bodennitrats widerspiegeln [Yoneyama 1990; Turner 1987]. Es ist jedoch zu beachten, dass nur eine Teilreduktion in der Wurzelregion stattfindet, die weitere Reduktion erfolgt in den Blättern. Diese lokale partielle Reduktion führt zu leichten Isotopenfraktionierungen, so dass die Wurzel im Vergleich zu den Blättern eher abgereichert ist [Yoneyama 1989]. Da der Stickstoffpool des Bodens nicht nur aus Nitrat besteht, kann das Isotopenverhältnis des Gesamtstickstoffs im Boden eklatant abweichen.

Weiterhin kann der Boden durch De- und Nitrifikations-, Abbau-, und Auswaschprozesse erheblichen Veränderungen unterworfen sein (Abbildung 3-3), so dass zeitliche Veränderungen im Isotopengehalt des Nitratpools [Marriot 1997] induziert werden, die sich damit auch zeitlich auf die Stickstoffisotopenverhältnisse der Pflanze auswirken [Handley 1992]. So bewirkt die Denitrifikation Abreicherungen im gebildeten N_2 von über – 30 % mit entsprechender Anreicherung des Ausgangsstoffs Nitrat [Mariotti 1981].

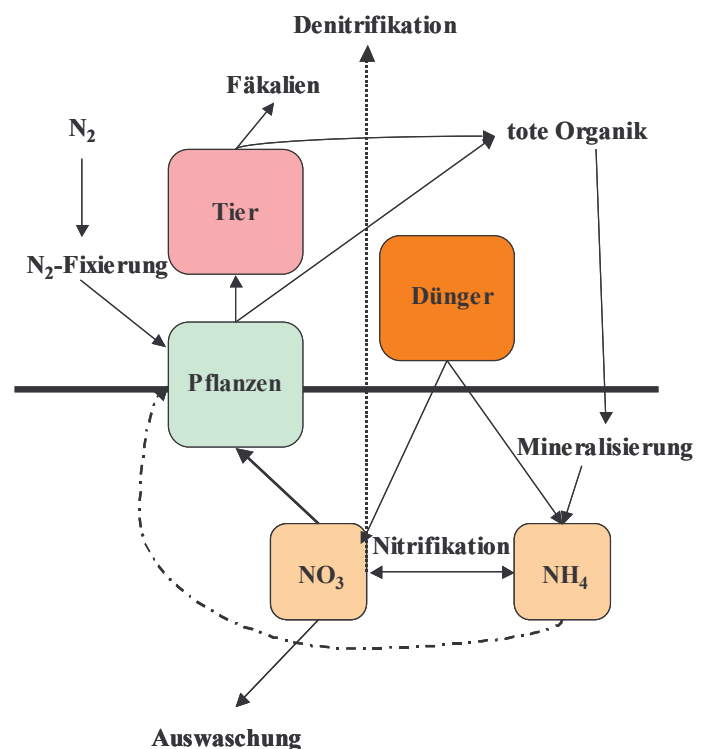


Abbildung 3-2: Vereinfachter Kreislauf des Stickstoffs.

Umgekehrt führt die Nitrifikation zu einer Anreicherung im noch nicht umgesetzten Ammonium und zu einer Abreicherung im gebildeten Produkt Nitrat [Karamanos 1981]. Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass der vorhandene Nitrat-Stickstoffpool immer kompensierend auf Isotopenveränderungen einwirkt.

Dennoch zeigt der Einsatz von Kunstdünger direkte Auswirkungen, die sich in der Regel in einer Abreicherung der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse in der Biomasse der Pflanze [Doughton 1991] widerspiegelt. Da biologischer Dünger, d.h. Ausscheidungsprodukte von Tieren, im Vergleich zu Kunstdünger eher angereicherte Isotopenverhältnisse aufweisen, [Shearer 1974] (Abbildung 3-4) führt dies auch in der Pflanze zu angereicherten Isotopenverhältnissen [Yoneyama 1990].

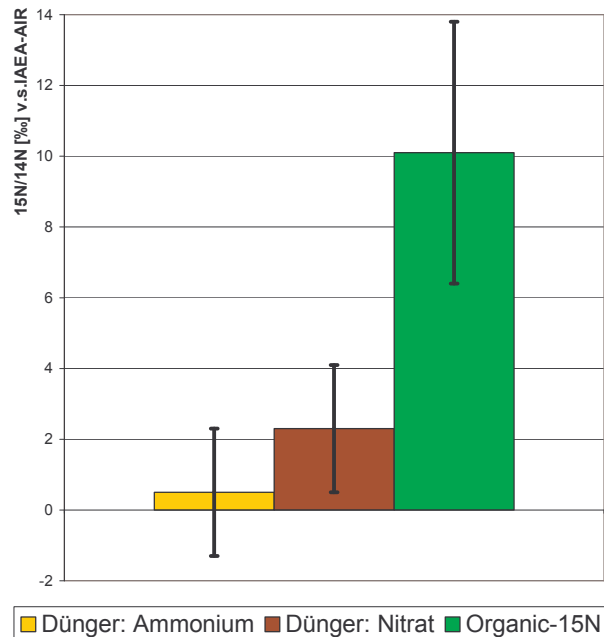


Abbildung 3-3: $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Vergleich der Mittelwerte von synthetischem und organischem Dünger mit ihren jeweiligen Standardabweichungen.

Es liegt vordergründig nahe, diese Besonderheit als Bewertungskriterium für die ökologische Landwirtschaft einzusetzen, da hier ausschließlich kein synthetischer Dünger, sondern nur organischer Dünger eingesetzt wird. Pflanzen aus der ökologischen Landwirtschaft sollten damit diese angereicherten $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse widerspiegeln.

Zu beachten ist jedoch, dass auch stickstofffixierende Pflanzen (z. B. Klee) als Bodenverbesserer in der ökologischen Landwirtschaft eingesetzt werden. Dieser enorme atmosphärische Stickstoffpool wird nur von wenigen Pflanzen genutzt. Die stickstofffixierenden Pflanzen haben die Möglichkeit, den atmosphärischen Stickstoff zu binden und diesen für die Biosynthese nutzbar zu machen.

Die besondere N_2 -Fixierung des Atmosphärenstickstoffs ist das Ergebnis der Symbiose eines N_2 -fixierenden Prokaryonten mit einer Pflanze, wie z. B. aus der Familie der Leguminosen, die in der Landwirtschaft eine große Bedeutung hat. Diese Symbiose liefert in der Pflanze $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse, die nur leicht von Null, d.h. vom Isotopenverhältnis des Atmosphärenstickstoffs, verschieden sind [Steele 1983, Kohl 1980] und damit im Boden ähnliche $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse generieren können wie Mineraldünger.

3.4 Schwefelisotope ^{34}S und ^{32}S in der Biosphäre

Schwefel weist in der Natur 4 stabile Isotope auf: ^{32}S (95%), ^{33}S (0,75%), ^{34}S (4,21%) und ^{36}S (0,002%). Analytisch von Bedeutung ist derzeit nur das $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnis. Tiere und Pflanzen binden die Hauptmenge des Schwefels in den Aminosäuren Cystein (Cystin) und Methionin. Als autotrophe Organismen nutzen Pflanzen im Gegensatz zu den heterotrophen Organismen (Tiere) den verfügbaren Sulfatpool des Bodens. Ähnlich wie bei der Stickstoffassimilierung ist keine bzw. nur eine geringe (< 1 ‰) Fraktionierung des biogen gebundenen Schwefels gegen den des bioverfügbaren Sulfats feststellbar [Chukhrov 1980]. Andererseits werden gerade die autotrophen Organismen für eine große Isotopenvarianz des Schwefels im Boden von – 30 bis + 30‰ mit verantwortlich gemacht [Thode 1991]. Die Fraktionierung der Schwefel-Isotope beruht auf dem dissimilatorischen Prozess anaerober Bakterien z. B. *Desulphovibrio* und *Desulphotomaculum*. Nach dem Rees-Modell [Rees 1973] sind bei der Reduktion von Sulfat im dissimilatorischen Prozess vier wesentliche Ablaufschritte zu berücksichtigen:



Die wesentlichen Fraktionierungsschritte liegen in den Reduktionsschritten von Sulfat zum Sulfit: - 10 bis – 25 ‰ [Rees 1973, Chambers 1978] und Sulfit zu Sulfid: -25 ‰ [Thode 1991].

Eine ähnliche Reduktion des Sulfats vollzieht auch die Pflanze [Trust 1992]. Der wesentliche Unterschied besteht jedoch darin, dass die Aufnahme bzw. Aktivierung des Sulfats geschwindigkeitsbestimmend sein muss, so dass der vollständige Umsatz im Reduktionsprozess gewährleistet ist. Pflanzen weisen deshalb ähnliche Isotopenvarianzen im Schwefel auf wie das umgebende verfügbare Bodensulfat.

Der Schwefelpool des Bodens und die isotope Zusammensetzung von Pflanzen können durch Ablagerung bzw. Auswaschung von Schwefelverbindungen aus der Atmosphäre stark beeinflusst werden. So zeigen industrielle Verbrennungsgase angereicherte Schwefelisotopenverhältnisse von bis zu + 30 ‰. Der „Fallout“ kann anhand der Isotopenveränderung der Pflanze und des Bodens verfolgt werden [Winner 1978, Nriagu 1991].

3.5 Isotopenverhältnisse in heterotrophen Organismen

Alle heterotrophen Organismen brauchen entweder Pflanzen (Herbivoren) oder andere Tiere (Carnivoren) als Nahrungsquelle. Die Isotopenverhältnisse im heterotrophen Organismus sind daher letztlich durch die Nahrung und das Trinkwasser vorgegeben. Dabei ist aber zu beachten, dass auch der heterotrophe Organismus Fraktionierungen aufweist. So zeigt die Biosynthese des Fettes eine reaktionskinetische Fraktionierung in der Bildung des Acetyl-CoA Komplexes mit einer Abreicherung des Fettes in den Isotopenverhältnissen des Kohlenstoffs [DeNiro 1977, Melzer 1987].

Die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse der Gesamtheit eines heterotrophen Körpers zeigen jedoch umgekehrt eine Anreicherung von ca. 1 ‰, die im wesentlichen durch die Atmungskette induziert wird [DeNiro 1978]. Im Gegensatz zum Stickstoff sind diese Isotopenvarianzen jedoch nur als sehr gering einzustufen. Die Stickstoffisotopenverhältnisse im Gewebe eines heterotrophen Organismus zeigen eine Anreicherung von ca. 3 ‰ gegenüber der genutzten Nahrung [DeNiro 1981].

Es existieren nur sehr wenige Arbeiten, die diesen Isotopeneffekt erklären. In Fütterungsversuchen mit Rindern [Steel 1978] konnte in der Untersuchung des Stickstoffs gezeigt werden, dass die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse des Urins gegenüber der Nahrung um 2 ‰ abgereicherter waren. Dagegen waren die Fäkalien gegenüber der Nahrung in den $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen um 2 ‰ angereicherter. Das Blut zeigte im Vergleich zur Nahrung eine noch höhere Anreicherung von 4 ‰. Der Harnstoff im Urin bzw. die Harnsäure scheint damit das Gegenstück zur Anreicherung im Gewebe zu sein. Diese Abreicherung des Harnstoffs kann auf Transaminierungseffekte zurückzuführen sein, da das ^{14}N -Amin schneller reagiert als das ^{15}N -Amin [Macko 1986]. Eine mögliche Erklärung für die ^{15}N -Isotopenverhältnisse in höheren Organismen existiert zur Zeit jedoch nur ansatzweise auf theoretischer Basis [Schoeller 1999].

Wie anzunehmen, ist die ^{15}N -Anreicherung im heterotrophen Organismus nicht geschlechts- und altersabhängig und bei gleicher Nahrung für alle Organismen gleich [DeNiro 1983, Minagawa 1984]. Außerdem wiederholt sich diese Anreicherung stetig in der Nahrungskette, so dass Endglieder der Nahrungskette Isotopenanreicherungen von bis zu 18 ‰ aufweisen können [Minagawa 1984].

Wie bereits erwähnt unterliegen die Isotopenverhältnisse des Schwefels nur in Bakterien Isotopenfraktionierungen. In der Nahrungskette ist derzeit keine signifikante Isotopenanreicherung des Schwefels bekannt, er spiegelt somit die aufgenommene Nahrung weitgehend wider [Krouse 1984, Krouse 1991]. Die Isotopenverhältnisse von Sauerstoff und Wasserstoff sind dagegen differenzierter zu betrachten. Zwar haben die Arbeiten von Longinelli gezeigt, dass die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse des im Blut vorhandenen Wassers vom verabreichten Trinkwasser definiert werden und eine direkte Korrelation mit der „*meteoric water line*“ [Longinelli 1980, Longinelli 1984] besteht, doch bei diesen Versuchen mit Ratten und Schweinen wurden immer Anreicherungen im $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnis gegenüber dem Trinkwasser festgestellt. Die Gründe hierfür sind vielfältig, da der Sauerstoffpool des Wassers im Körper durch viele Einflussgrößen variiert werden kann, welche sich nicht nur aus dem angereicherten Gewebewasser der Pflanzen ergeben. So weist der Sauerstoff der Atmosphäre einen Isotopenwert von + 23,5 ‰ auf [Kroopnick 1972].

Auch wenn durch die Lungenaufnahme eine Abreicherung von – 2 bis – 9 ‰ stattfindet [Epstein 1988], verbleibt eine Anreicherung des Atmosphären-Sauerstoffs von ca. + 17 ‰. In der Respiration wird als Endprodukt nicht nur Kohlendioxid, sondern auch Wasser aus diesem Sauerstoff gebildet, der damit die Isotopenverhältnisse des Körperwassers beeinflussen kann. Das gebildete Kohlendioxid steht außerdem in Equilibrierung mit der Wasserphase. Bedenkt man, dass dieses Kohlendioxid aus der Respiration hoch angereicherten Sauerstoff aus der Organik der Nahrung enthalten kann, ergibt sich eine weitere Einflussgröße auf den Wasserpool.

Weiterhin ist der Atemwasserdampf mit ca. 8 ‰ abgereichert gegenüber dem Isotopenwert des Körperwassers [Bottinga 1969]. Theoretische Arbeiten [Luz 1984, Ayliffe 1990, Bryant 1995] haben versucht, die Eingangs- und Ausgangsgrößen zu beschreiben, die die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse des Wasserpools beeinflussen. Diese Erkenntnisse werden in der Abbildung 3-5 vereinfacht dargestellt.

Wesentliche Ausgangsbasis der Isotopenverhältnisse im Wasserpool des Organismus ist somit das Trinkwasser (δT), welches die gleichen Isotopenverhältnisse wie die gemittelten Isotopenverhältnisse des Niederschlages (δN) (Grundwasser) aufweist.

Das Gewebewasser (δP) der Pflanzen ist gegenüber dem Grundwasser aufgrund der Transpirations- und Niederschlagseffekte stets angereichert. Die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse der Organik (δOrg) zeigt gegenüber dem Grundwasser eine erhebliche Anreicherung von ca. 27 ‰ [Schmidt 2001]. Eine ähnlich hohe Anreicherung von ca. + 23,5 ‰ weist ebenfalls der

für die Atmung schon erwähnte notwendige atmosphärische Sauerstoff (δO) auf. Diese Einflussgrößen bestimmen die $^{18}O/^{16}O$ Isotopenverhältnisse des Wasserpools des Organismus (δWO).

Als Ausflussgrößen des Wasserpools liegen die Ausscheidungsflüssigkeiten (δAS) des Urins und der Fäkalien vor. Die $^{18}O/^{16}O$ Isotopenverhältnisse dieser Ausscheidungsflüssigkeiten sind identisch mit dem Wasserpool des Organismus. Dagegen ist der Wasserdampf (δAT) gegenüber den $^{18}O/^{16}O$ Isotopenverhältnissen des Wasserpools des Organismus stark abgereichert: Atemdampf: - 8 ‰ und Transpiration: - 24 ‰. Das Respirationsgas Kohlendioxid (δKO) zeigt gegenüber dem Wasserpool in den $^{18}O/^{16}O$ Isotopenverhältnissen die größte Anreicherung von bis zu + 38 ‰.

Die Isotopenverhältnisse des Wasserstoffs werden ähnlich beeinflusst, jedoch entfällt der atmosphärische Sauerstoff als Eingangs-, und Kohlendioxid als Ausgangsgröße.

In der Gewichtung der Einflussgrößen des Wasserpools bestimmt im wesentlichen das aufgenommene Wasser (Trink- und Nahrungswasser) die Sauerstoffanteile im Wasserpool des Tieres. Insbesondere in schweren Tieren (> 400 kg) wird der Sauerstoffanteil zu annähernd 80 % von diesem Wasser vorgegeben [Bryant 1995]. Entsprechend sollten auch die Sauerstoff- und mehr noch die Wasserstoffisotopenverhältnisse durch diese wesentlich vorgegeben sein.

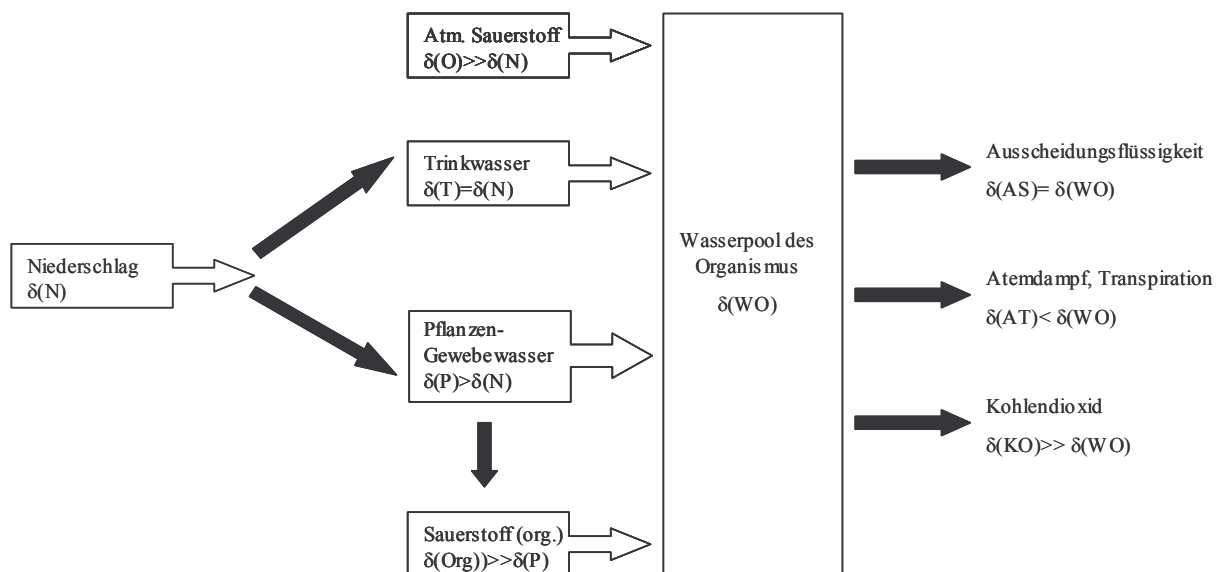


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der Einflussgrößen auf die $^{18}O/^{16}O$ Isotopenverhältnisse des Wasserpools eines höheren Organismus.

3.6 Anwendungen auf die Nahrungskette

Besonders die Anreicherung der schweren Isotope des Stickstoffs in der Nahrungskette wurde umfangreich genutzt, die Nahrungskette zu verstehen und aufzudecken. [Peterson 1999, Peterson 1987, Wada 1991].

Unter archäologischen Aspekten konnten durch Collagen- und Zahnanalysen mit Hilfe der stabilen Isotope C, N, O Nahrungsfragen von archäologischen Funden von Mensch und Tier geklärt werden [Schwarcz 1991]. Meist wurde in diese Betrachtungen lediglich ein Isotopenpaar einbezogen. Erst in den letzten Jahren werden vermehrt mehrere stabile Isotope der Bioelemente genutzt [Fernandez 1999, Kwak 1997].

Die stabilen Isotope der Bioelemente sind ebenfalls dazu geeignet, Tierwanderungen nachzuweisen, Ernährungs- bzw. Nahrungsbesonderheiten von Tieren aufzudecken und Tierpopulationen zu unterscheiden [Hobson 1999].

Im Bereich der geographischen Herkunftsbestimmung von tierischen Lebensmitteln sind derzeit nur wenige Arbeiten vorhanden. So wurde gezeigt, dass mit Hilfe der stabilen Isotope die Milch regional zu differenzieren ist [Kornel 1997, Rossmann 2000]. Auch die geographische Differenzierung von Käse wurde mit Hilfe der stabilen Isotope des Kohlenstoffs und Stickstoffs untersucht [Manca 2001].

Die Herkunftsbestimmung von Fleisch ist derzeit nur ansatzweise in die Betrachtung gelangt. Mit Hilfe der Isotopenverhältnisse des Kohlenstoffs und Stickstoffs wurde die regionale Zuordnung von Lammfleisch getestet [Piasentier 2003] oder Qualitäts- und Fütterungsunterschiede von iberischem Schweinefleisch ermittelt [Gonzales-Martin 1999]. Auch Rindfleisch wurde in die Untersuchungen einbezogen. Mit Hilfe der ¹⁸O Isotopenverhältnisse im Fleischwasser wurde eine regionale Zuordnung durchgeführt [Hegerding 2002].

Allen Fleischuntersuchungen war gemein, dass sie nur ein Isotop der Bioelemente nutzten und nur eine zeitlich eng begrenzte Studie durchgeführt worden ist.

4 Material und Methoden

4.1 Probenlieferanten

Eine ortsbezogene Herkunftsaussage mit Hilfe der Isotope $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ lässt sich nur dann treffen, wenn auch das Futter aus dem selben geographischen Bereich stammt, wie das Rind. Auch sollte möglichst das Fleisch standort„treuer“ Tiere untersucht werden, damit ein möglicher Einfluss des Transportes (Nord-Süd) ausgeschlossen werden konnte. Deshalb wurde die Zusammenarbeit mit Betrieben der ökologischen Landwirtschaft (Demeter) vereinbart, die die Erzeugerrichtlinien von Demeter erfüllen. Unter anderem müssen die Rinder, wenn sie zugekauft werden, mindestens 12 Monate auf dem Biohof verweilen, bevor sie geschlachtet und als Fleisch in den Verkehr gebracht werden. In der ökologischen Viehhaltung ist zwar weiterhin der Zukauf von ökologischem Futter erlaubt, darf aber lediglich 10 % betragen. Die überwiegende Menge muss damit hofeigenes Futter sein.

Problematisch für diese Untersuchung war jedoch, dass ökologische Landbaubetriebe keine große Anzahl an Rinderschlachtungen aufweisen, da es sich durchweg um kleinere landwirtschaftliche Betriebe handelt, die die Anzahl ihrer Rinder an die zur Verfügung stehenden Hof-Futterressourcen angepasst haben. Damit ein repräsentativer zeitlicher isotoper Überblick gewährleistet ist, sollten jedoch nahezu monatlich Proben zur Verfügung stehen. Dies engte den Kreis der Biobetriebe im Kreis Köln stark ein.

Letztlich verblieben drei landwirtschaftliche Biobetriebe, die regelmäßig Proben zur Verfügung stellen konnten. Die beprobten Höfe liegen in einem Bereich von 50 km Entfernung bei den Städten Rheinbach, Düren und Aachen (Abbildung 4-1) und erfüllen die Demeter-Statuten.

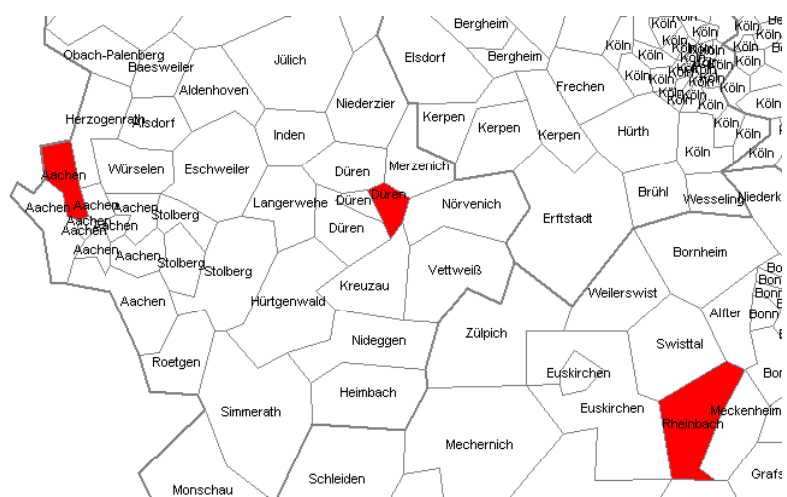


Abbildung 4-1: Probenlieferanten aus dem Großraum Köln: Aachen, Düren und Rheinbach. Dargestellt werden die Postleitzahlgebiete.

Für die überregionale Fragestellung standen Biofleischproben aus Norddeutschland, vom Schlachthaus Ulzburg, und aus Süddeutschland, von der Chiemgauer Naturfleisch GmbH zur Verfügung. Beides sind Betriebe, die Fleisch von regionalen Biobauern verarbeiten und vertreiben. Im Zuge der Arbeit ergaben sich damit Proben aus unterschiedlichen regionalen Bereichen von Süd- und Norddeutschland (Abbildung 4-2).

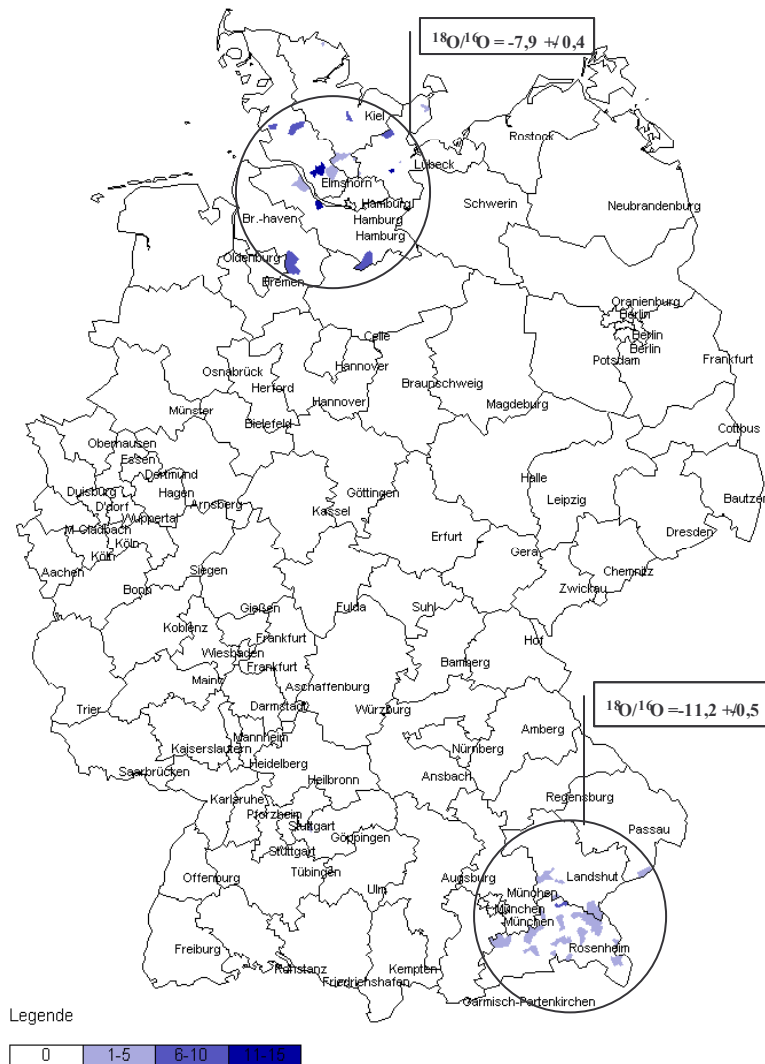


Abbildung 4-2: Geographische Herkunft der Probenlieferanten aus Nord- und Süddeutschland. Die Legende gibt die Anzahl der Proben aus den beprobten Regionen an, die im Laufe der Untersuchung zur Verfügung standen.

Es standen dabei 103 Proben aus dem Großraum Hamburg und 65 Proben aus dem Großraum München-Rosenheim zur Verfügung.

Aus den verschiedenen Regionen der Großräume konnte eine unterschiedliche Anzahl von Proben untersucht werden. Dies ist farblich durch die Farbabstufung in der Abbildung 4-2 festgehalten (siehe Legende 4-2).

Die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse liegen in den Regionen von Norddeutschland im Mittel bei $-7,9\text{ ‰}$ mit einer Standardabweichung von $0,4\text{ ‰}$. Die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse der süddeutschen Regionen weisen abgereicherte Isotopenwerte auf, die im Mittel bei $-11,2\text{ ‰}$ mit einer Standardabweichung von $0,5\text{ ‰}$ liegen.

Die Grundwasserwerte basieren auf der Vermessung von Grundwasser aus Westdeutschland von Förstel [Förstel 1982]. Daraus ergibt sich, dass sich die Grundwasser aus Süd- und Norddeutschland in den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen im Mittel um ca. 3 ‰ und korrespondierend zur „*meteoric water line*“ 24 ‰ in den D/H Isotopenverhältnissen unterscheiden.

Hinsichtlich des Alters, Geschlechts oder der Rasse des Tieres bzw. des untersuchten Fleisches wurden keine Restriktionen gemacht, lediglich die Partie des Fleisches wurde auf Kamm und Beinscheibe beschränkt.

Der Untersuchungsansatz wurde bewusst praxisnah angelegt, d.h. es wurde kein Fleisch direkt aus der Schlachtung untersucht, sondern Fleisch, dass den üblichen Abhäng- und Zerlegungsprozess durchlaufen hat.

Am Ende der Arbeit wurde Rindfleisch aus Chile, Österreich, sowie in einer Zusammenarbeit mit dem Chemischen Untersuchungsamt Hagen und dem Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Krefeld argentinisches Rindfleisch untersucht.

4.2 Problem der Probenmatrix

Unter Fleisch versteht man im weitesten Sinne alle für die menschliche Ernährung nutzbaren Teile von Tieren. Im allgemeinen Sprachgebrauch und im Sprachgebrauch dieser Arbeit versteht man unter Fleisch lediglich das aus quergestreiften Muskelfasern bestehende Skelettmuskelgewebe mit dem eingebetteten Fett- und Bindegewebe. Das Skelettmuskelgewebe besteht im wesentlichen aus den beiden Proteinen Myosin und Actin, die die charakteristischen fibrillären oder filamentösen Strukturen des Muskelfleisches ausbilden.

Hinsichtlich seiner mittleren chemischen Zusammensetzung besteht Fleisch damit aus ca. 75% Wasser, 22 % Rohprotein und 1-2 % Fett [Belitz 1992]. Die chemische Zusammensetzung der Bioelemente im Fleisch ist relativ konstant. So enthält Rohprotein 16 % Stickstoff, das in der Fleischanalytik als Kennzahl ausgenutzt wird, um den Rohproteingehalt zu ermitteln.

Die Isotopenverhältnisse der Bioelemente sind dagegen nicht als konstant anzusehen. Sie werden sowohl im Körper als auch im Fleisch durch die Nahrungsquelle bestimmt. So muss sich zwangsläufig ein höherer heterotropher Organismus den Isotopenverhältnissen seiner Nahrungsgrundlage anpassen [Ponsard 1999].

Fütterungsversuche an Rindern zeigten, dass sich die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse im Haar nach 120 Tagen dem Isotopenverhältnis einer neuen C4 Nahrung angepasst hatten, und die vorherigen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse der C3 Nahrung aufgehoben wurden [Jones 1981, Metges 1990]. Diese Turnover-Zeit ist jedoch nicht für alle Organe und Gewebe konstant, sondern unterscheidet sich erheblich. So zeigten Versuche mit Kleintieren (Wüstenmaus), die angelehnt an den oben genannten Fütterungsversuch, von einer C3 auf eine C4 Nahrung umgestellt wurden, dass die Leber eine Halbwertszeit von lediglich 6,4 Tagen aufwies und die Halbwertszeit im Muskelgewebe auf 27,6 Tage verlängert war [Tieszen 1983].

Durch verschiedene Turnover-Zeiten einzelner Organe und Gewebe ergeben sich damit unterschiedliche zeitliche Isotopenzusammensetzungen. Da biochemische Prozesse im Körper fraktionierend ablaufen können, ergeben sich weitere Verschiebungen. Am Beispiel von Stickstoff kann dies verdeutlicht werden. 10 Aminosäuren sind essentiell, sie müssen

zwangsläufig aus der Nahrung stammen, jedoch können 10 weitere durch eigene Transaminasen gebildet werden unter gleichzeitiger Isotopenfraktionierung des Stickstoffs. 9 Aminosäuren enthalten Aminverbindungen, die nicht am Carboxyl-Kohlenstoff fixiert sind und weniger am Stickstoffwechsel teilnehmen. Deshalb können die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse der verschiedenen Aminosäuren eine erhebliche Isotopenvarianz von bis zu 25 ‰ [Metges 1997, Macko 1987] aufweisen. Die Untersuchungen der Isotopenverhältnisse von kompletten Gewebestrukturen kompensieren natürlich diese $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenvarianz. Summarisch ergaben sich jedoch in einer $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Untersuchung verschiedener Gewebe [Sutoh 1987] eines Rindes Isotopenunterschiede von über 3 ‰ (Abbildung 4-3).

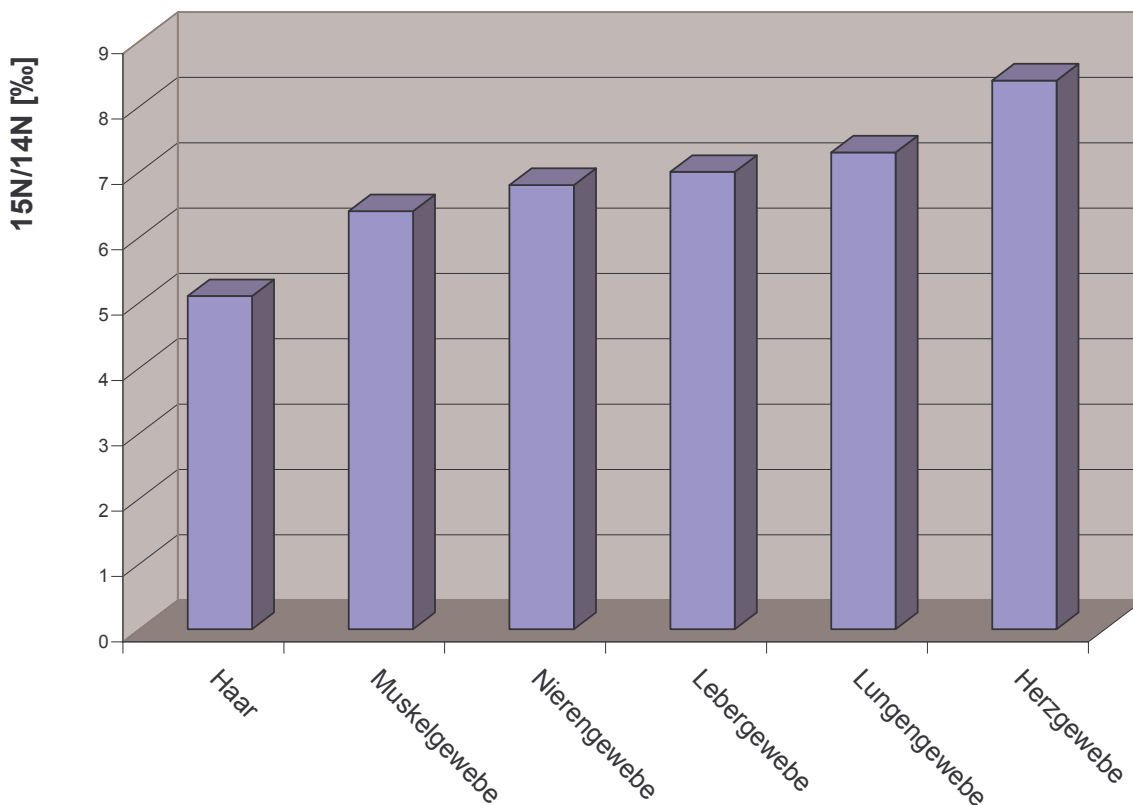


Abbildung 4-3: $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse im Gewebe des Rindes.

DeNiro [DeNiro 1978, 1981] hat in seinen Arbeiten aufgrund dieser Aspekte auf die Komplettermessung des gesamten Körpers verwiesen, um einen repräsentativen Gesamtisotopenwert zu bekommen. Dies ist für Rindfleisch natürlich nicht möglich und auch im Hinblick auf die Praxis nicht sinnvoll.

4.3 Probenaufarbeitung des Rindfleischs

4.3.1 Übersicht

Die Problematik eines repräsentativen Isotopenwertes wurde durch eine Differenzierung der Fleischproben in die drei wesentlichen Hauptbestandteile Wasser, Rohprotein und Fett berücksichtigt. Diese wurden auf die unterschiedlichen Isotopenverhältnisse der Bioelemente untersucht. Die Abbildung 4-4 gibt eine Übersicht über die Aufarbeitungsschritte und die aus den Fraktionen ermittelten Isotope wieder. Es wurden immer Doppelaufarbeitungen durchgeführt.

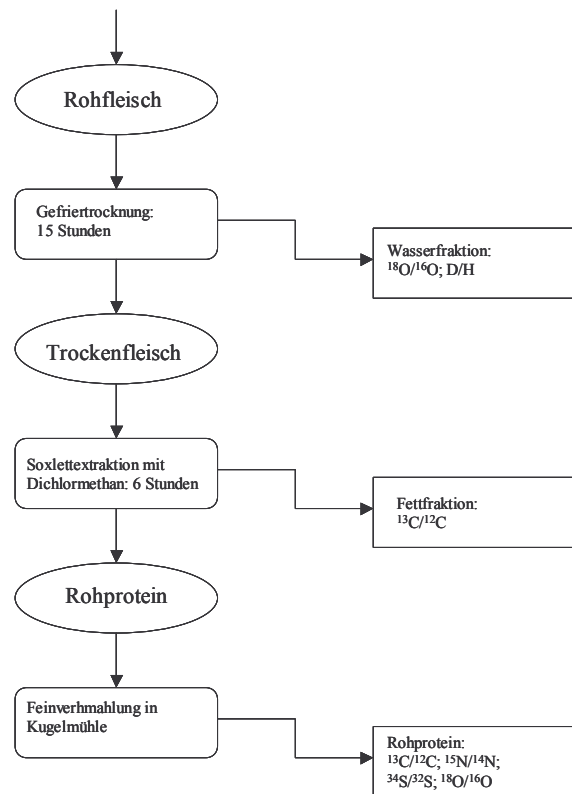


Abbildung 4-4: Aufarbeitungsschema des Rindfleischs.

4.3.2 Abtrennung der Wasserfraktion

Zur schonenden Abtrennung der Wasserfraktion wurden 10 bis 15 g zerkleinertes Muskelfleisch mit Hilfe einer Gefriertrocknung in Wasser und Trockensubstanz getrennt.

Zur Gefriertrocknung wurde eine modifizierte Ritenberg-Apparatur [Cohen 1984] entwickelt (Abbildung 4-5). Die Vorteile dieser modifizierten Apparatur (zum Patent angemeldet) liegen in der Verwendung von Kugelschliffen und Teflonventilen. Sie ermöglichen den Verzicht von Schliff fett und garantieren eine höhere Dichtigkeit.

Zur Abtrennung des Wassers wird das Fleisch mit flüssigem Stickstoff im kurzen Kolben eingefroren, ein Vakuum von ca. 1 mbar angelegt und die Wasserfalle (langer Kolben) in



Abbildung 4-5: Darstellung der Gefriertrocknungseinheit.

das mit flüssigem Stickstoff gefüllte Dewargefäß eingeführt. Die unvollständige Abtrennung des Wassers ist eine Hauptfehlerquelle für die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Untersuchung, da destillative Fraktionierungseffekte zu beobachten sind.

Zur Ermittlung der optimalen Gefriertrocknungszeit wurde eine Zeitreihe mit konstanten Fleischeinwaagen der gleichen Probe untersucht. Gemäß einer Rayleigh-Fraktionierung ist die destillative Wasserabtrennung eine Reaktion 1. Ordnung. Es liegt deshalb eine logarithmische Funktion vor.

Daraus ergab sich, dass eine Gefriertrocknungszeit von ca. 15 Stunden ausreichend für eine vollständige Abtrennung des Wassers ist (Abbildung 4-6). In der Routine wurden die Gefriertrocknungen vereinfacht über Nacht durchgeführt, so dass die optimale Gefriertrocknungszeit immer gewährleistet war. Sämtliche Rindfleischproben wurden doppelt aufgearbeitet und sowohl Einwaagen des Rindfleisches als auch die Auswaage der Trockenmasse und der Wasserphase protokolliert. Aus den Daten wurde eine Summenbilanz errechnet.

Die Aufarbeitung der Rindfleischprobe wurde wiederholt, wenn in der Summenbilanz eine Abweichung größer 3 % in der Wasser- oder Trockenphase festgestellt wurde.

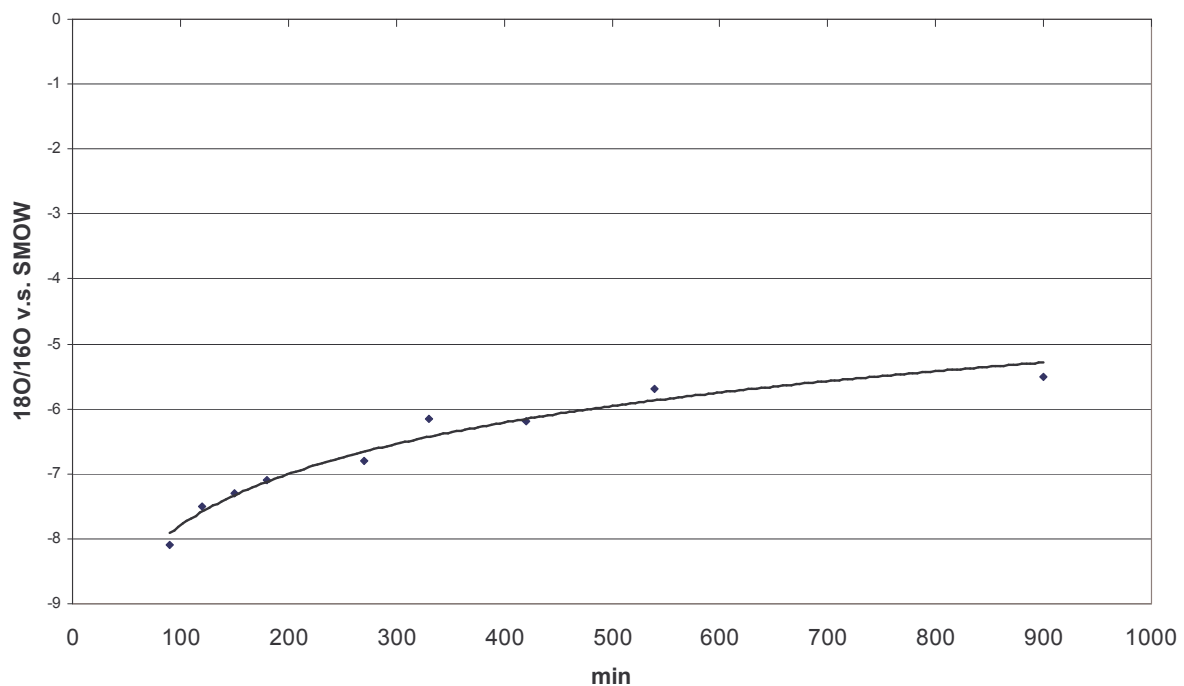


Abbildung 4-6: Zeitreihe der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse der Fleischprobe.

4.3.3 Abtrennung der Fettfraktion

Die Fette wurden mit Hilfe des Extraktionsmittels Dichlormethan in einer Soxhletapparatur 6 Stunden extrahiert. Der Vergleich gängiger Fettextraktionsmittel (Petrolether, Diethylether, Dichlormethan) ergab, dass unter Berücksichtigung der Isotopen Zusammensetzung alle äquivalent einzusetzen sind (Tabelle 4-1). Überprüft wurden die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ und $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse des Rohproteins vor und nach der Extraktion. Fraktionierungen durch das Extraktionsmittel waren nicht gegeben. Erkennbar ist jedoch die leichte Anreicherung der Rohproteinfraktion im $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Verhältnis, die zurückzuführen auf die fehlenden abgereicherten $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse der Lipidfraktion ist. Die fehlende Abtrennung kann zu Fehlinterpretationen [Focken 1998] führen, da die Lipidanteile häufig variieren können.

Als Extraktionsmittel hat sich Dichlormethan bewährt, weil es im Gegensatz zu Petrolether und Diethylether nicht brennbar ist und sowohl in der quantitativen Bilanz als auch in den Isotopenverhältnissen vergleichbare Werte erbringt (Tabelle 4-1).

		Dichlormethan	Petrolether	Diethylether
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ [‰]	Mit Lipiden	-25,9	-25,9	-25,8
	Ohne Lipiden	-25,3	-25,4	-25,4
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ [‰]	Mit Lipiden	4,6	4,6	4,5
	Ohne Lipiden	4,6	4,6	4,5

Tabelle 4-1: Isotopenverhältnisse im Rohprotein nach Extraktion

4.3.4 Aufarbeitung der Rohproteinfraktion

Das Rohprotein aus der Fettextraktion wurde im Trockenschrank 2 Stunden (80 °C) getrocknet und danach zur Homogenisierung mit einer Kugelmühle feinvermahlen.

Aus der Rohproteinfraktion wurden die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse ermittelt.

Eine weitere Aufarbeitung der Rohproteinfraktion zum Reinprotein [Kaltwasser 1980] erbrachte Werte, die in den Isotopenverhältnissen des Kohlenstoffs, Stickstoffs und Schwefels keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, so dass in der Routine auf diese weitere Aufarbeitung verzichtet wurde.

4.4 Eingesetzte Messtechnik

4.4.1 Bestimmung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse im Wasser

Zur Messung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse wurde ein SIRA II System (MICROMASS) in Kombination mit einer SHAKER BENCH eingesetzt (Abbildung 4-7).

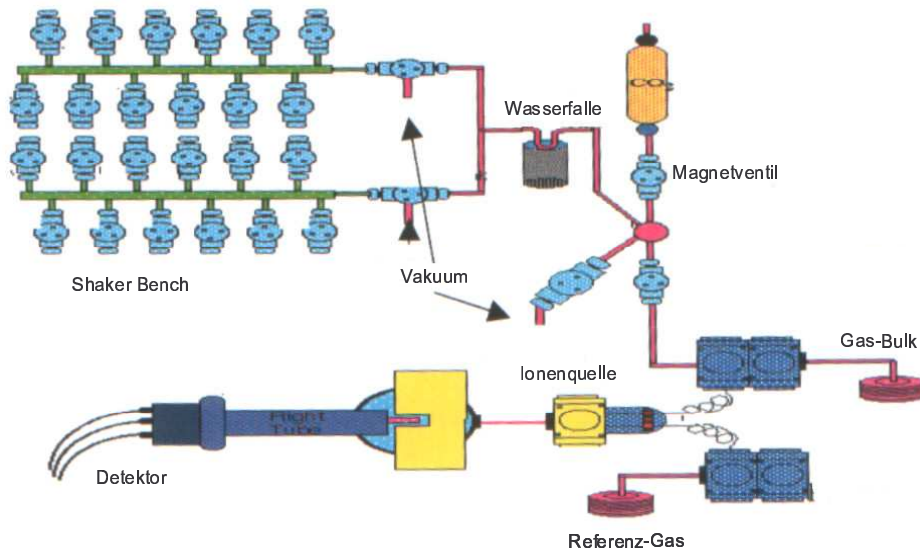


Abbildung 4-7: Vereinfachte Skizze eines DI-IRMS zur Bestimmung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotope im Wasser.

Die Funktionsweise der Messung basiert auf der Equilibrierungsreaktion von Kohlendioxid mit Wasser. Es gilt dabei die Austauschreaktion:



d.h., das Kohlendioxid wird entsprechend dem vorgelegten ^{18}O -Isotopenverhältnis des Wassers in seinem ^{18}O -Isotopenverhältnis modifiziert, indem sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Isotopenverhältnissen einstellt. Da dieses Gleichgewicht temperaturabhängig (2-16) ist, ist es zwingend notwendig, die Temperatur auf $\pm 1^\circ\text{C}$ konstant zu halten. Im verwendeten System wurde die Temperatur bei 25°C mit Hilfe einer Luftkühlung bzw. Heizung konditioniert.

Die entstandene Veränderung kann in einer Vergleichsmessung mit dem originären Referenzgas ermittelt werden. Eingesetzt wurde ein mit 48 Probengefäßen ausgestattetes Dual-Inlet-System. Diese Probengefäße werden in der Regel mit 1 bis 2 ml Wasser befüllt und über eine $250\ \mu\text{m}$ Stahlkapillare im SHAKER-BENCH-System evakuiert. Die Restriktion verhindert eine übermäßige Evakuierung, die sonst mit einer destillativen

Isotopenfraktionierung begleitet sein könnte. Die Gefäße werden mit Kohlendioxid, dessen $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse bekannt sind, befüllt und 3 – 4 Stunden equilibriert. Danach wird das Kohlendioxidgas dem Isotopenmassenspektrometer zugeführt und die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse vermessen. Anfallender Wasserdampf wird durch eine Kryofalle von ca. -90 °C ausgefroren.

4.4.2 Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ und $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse

Die Stabil-Isotopenmassenspektrometer können aufgrund des instrumentellen Aufbaus nur einfache Gase vermessen. Deshalb ist es notwendig, Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen vollständig in ihre einfachen Gase von Kohlendioxid und Stickstoff zu überführen.

Eingesetzt wurde hierfür eine Kombination aus Elementanalysator NA 1500 Carlo Erba mit dem Isotopenmassenspektrometer Optima, MICROMASS (Abbildung 4-8).

Dabei werden die in Zinnkartuschen eingewogenen Proben mit Hilfe eines Probengebers der Verbrennungseinheit zugeführt. Zwischenzeitlich wird mit einer Heliumspülung die Atmosphäre entfernt und das ca. 1000 °C heiße Verbrennungsrohr mit einem Sauerstoffpuls angereichert. Unter diesen Bedingungen vollzieht sich eine vollständige Oxidation der Proben. Als weiteres

Oxidationsmittel wird das Verbrennungsrohr mit Wolframoxid auf Aluminiumoxid und Kobalt (II/III)-oxid (versilbert) beschickt. Das Aluminiumoxid und die Versilberung des Kobalt(II/III)-oxids dienen im Wesentlichen zur Bindung anfallender reaktiver Halogene.

Neben Kohlendioxid entstehen Stickoxide, die im weiteren Reduktionsrohr mit Hilfe von Kupfer reduziert werden. Übermäßiger Sauerstoff wird gleichzeitig gebunden. Das entstandene Wasser aus der Verbrennung wird vor der gaschromatographischen Trennung des

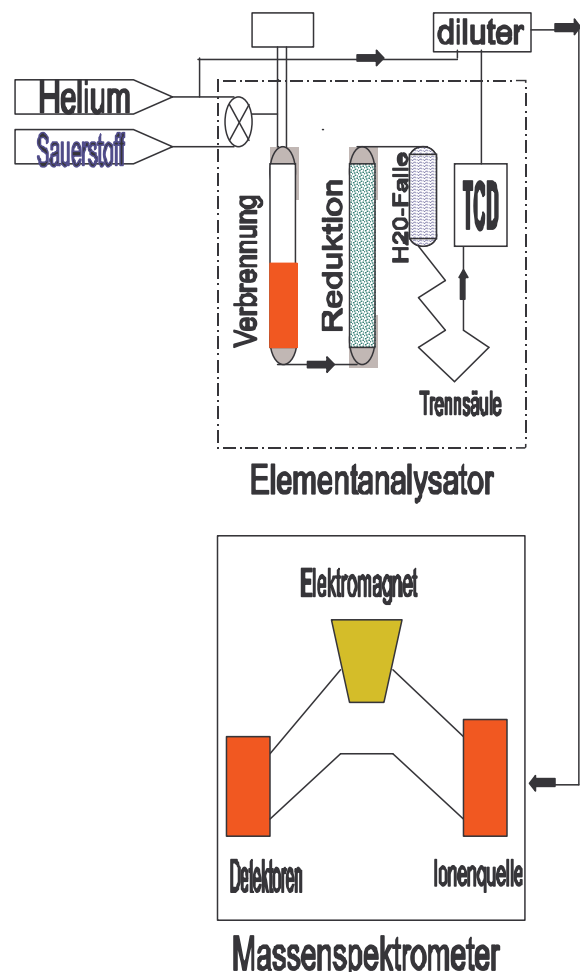


Abbildung 4-8: Schematische Darstellung einer EA-CF-IRMS-Kombination zur Isotopenbestimmung von N und C.

Messgases in der gepackten Säule (Porapak QS, 50/80, 3 m, 50° C) mit Hilfe von Magnesiumperchlorat weitgehend entfernt. Die gepackte Säule dient zur Auftrennung der Gase Stickstoff und Kohlendioxid. Diese Auftrennung ist notwendig, anderenfalls entsteht durch Ionisierung im Isotopenmassenspektrometer Kohlenmonoxid als Fragmentprodukt des Kohlendioxids. Kohlenmonoxid belegt zugleich mit Stickstoff die Masse 28 und verfälscht deshalb die Bestimmung der Isotopenverhältnisse des Stickstoffs.

Der Elementanalysator ist über ein „Open-Split“ mit dem Isotopenmassenspektrometer verbunden, so dass lediglich 0,1 % des Flussgases zur Messung in das Massenspektrometer gelangt. Dabei besteht das Problem, dass organischer Stickstoff, vom Harnstoff abgesehen, immer in wesentlich geringerem Anteil gegenüber Kohlenstoff vorliegt, mit der Konsequenz, dass je nach Einwaage entweder Kohlenstoff (oberhalb) oder Stickstoff (unterhalb) des Linearitätsbereichs des Isotopenmassenspektrometers liegen.

Dieses Problem kann durch das Diluter-System (MICROMASS) (Abbildung 4-9) einfach gelöst werden, indem der Trägergasstrom über eine Kapillare (150 µm, 10 cm) mit einem Nebengasstrom (Referenzfluss) verknüpft wird. Die unterschiedlichen Flussraten von 100 ml/min (Trägergasstrom) gegenüber 50 ml/min (Nebengasstrom) kombiniert mit einer einfachen Drosselung des Trägergasstroms bewirken, dass 1/10 des Trägergasstroms in den Nebengasstrom überführt wird.

Das überschüssige Kohlendioxidgas liegt im Nebenstrom nun nur noch zu 1/10 vor. So wird per Ventilschaltung die gleichzeitige Messung von

Kohlenstoff und Stickstoff in einem Messlauf ermöglicht. Das Diluter-System ist einfach und variabel einsetzbar. Es kann ebenfalls problemlos zur direkten Messung von exogenem Kohlendioxid in Schaum- und Perlweinen umfunktioniert werden [Boner 2001].

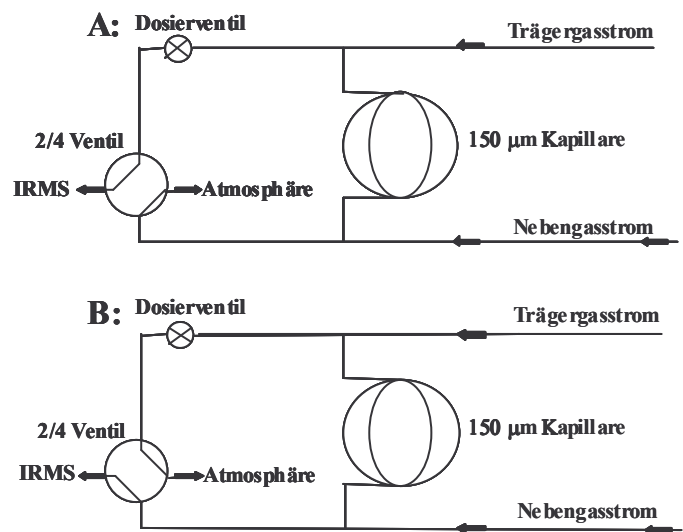


Abbildung 4-9: Funktionsschema des Diluters.

A: Das IRMS ist mit dem Trägergasstrom verbunden. Der Nebengasstrom ist auf Atmosphäre geschaltet. In dieser Konfiguration werden die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse bestimmt.

B: Das IRMS ist mit dem Nebengasstrom verbunden. Der Trägergasstrom ist auf Atmosphäre geschaltet. In dieser Konfiguration werden die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse bestimmt.

4.4.3 Bestimmung der $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse

Die Messung der $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse verläuft im Prinzip analog zur Bestimmung von Kohlenstoff und Stickstoff. Zwei besondere Probleme erschweren jedoch die Messung der Isotopenverhältnisse von Schwefel. Zum einen entsteht bei der oxidativen Verbrennung als Hauptverbrennungsprodukt zwar das gewünschte Schwefeldioxid; dieses reagiert jedoch nach dem Austreten aus der Verbrennungssäule schnell mit anfallendem Verbrennungswasser aus dem organischen Material zu schwefliger Säure. Daher muss dieses Wasser direkt mit Hilfe einer Wasserfalle (Magnesiumperchlorat) aus dem Trägergasstrom entfernt werden. Zum anderen entsteht bei der oxidativen Verbrennung als weitere Komponente das sehr reaktive Schwefeltrioxid, welches noch im Verbrennungsrohr mit Kupfer zu Schwefeldioxid reduziert werden muss. Das zwangsläufig entstehende Kupfersulfat zerfällt bei einer Temperatur oberhalb von $> 800^\circ\text{C}$ wieder vollständig in Kupferoxid und Schwefeldioxid [Ehrenberger 1998].

Aus diesem Grund müssen die sonst üblichen (z.B. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ und $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Bestimmung) einzelnen Oxidations- und Reduktionssäulen in einer Quarzröhre vereinigt werden, wobei die sehr wichtige Reduktionszone zwangsläufig erheblich schmilzt. Die Sauerstoffzudosierung muss daher optimal eingestellt werden, um diese Reduktionszone durch überschüssigen Sauerstoff nicht noch zusätzlich zu belasten. Deshalb wird als weitere Sauerstoffquelle Vanadiumpentoxid der Probe zudotiert, welches mögliche Sauerstoffdefizite während der Verbrennung ausgleichen soll. Die gaschromatographische Auftrennung des Probengases erfolgt bei 75°C über eine gepackte Teflonsäule (Porapak, 50/80, 0,8 m).

Stickstoff und Kohlendioxid werden nahezu ohne Verzögerung eluiert und erreichen als erstes das Isotopenmassenspektrometer. Damit dieses nicht von der erheblichen Menge an Kohlendioxid/Stickstoff beeinträchtigt wird, ist es ratsam, das Massenspektrometer auf den Bypassmodus zu schalten.

Die direkte Vermessung von organischem Material ist derzeit keine Routinemethode. Vielmehr ist es Standard, organische Schwefelverbindungen in Bariumsulfat zu überführen, das Bariumsulfat weiter zu H_2S zu reduzieren und am Ende Ag_2S darzustellen. Giesemann hat allerdings schon 1994 gezeigt, dass eine direkte Vermessung zumindest von BaSO_4 in Kombination eines Elementanalysators mit einem Isotopenmassenspektrometer möglich ist [Giesemann 1994].

Diese Aufarbeitung wird im allgemeinen vorgezogen, da sie gewährleistet, dass kein Wasser als Reaktionsprodukt anfällt. Außerdem ist die Optimierung der oxidativen Verbrennung einfacher, da die Substanzmenge wesentlich kleiner ist.

Für große Probenkontingente stellt die Aufarbeitungsmethode einen nicht zu unterschätzenden zeitlichen Aufwand dar. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Studie eine Direktbestimmung der Isotopenverhältnisse in der Probe ausgearbeitet.

Ein Resultat war die Verlegung der Wasserfalle direkt an den Ausgang des Verbrennungsrohres. Die Wasserfalle wurde weiterhin in ihrer Kapazität verdoppelt. Dies ermöglicht die direkte und optimale Entfernung von anfallendem Wasser.

Das Verbrennungsrohr wurde umgestaltet, indem das Ascherohr verlängert und als Oxidationsrohr umfunktioniert wurde. Dies ermöglicht es, die Asche und das Oxidationsmittel leicht und einfach zu entfernen bzw. zu ersetzen und somit eine optimale Verbrennung zu gewährleisten (Abbildung 4-10).

Eine Kupferfüllung reicht für 400 Messungen, jedoch sollten, damit eine optimale Verbrennung und Wasserentfernung gewährleistet ist, die Asche und die Wasserfalle immer nach 100 Proben entfernt bzw. ersetzt werden.

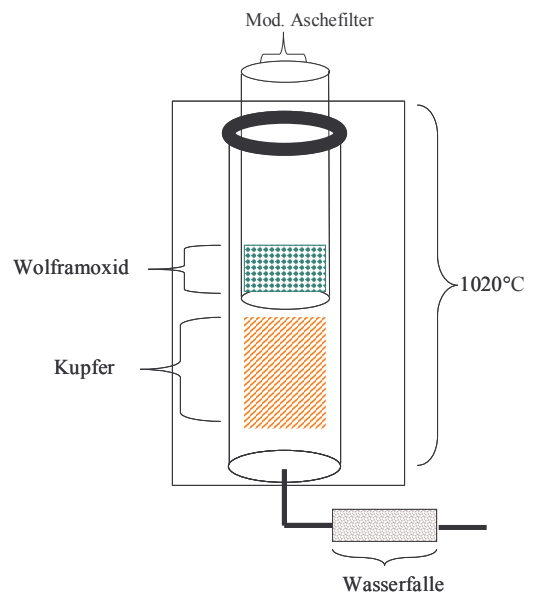


Abbildung 4-10: Aufbau der Verbrennungssäule zur Schwefelbestimmung.

4.4.4 Bestimmung der D/H Isotopenverhältnisse im Gewebewasser

Zur Darstellung von Wasserstoff aus Wasser wurde in der Routineanalytik Uran bzw. Zink verwendet, indem Wasser offline bei höheren Temperaturen ($> 450\text{ °C}$) reduziert wurde [Coleman 1982]. Eine andere Technik ist der Einsatz von Hoko Beads (Shoko Corp., Tokyo, Japan), ein Polymer das mit 3 % Platin versetzt worden ist. Der Katalysator ermöglicht eine katalytische Equilibrierungsreaktion [Horita 1988]. Beide Techniken haben Nachteile, zum einen weisen die genannten Reduktionsmittel erhebliche Memoryeffekte auf und zum anderen ist die Equilibrierungstechnik sehr temperaturanfällig, d.h. Abweichungen von 6 % / °C sind zu erwarten [Midwood 1999].

Als H/D-Messinstrumente wurden Dual-Inlet-Systeme eingesetzt, da die Verwendung von Helium in Continuous-Flow-Systemen die Messung von D/H störte. Der Grund hierfür liegt im übergroßen Heliumsignal gegenüber HD, welches mit seinem enormen Tailing des Peaks die Masse 3 mit überlagert. Gelöst werden kann dieses Problem, indem eine andere Massenspektrometer-Geometrie von 120° gewählt wird, mit einer höheren Dispersion des Ionenstrahls [Prosser 1993] oder vor dem Inlet ein Palladiumfilter gesetzt wird, das bei 550°C Helium ausschließt und Wasserstoff durchlässt [Tobias 1996].

Das Palladiumfilter kann auch direkt bei alten CF-IRMS-Systemen implementiert werden, so dass sich diese Technik als Universal-Methode anbietet. Probleme bereiten jedoch die palladiumbedingten Memory- und Diffusionseffekte (Bunsenscher Absorptionskoeffizient, $1000^\circ\text{C} = 9,04$).

Durchgesetzt hat sich die einfache Lösung mit einem elektrostatischen Filter zur Eliminierung der Heliumionen (Abbildung 4-11). Zur Bestimmung der D/H Isotopenverhältnisse wurde diese neue Massenspektrometer-generation von MICROMASS in Verbindung mit einem Elementanalysator mit Chrom als Reduktionsmittel eingesetzt.

Chrom hat sich als ideales Reduktionsmittel erwiesen [Gehre 1996], da es bei Temperaturen über 1000°C keine bzw. nur geringe Memoryeffekte (Bunsenscher

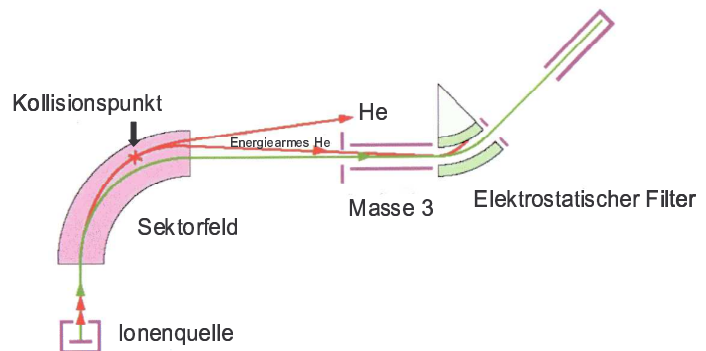


Abbildung 4-11: Schematische Darstellung der Isotopenmessung des Wasserstoffs im CF-IRMS.

Absorptionskoeffizient, $1000^\circ\text{C} = 0,09$) aufweist und die meisten anderen Elemente wie Halogene, Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel bindet [Kelly 2001]. Die eingesetzte gepackte Trennsäule und die Wasserfalle dienen lediglich dazu, anfallende Fremdgase zu verlangsamen bzw. abzutrennen, um Messstörungen der D/H-Isotopenverhältnisse zu vermeiden.

4.5 Korrekturen der Isotopenmessung

4.5.1 Isotopenverhältnisse $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Detektiert werden für die ^{18}O -Bestimmung die Massen 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$) und 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$). Davon werden lediglich die Massen 44 und 46 ausgewertet. Die Masse 45 kann als Korrekturterm [Craig 1957, Santrock 1985] einfließen, da statistisch eine Kombination von $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ möglich ist, die damit die Masse 46 verfälschen könnte. Zur Berechnung der Korrektur wird genutzt, dass ^{18}O Isotope und ^{17}O Isotope gleichgewichtete Isotopenfraktionierungen zeigen [Matsuhisa 1979].

Ähnliches ergibt sich bei der ^{13}C -Bestimmung. Hier ist natürlich nur die Massenkombination von $^{12}\text{C}^{12}\text{C}^{17}\text{O}$ zu berücksichtigen, die die relevante Masse 45 ebenfalls belegt.

4.5.2 Isotopenverhältnisse $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$

Die Masse 66 kann überlagert werden durch die Massenkombinationen $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ und $^{33}\text{S}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$. Dabei liegt aber das Isotop ^{34}S im Vergleich zu den anderen S Isotopen in einem so großen prozentualen Anteil vor, dass bei der Elementaranalyse unter der Voraussetzung der konstanten isotope Zusammensetzung des Sauerstoffs, dies vernachlässigt werden kann. Diese konstante isotope Zusammensetzung des Sauerstoffs ist gewährleistet, wenn bei der Verbrennung der eingelassene Sauerstoff in hohem Überschuss vorhanden ist bzw. signifikant die Isotopenverhältnisse des Sauerstoffs bestimmt. Damit genügt es, eine Kalibrierung des Laborstandards mit mindestens 2 Referenzstandards signifikant unterschiedlicher $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse durchzuführen.

Diese Kalibrierung ermöglicht die Bestimmung eines Korrekturfaktors, der eine mögliche Überlagerung der Masse 66 durch eine Kombination mit dem ^{18}O -Isotop berücksichtigt.

4.5.3 Isotopenverhältnisse D/H

Die Bestimmung der D/H Isotopenverhältnisse unterliegt zwei wesentlichen Korrekturen: zum einen dem H_3^+ -Faktor und zum anderen dem internen Korrekturfaktor.

Der H_3 -Faktor basiert auf der Grundlage, dass in der Quelle auch H_3^+ -Ionen ($^1H^1H^1H$) gebildet werden: $^1H_2 + ^1H_2 \rightarrow ^1H_3^+ + ^1H$, die damit die Masse 3 überlagern. Die Bildung der H_3 -Ionen ist proportional zum Partialdruck des Wasserstoffs in der Quelle, so dass dieser Korrekturfaktor über Variierung der einfließenden Wasserstoffmengen bestimmbar ist.

Je nach Bauart des Isotopenmassenspektrometers kommt es häufig zu einem Quenching oder Streching der D/H Isotopenverhältnisse, d.h. bei der Kalibrierung mit den internationalen Standards SMOW, GISP und SLAP sind diese Faktoren zu berücksichtigen. Deshalb muss ein Korrekturfaktor bei jeder D/H Isotopenmessung entsprechend eingerechnet werden.

4.6 Reproduzierbarkeiten

Ein wesentliches Entscheidungskriterium für die Reproduzierbarkeit der Stabil-Isotopenmessung ist, dass die erzeugten Intensitäten im Linearitätsbereich des Massenspektrometers 10^{-9} bis 10^{-8} A liegen. Dies ist der Bereich, in dem der Hersteller, sofern das Tuning optimal eingestellt ist, weitgehende Linearität gewährleistet. Die Einwaage wurde entsprechend dieser Vorgabe angepasst. In der Routine ergaben sich folgende durchschnittliche Standardabweichungen der Doppelproben ($n > 300$; Tabelle 4-2).

Isotope	Standardabweichungen in der Routine
$^{18}O/^{16}O$	0,1 ‰
D/H	1,0 ‰
$^{13}C/^{12}C$	0,1 ‰
$^{15}N/^{14}N$	0,2 ‰
$^{34}S/^{32}S$	0,3 ‰

Tabelle 4-2: Durchschnittliche Reproduzierbarkeiten der Isotopenmessung.

4.7 Statistik

4.7.1 Arithmetischer Mittelwert

Der Mittelwert von Datenwerten ist die Summe der Werte, dividiert durch ihre Anzahl:

$$(4-1) \quad MW = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Das arithmetische Mittel ist die geläufigste Maßzahl, die für die Charakterisierung des zentralen Wertes einer Verteilung herangezogen wird. Jedoch wird es durch Extremwerte gerade bei kleinerer Anzahl von Proben (<10) stark verfälscht. Die Bestimmung des Medians stellt im Vergleich dazu ein robusteres Verfahren dar und wird deshalb in dieser Arbeit zusätzlich verwendet.

4.7.2 Median

Der Median ist der Mittelpunkt der in aufsteigender Reihenfolge geordneten Datenwerte. Durch ihn werden die Daten in eine „untere“ und eine „obere“ Hälfte geteilt. Der Median ist dann die Zahl, die in der Mitte der Zahlenreihe liegt. Das heißt, die eine Hälfte der Zahlen hat Werte, die kleiner sind als der Median, und die andere Hälfte hat Werte, die größer sind als der Median.

Bei normal verteilten Daten liegen das arithmetische Mittel und der Median nahe beieinander, sind – im Idealfall – miteinander identisch. Beide spiegeln in solchen Fällen exakt die „Mitte“ der Datenmenge wider.

4.7.3 Standardabweichung

Die Standardabweichung misst den Abstand der einzelnen Datenwerte zum arithmetischen

Mittel: $m = \text{arithmetisches Mittel}$

$$(4-2) \quad s = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_i - m)^2}{n-1}}$$

4.7.4 Spannweite

Die Spannweite entspricht der Differenz zwischen dem größten (Max) und kleinsten (Min) Wert einer Variablen.

4.7.5 Quartile

Ähnlich wie der »Median« die unteren 50 % der Werte einer »Variablen« von den oberen 50 % trennt, lassen sich beliebig weitere Verteilungen berechnen. Am bekanntesten sind das 25 und 75% Quartil, die das untere und das obere Viertel der Verteilung abschneiden. Man bezeichnet sie daher auch als untere und obere Quartile, bzw. als erstes und drittes Quartil. Der Median ist in diesem Zusammenhang als 2. Quartil einzustufen. Der Interquartilsabstand ist die Differenz zwischen dem oberen und dem unteren Quartil: $\Delta Q = Q_3 - Q_1$. Der Interquartilsabstand misst damit, in welchem Bereich die mittleren 50% der Variablenwerte streuen. Da er auf dem mittleren Bereich der Verteilung beruht, ist er ein robusteres Maß der Streuung als die Spannweite oder die Standardabweichung.

4.7.6 Box-und-Whisker-Plots

Die Box- und Whisker Plots, kurz Box Plots sind eine einfache Möglichkeit, Daten anhand von Quartilen zusammenfassend darzustellen. Die Box im Box-und-Whisker-Plot wird durch das 25 % und 75 % Quartil begrenzt. In der Box eingetragen sind der Mittelwert und Median. Erweitert wird die Box durch die „Schnurrhaare – Whiskers“ die das 1,5fache des Interquartilsabstands wiedergeben. Übertragen auf die Standardabweichung der Normalverteilung umfassen die „Whiskers“ einen Streubereich von $2,7\sigma$ bzw. 99,3 % aller Messwerte. Zwischen dem 1,5fachen und dem 3fachen Interquartilsabstand liegen die statistischen Ausreißer und oberhalb des 3fachen Interquartilsabstands die Extremwerte.

4.7.7 Korrelationskoeffizient nach PEARSON

Für die Prüfung eines Zusammenhanges zwischen zwei Variablen kann der Korrelationskoeffizient nach PEARSON genutzt werden. Dieser Koeffizient kann nicht kleiner als -1 und nicht größer als $+1$ werden. Ein Wert von 0 bedeutet dabei, dass zwischen den beiden Variablen kein Zusammenhang besteht. Einem Wert von $+1$ bzw. -1 entspricht dagegen eine signifikante Übereinstimmung. Ist der Koeffizient negativ, deutet dies auf einen gegenläufigen Zusammenhang hin und entsprechendes gilt für den positiven Korrelationskoeffizienten. Als qualitative Bewertung des Korrelationskoeffizienten ergibt sich nachfolgende Einordnung (4-3).

Wichtig für die Ermittlung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ist, dass die beiden Datenmatrizen annähernd normalverteilt vorliegen.

KK = Korrelationskoeffizient: Pearson	Korrelationsgüte
$0 < \text{KK} < 0,2$	Sehr geringe Korrelation
$0,2 < \text{KK} < 0,4$	Geringe Korrelation
$0,5 < \text{KK} < 0,7$	Mittlere Korrelation
$0,7 < \text{KK} < 0,9$	Hohe Korrelation
$0,9 < \text{KK} < 1,0$	Sehr hohe Korrelation

Tabelle 4-3: Korrelationsgüte nach PEARSON.

4.7.8 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse ist ein multivariantes statistisches Verfahren, das es erlaubt, durch Transformation der ursprünglichen Variablen neue Variablen zu definieren.

Die Aufgabe der Hauptkomponentenanalyse ist es dabei, durch Linearkombination neue Variablen zu bestimmen, die möglichst viele Informationen der Ausgangsmerkmale besitzen. Hat man k Variablen, kann man k Komponenten definieren, mit der Eigenschaft, dass die erste Komponente möglichst viel von der Gesamtvariabilität erfasst. Die zweite Komponente enthält nur die Variabilität, die noch nicht von der ersten erfasst wurde, fortsetzend gilt dies für die restlichen Komponenten. Damit ist es möglich, einen Datensatz mit mehreren

Variablen auf wenige Hauptkomponenten zu reduzieren, die dann einen großen Anteil der Gesamtvariabilität erfassen.

Hauptkomponenten dienen somit der Dimensionsreduktion von Daten. Im Idealfall sollten dabei keine ursprünglichen Informationen verloren gehen.

4.7.9 Diskriminanzanalyse

Ziel der Diskriminanzanalyse ist es, Variablen bzw. Merkmale linear so zu kombinieren, dass vorgegebene unabhängige Gruppen optimal voneinander getrennt werden. Die Trennung erfolgt durch Erfassung einer bestimmten Anzahl von messbaren Merkmalen dieser Objekte und durch Aufstellung einer sogenannten Trennfunktion (Diskriminanzfunktion). Das Aufstellen bzw. das Abschätzen der Diskriminanzfunktion hat Ähnlichkeiten mit der Schätzung einer Regressionsfunktion in der Regressionsanalyse. Die Eigenart der Diskriminanzanalyse ergibt sich aus der Funktion, dass eine Zuordnung von Fällen zu einer von mehreren alternativen Gruppen vorgenommen wird.

Die erörterten statistischen Verfahren werden im Zuge der Arbeit angewendet. Eine vertiefende Erörterung der Herleitung und Anwendung dieser Verfahren kann bei Falk oder Backhaus [Falk 1995, Backhaus 1994] nachgeschlagen werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Isotopenverhältnisse im Muskelfleisch

Unterschiede von verschiedenen Turnover-Zeiten innerhalb der unterschiedlichen Fleischpartien, als auch mögliche biochemische Isotopenfraktionierungen sind entscheidende Einflussgrößen, die bei der Bewertung von Stabil-Isotopen-Daten zu berücksichtigen sind.

Auch ist zu bedenken, das Muskelfleisch unterschiedliche Anteile am Bindegewebsprotein Collagen aufweisen kann. Unzerteiltes Rindfleisch enthält durchschnittlich etwa 13 % Bindegewebe. Im entsehten Bratenfleisch kann der Anteil jedoch auf ca. 6 % sinken. Da das Collagen im wesentlichen nur aus 4 Aminosäuren (Glycin: 35 %, Prolin und Hydroxyprolin: 21 % und Alanin: 11 %) aufgebaut ist, können damit Isotopenunterschiede aufgrund der Bindegewebsanteile entstehen.

Das Alter der Rinder sollte keinen Einfluss auf die Isotopenverhältnisse aufweisen, da sich im wesentlichen in der Struktur des Muskelfleisches weitergehende Verzahnungen bilden. Es wurde jedoch in der Auswahl der beiden Rinder der Untersuchung berücksichtigt.

Zur Abschätzung möglicher isotoper Variationen im Muskelfleisch wurden damit zwei Biorinder (Fleisch von Jungbullen und Kuh) untersucht, die sich im Alter (18 zu 61 Monaten) deutlich unterschieden. Zur Differenzierung des Rindfleisches wurde der „Schweizer Schnitt“ gewählt [Prändl 1988], der im wesentlichen die heutige Zerlegung vorgibt und dessen Zerlegungsstücke die erhältliche kommerzielle Ware darstellen. Es ergaben sich 30 Teilstücke (Tabelle 5-1), die auf die Zusammensetzung der stabilen Isotope der Bioelemente untersucht wurden. Eine lokale Zuordnung zum Rindkörper wird in der Abbildung 5-1 dargestellt. Die Grafik berücksichtigt nur die übergeordnete Einteilung des Rindes. So lässt sich die Keule noch in zehn weitere Fleischpartien unterteilen.

Nr.	Übergeordnete Einteilung	Unterteilung	Nr.	Übergeordnete Einteilung	Unterteilung
1	Kamm (1-7 Halswirbel)	Kamm	10	Keule	Oberschale
2	Fehlrippe (1-8 Rippe)	Fehlrippe			Oberschalendeckel
3	Hochrippe (9-11 Rippe)	Hochrippe			Runde Kugel
4	Spannrippe	Spannrippe			Flache Kugel
5	Brust	Brustbein			Kugeldeckel
		Nachbrust			Bürgermeisterstück
		Mittelbrust			Schmales Hüftstück
6	Bug	Falsches Filet			Breites Hüftstück
		Schaufelstück			Hüftzapfen
		Dickes Bugstück	Mittelschwanzstück		
		Ellenbogenstück	Tafelspitz		
		Schaufeldeckel	Schwanzrolle		
7	Dünnung (Bauchfleisch)	Dünnung	Henckel		
8	Roastbeef	Roastbeef	11	Beinscheibe	Hinterhesse
9	Filet	Filet			Vorderhesse

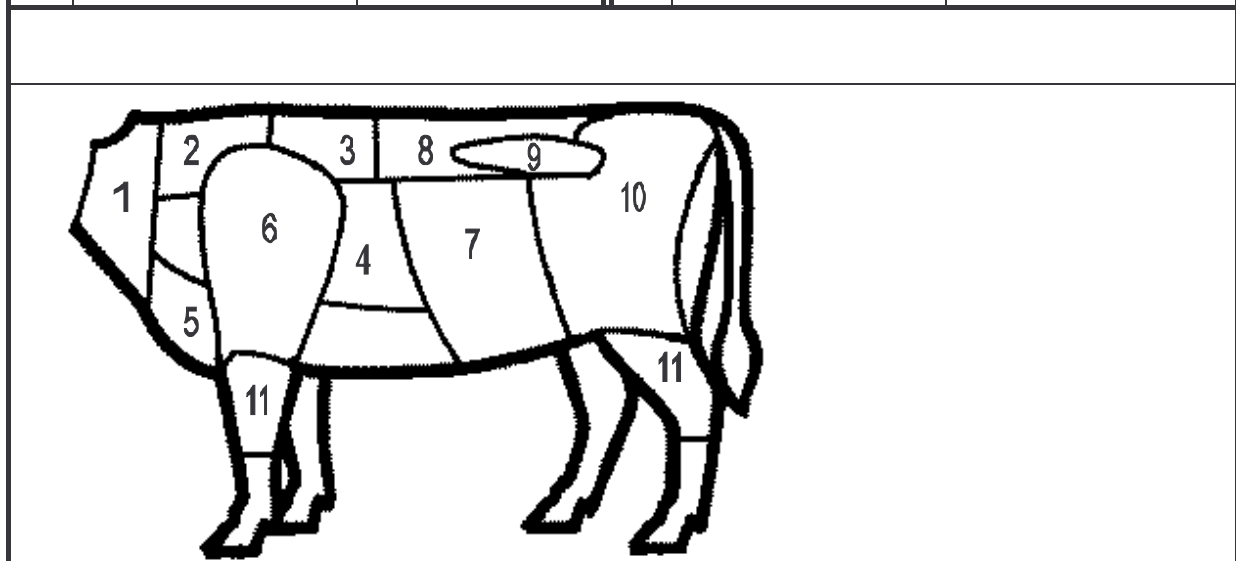


Tabelle 5-1: Teilstücke des Rindes nach der Vorgabe des „Schweizer Schnitts“.

Abbildung 5-1: Zuordnung der Teilstücke.

Die Rinder wurden zu unterschiedlichen Jahreszeiten geschlachtet. Das alte Rind (Alter: 61 Monate) wurde Anfang Februar (3. Februar 2000), das Jungrind (Alter: 18 Monate) Mitte April (12. April 2000) geschlachtet und 7 Tage später zerlegt. Beide Tiere stammten vom gleichen Biohof (Rheinbach). Von den Rindfleischproben wurden die D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse aus dem Gewebewasser und die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse aus dem Rohprotein ermittelt.

Die erhaltenen Mittelwerte der Bioelemente aus den Gesamtproben mit den zugehörigen Standardabweichungen, dem Median mit dem 1. und 3. Quartil, sowie der Minimal- und Maximalwert und deren Spannweiten sind in der folgenden Tabelle 5-2 wiedergegeben.

Altrind	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ [‰] v.s. SMOW	D/H [‰] v.s. SMOW	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ [‰] v.s. IAEA-N1	$^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ [‰] v.s. NBS-127	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ [‰] v.s. PDB
Datenmenge	30	30	30	30	30
Minimum	-5,6	-46,7	5,2	5,7	-25,7
1. Quartil	-5,4	-42,5	5,8	5,9	-25,6
Median	-5,2	-41,7	6,1	6,1	-25,4
3. Quartil	-5,1	-40,6	6,4	6,2	-25,4
Maximum	-4,8	-38,0	6,8	6,4	-24,9
Spannweite	0,8	8,7	1,6	0,7	0,8
Mittelwert	-5,2	-41,6	6,1	6,1	-25,4
Standardabweichung	0,2	1,8	0,4	0,2	0,2
Jungrind					
Datenmenge	30	30	30	30	30
Minimum	-4,3	-38,9	5,5	6,3	-26,2
1. Quartil	-4,0	-35,0	5,9	6,5	-26,0
Median	-3,8	-33,2	6,1	6,7	-25,9
3. Quartil	-3,6	-31,7	6,2	6,8	-25,9
Maximum	-3,5	-29,6	7,0	7,0	-25,9
Spannweite	0,8	9,2	1,6	0,7	-25,6
Mittelwert	-3,8	-33,5	6,1	6,7	0,5
Standardabweichung	0,2	2,4	0,4	0,2	0,1

Tabelle 5-2: Statistische Kenndaten der Probenkollektive des Jung- und Altrindes.

Zusätzlich werden in den Grafiken der Abbildung 5-3 (a-c) die unterschiedlichen Isotopenverhältnisse der einzelnen Fleischpartien dargestellt.

Generell ist in der Bewertung der D/H Isotopenverhältnisse zu berücksichtigen, dass unter Voraussetzung einer „*meteoric water line*“-Abhängigkeit eine Faktorisierung um 8 ‰ gegenüber den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen vorliegt. Dies ist im direkten Vergleich von den D/H zu den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen entsprechend zu berücksichtigen.

Beide Rinder zeigen identische Werte für den Mittelwert und den Median, was für eine Normalverteilung spricht. Weiterhin haben beide Rinder in den verschiedenen Fleischpartitionen ähnliche Spannweiten für Kohlenstoff, Sauerstoff und Schwefel von 0,7 bis 0,8 ‰. Lediglich die Kohlenstoffisotopenverhältnisse in den Fleischpartitionen des Jungrindes zeigen eine geringere Spannweite von 0,5 ‰.

Die Spannweiten der D/H Isotopenverhältnisse sind dagegen in beiden Rindern höher als theoretisch zu erwarten war. So sollten, unter Berücksichtigung des Sauerstoffs, Spannweiten zwischen 6 bis 7 ‰ vorliegen, beide Tiere zeigen jedoch in den Probenkollektiven Spannweiten von 9 ‰ auf.

Im relativen Vergleich ist auffallend, dass die Stickstoffisotopenverhältnisse in beiden Probenkollektiven die höchsten Spannweiten aufweisen. Diese liegen um den Faktor zwei höher, denn beide Rinder zeigten in den unterschiedlichen Fleischpartitionen eine Maximalspannweite von 1,6 ‰. Die höhere Spannweite des Stickstoffs im Muskelfleisch spiegelt sich auch in der ermittelten Standardabweichung von 0,4 ‰ wider, die doppelt so hoch ist wie die Standardabweichung der übrigen untersuchten Bioelemente von 0,2 ‰.

Die höhere Variation der Stickstoffisotopenverhältnisse ist signifikant. Es unterstreicht die schon vorab diskutierte Besonderheit der möglichen Isotopenvariation vom Stickstoff im Gewebe (siehe Kapitel 4.2). Im Gegensatz zu Sutoh [Sutoh 1987] wurden jedoch für die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse wesentlich niedrigere Spannweiten festgestellt. Dieses Ergebnis ist nicht unvereinbar mit seinen Untersuchungen, denn es wurde in dieser nicht nur Muskelgewebe berücksichtigt, sondern auch Haare. Die Haare sind sicherlich als Sonderfall anzusehen, da eine mögliche Änderung der Isotopenverhältnisse nach der Bildung des jeweiligen Haarabschnittes abgeschlossen ist. Die unterschiedlichen Zonen des Haares geben damit zeitliche Momentaufnahmen wieder.

Betrachtet man lediglich die Spannweite der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse in den verschiedenen Gewebearten (Abbildung 4-3), so liegt eine Spannweite von 1,9 ‰ vor, welche eine gute Näherung zu der gefundenen Spannweite im Rind widerspiegelt.

Innerhalb der Isotopenverhältnisse der einzelnen Fleischpartitionen der Abbildung 5-3 (a-c) ist es sicherlich schwierig abzulesen, dass bestimmte Partitionen in beiden Rindern im Vergleich zum Mittelwert eine hohe Anreicherung bzw. Abreicherung aufweisen, die auf eine biochemische Isotopenfraktionierung oder strukturelle Besonderheiten (z.B. Kollagen) hinweisen würden.

Aus diesem Grund werden die einzelnen prozentualen Abweichungen der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse vom Mittelwert berechnet. Die allgemeine Standardabweichung wird in einem prozentuellen Abschlag berücksichtigt, d.h. die Bestimmung der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse weist durchschnittlich eine Standardabweichung von 0,2 ‰ auf; bei einer Gesamtspannweite aller Fleischpartitionen von 1,6 ‰ entspricht dies einem prozentuellen Wert von 12,5 %. Dieser Wert wird entsprechend als Schwellenwert in der prozentuellen Abweichung eingerechnet. Daraus resultierende negative Ergebnisse als auch gegenläufige prozentuale Abweichungen gleicher Partitionen im direkten Vergleich der untersuchten Rinder werden mit Null gewertet.

Die prozentualen Abweichungen gleicher Partitionen der beiden Rinder werden multipliziert und mit einem Divisor von 100 belegt. Daraus ergeben sich die in Abbildung 5-3 (d) dargestellten Tendenzen die als Kennzahlen wiedergegeben werden.

Besonders die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse zeigen in diesen Kennzahlen verschiedener Partitionen Tendenzen zur Ab- bzw. Anreicherung. So weist die „Kamm“-Partition in beiden Rindern eine Tendenz zu angereicherten Isotopenverhältnissen auf, dagegen haben die Partitionen: „dickes Bugstück“, „Mittelbrust“ und „Roastbeef“ in beiden Rindern eine Tendenz zu abgereicherten Isotopenverhältnissen.

Dennoch liegt sicherlich kein Hinweis einer strukturellen Besonderheit dieser Partitionen in Form eines hohen Kollagenanteils vor, da gerade die Dünnung, eine Partition mit sehr hohem Kollagenanteil, nicht auffällig ist.

Eine Bestätigung dieser Tendenz ist sicherlich erst durch weitere Untersuchungen von verschiedenen Rindern abzusichern.

Nach den vorliegenden $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnissen ist eher davon auszugehen, dass diese Isotopenverhältnisse der Proben eine zeitliche Momentaufnahme wiedergeben, die durch verschiedene Turnover-Zeiten vorgegeben sind.

Die Variation der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse kann damit aber nicht erklärt werden, denn der Wasserpool des Rindes ist nicht diskriminierbar. Gründe für eine mögliche Variation dieser Isotopenverhältnisse können in destillativen Effekten während des Abhängens zu finden sein, so dass es in den äußeren Fleischpartitionen des Rindes zu Anreicherungen der D/H bzw. $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse gegenüber den inneren kommt.

Betrachtet man lediglich den Gesamtmittelwert mit seiner Standardabweichung, so sind die unterschiedlichen Rinderpartien in ihren Isotopenverhältnissen als homogen anzusehen. Wenn man ein 1σ als Differenzierungskriterium anlegt, dann stimmen die beiden Rinder in ihren Mittelwerten und Standardabweichungen aller Partitionen für die Isotope des Kohlenstoffs, Stickstoffs und Schwefels überein.

Die Annahme, dass sie die gleiche Nahrungsbasis hatten, bzw. vom selben ökologischen Hof stammten, wird durch diese Daten bestätigt. Die Isotopenverhältnisse des Wasserstoffs und Sauerstoffs differieren jedoch merklich. Der Vergleich der Mittelwerte der Rinder zeigt eine signifikante Anreicherung der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse des Jungrindes. Diese Anreicherung ist abhängig von der Jahreszeit und wird im Kapitel 5.2 ausführlicher diskutiert.

Das Alter stellt dabei nach der vorliegenden Datengrundlage keine Einflussgröße dar. Bis auf den Kohlenstoff wurden keine signifikant höheren Spannweiten gefunden, und es liegen in den Isotopen des Stickstoffs, Schwefels und Kohlenstoffs keine Unterschiede zwischen den Gesamtmittelwerten des Jung- und Altrindes vor.

Dies entspricht der Hypothese von Ponsard [Ponsard 1999], die besagt, dass im wesentlichen die Nahrung die Isotopenverhältnisse bestimmt und das Alter keinen Einfluss hat.

Es bleibt offen, ob das Streuungsmaß der untersuchten Isotope der Bioelemente für eine große Grundgesamtheit von Biorindern repräsentativ ist. Deshalb wurden weiterführend Kamm-, Brust- und Keulenproben von 69 verschiedenen Rindern auf die D/H, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse untersucht (Abbildung 5-2). Zur leichteren Eingliederung der D/H Isotopenverhältnisse wurden die Spannweiten unter Einbeziehung eines Divisors von 8 ‰ berechnet und entsprechend dargestellt.

Diese Vorgehensweise setzt natürlich voraus, dass eine „*meteoric water line*“-Abhängigkeit annähernd besteht, entsprechend kann dann eine Nivellierung der D/H-Isotopenverhältnisse erfolgen.

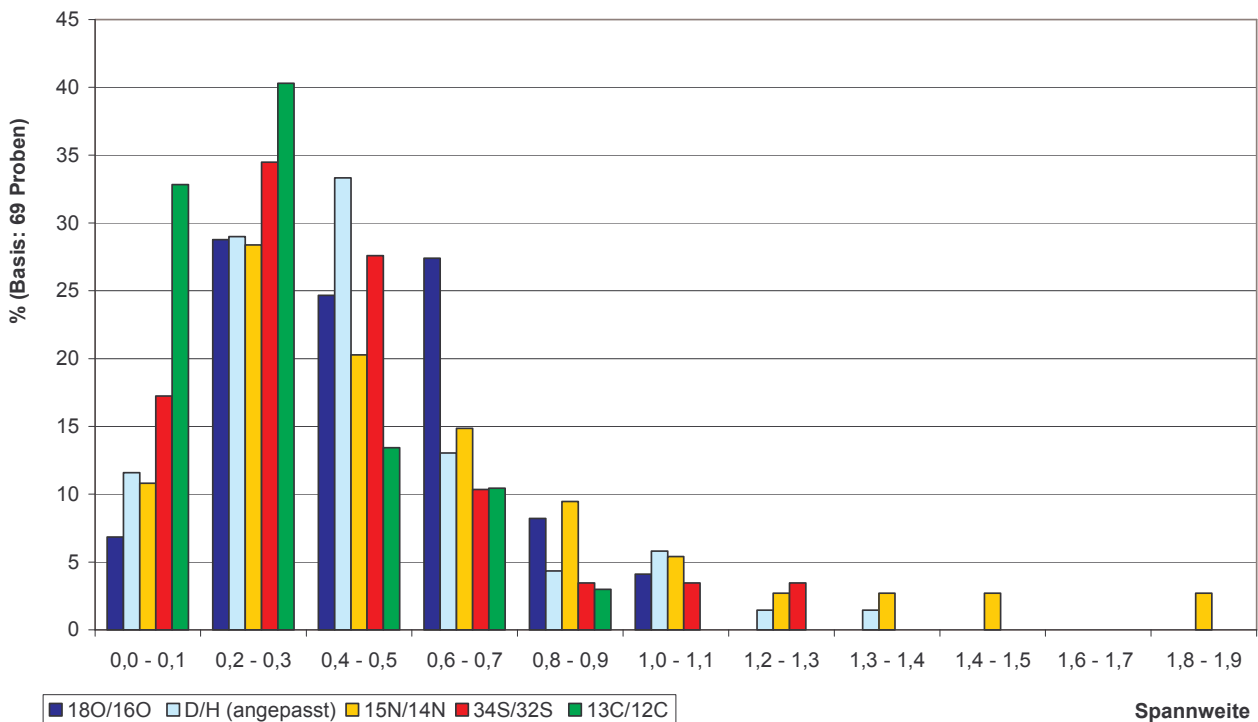


Abbildung 5-2: Spannweiten der Isotopenverhältnisse in Rindfleischproben (Kamm, Brust, Keule) verschiedener Rinder.

Danach weist der Kohlenstoff die geringste Spannweite auf; mehr als 87 % zeigen eine Spannweite zwischen dem Minimal- und Maximalwert von unter 0,6 ‰. Die Maximalspannweite von 0,9 ‰ entspricht weitgehend der Spannweite der beiden untersuchten Rinder. Die Spannweite der Sauerstoffisotopenverhältnisse ist jedoch geringfügig größer, statt 0,8 ‰ in den beiden untersuchten Rindern werden Maximalspannweiten von 1,1 ‰ gefunden. Dennoch liegen mehr als 88 % unter der Spannweite von 0,8 ‰. Die Maximalspannweite des Wasserstoffs entspricht weitgehend der gefundenen Maximalspannweite der beiden untersuchten Rinder von 1,2 ‰ (angepasst). Dabei ist auffallend, dass die D/H Spannweiten der untersuchten Proben im Vergleich zu denen des Sauerstoffs tendenziell geringer sind. So zeigen 74 % der Proben Spannweiten unter 0,6 ‰ (angepasst), gegenüber 60 % beim Sauerstoff.

Die schlechteren Spannweiten des Wasserstoffs von 1,2 ‰ (angepasst) gegenüber 0,8 ‰ bei dem schon vorab diskutierten Probenkollektiven der beiden Rinder ist statistisch sicherlich

möglich, jedoch in der Gesamtheit als eine Auffälligkeit zu bewerten, deren Ursache möglicherweise in einer besonderen Ernährung (viel Grünfutter) liegen kann.

Der Stickstoff zeigt ähnlich den Ergebnissen des Probenkollektivs der beiden Rinder die höchste Variation. Lediglich 74 % der Proben weisen Spannweiten unter 0,8 ‰ auf, alle anderen Isotope umfassen bei dieser annähernd das vollständige Probenkollektiv von 90 % bzw. 97 % (Kohlenstoff).

Die ermittelte Maximalspannweite liegt bei den untersuchten 69 Proben bei 1,9 ‰ und somit geringfügig höher als bei den Probenkollektiven der beiden Rinder. Die Hauptmenge von 97 % hat jedoch eine Spannweite unterhalb von 1,6 ‰.

Die ermittelten Spannweiten in den beiden ausführlich zerlegten Rindern sind damit als weitgehend repräsentativ einzuschätzen.

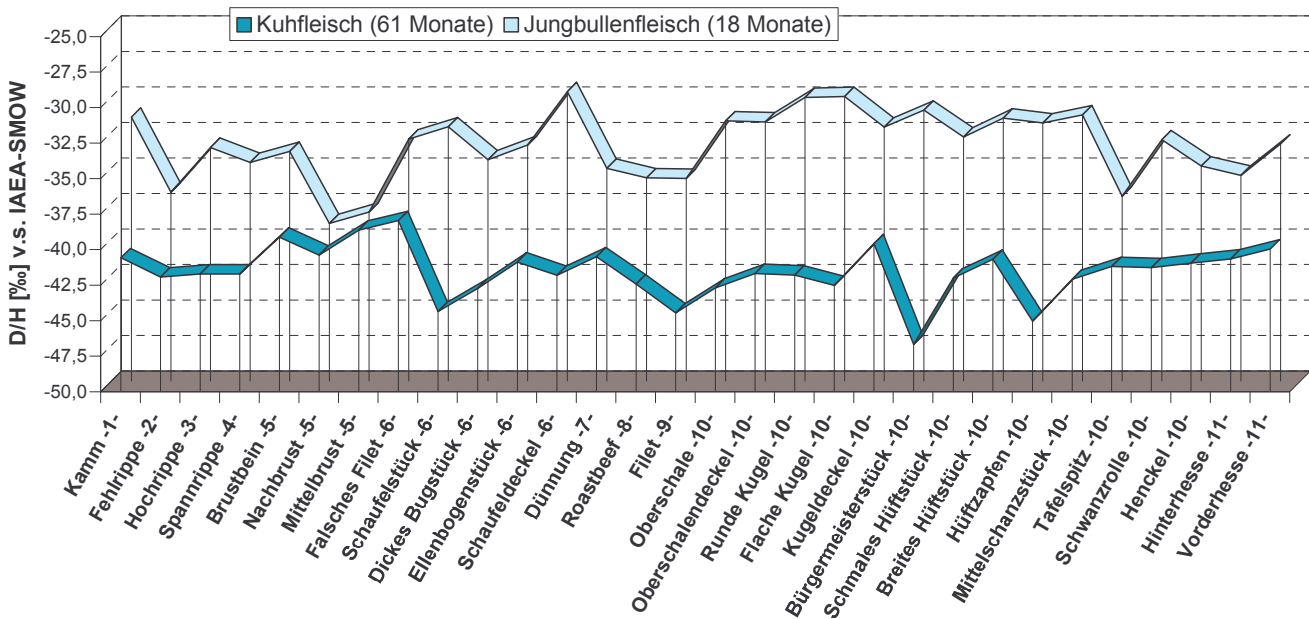
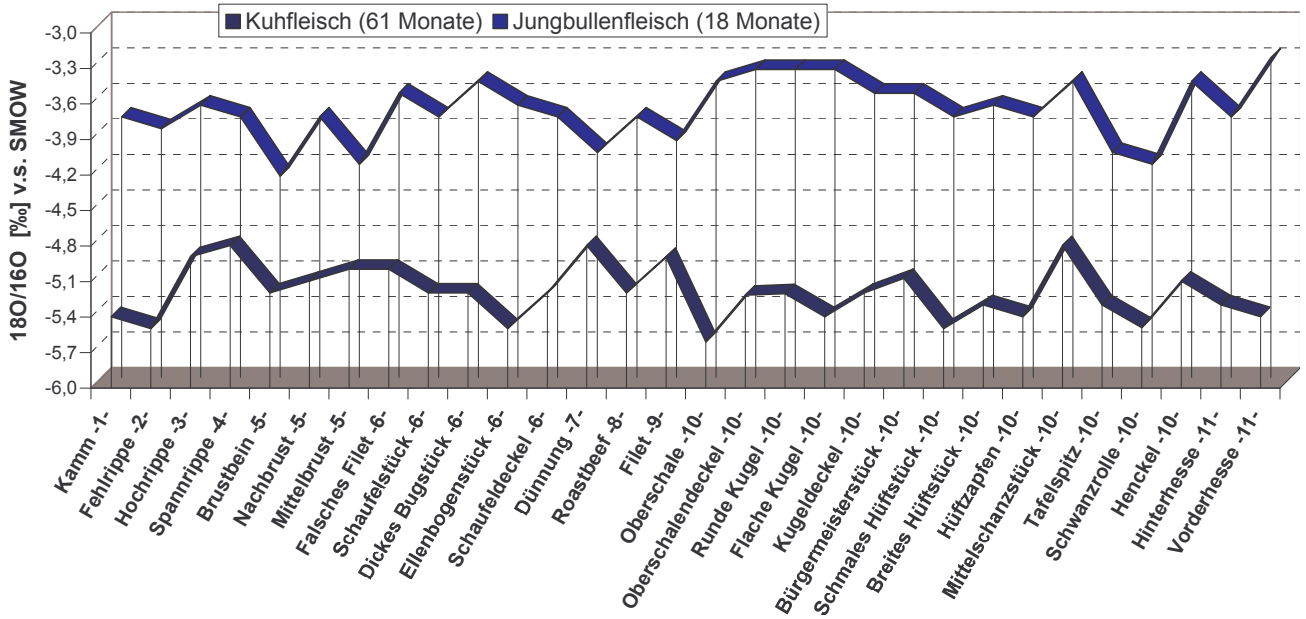


Abbildung 5-3a: $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse in den verschiedenen Teilstücken der beiden Rinder.

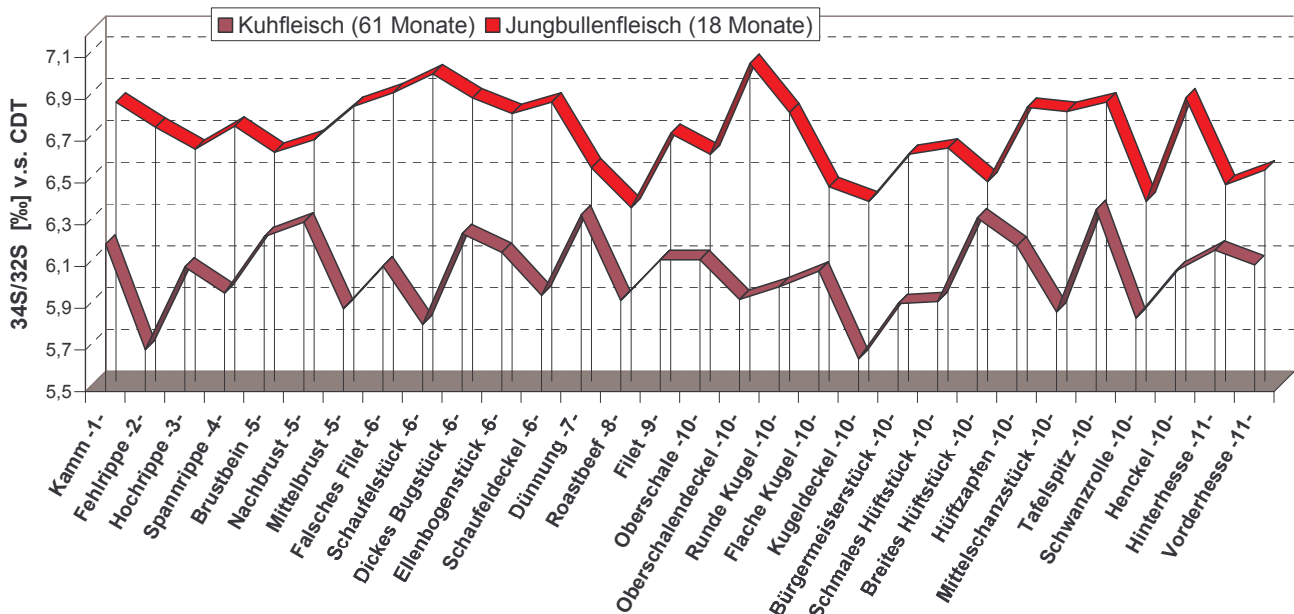
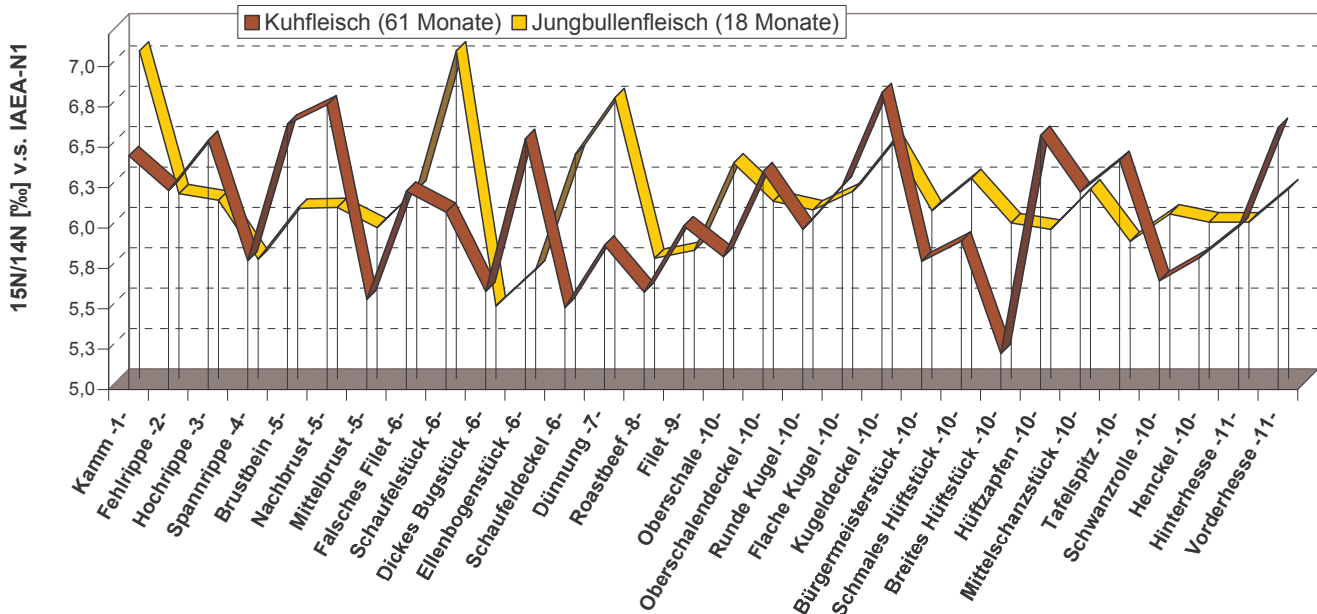


Abbildung 5-3b: $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse in den verschiedenen Teilstücken der beiden Rinder.

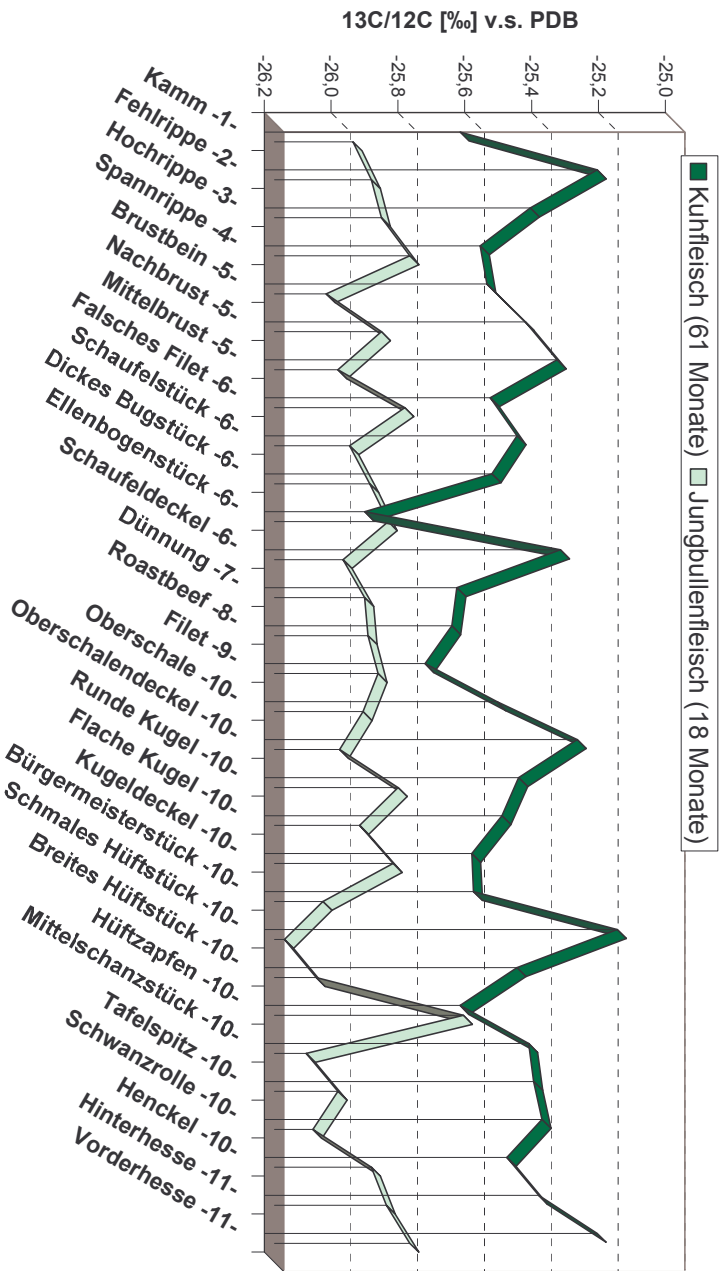


Abbildung 5-3c: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse in den verschiedenen Teilstücken der beiden Rinder.

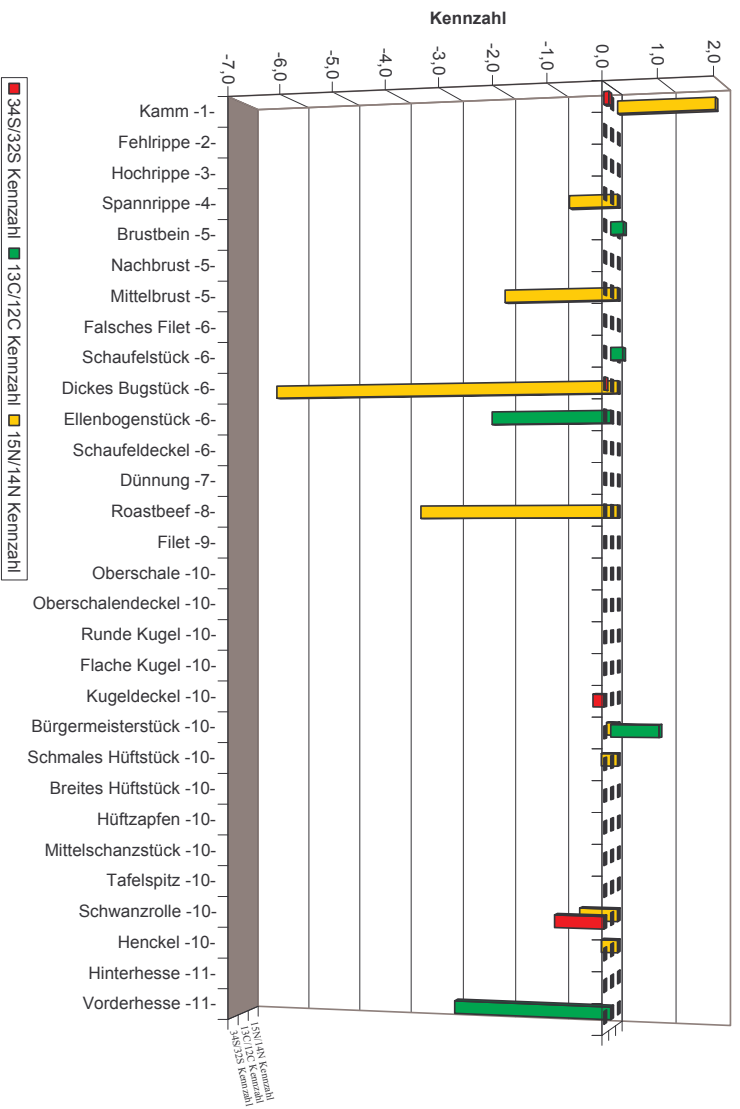


Abbildung 5-3d: Tendenzen der untersuchten Partitionen beider Rinder zu angereicherten bzw. abgereicherten Isotopenverhältnissen.

5.2 Einfluss der Jahreszeit

Wie im Abschnitt 3.1 dargestellt, sind die Isotopenverhältnisse von $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H neben anderen Einflussgrößen abhängig von der Temperatur. Deshalb existiert in den Isotopenverhältnissen von $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H des Niederschlagswassers ein Jahreszeitgang mit angereicherten Werten im Sommer und abgereicherten Werten im Winter. Dieser Unterschied nivelliert (> 60 cm) sich zwar vollständig mit zunehmender Bodentiefe, in der oberen Bodenschicht ist dieser jedoch vorhanden [Liu 1995].

Pflanzen, die das Wasser der oberen Bodenschichten (< 60 cm) nutzen, zeigen in ihrem Gewebewasser, ohne Berücksichtigung der Transpirationseffekte, korrespondierende Unterschiede, d.h. Anreicherungen im Sommer und Abreicherungen im Winter [Dawson 1996, Dawson 1991]. Für die regionale Überprüfung von Pflanzenprodukten mit Hilfe der Isotope $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, D/H spielt dieser Effekt nur eine untergeordnete Rolle, da die Erntefenster zeitlich eng begrenzt sind. Jedoch werden Rinder ganzjährig mit Grünfutter versorgt, so dass jahreszeitliche Einflüsse durch die Isotopenverhältnisse im Gewebewasser des Grünfutters nicht auszuschließen sind. In der kontinuierlichen Untersuchung von Fleischproben (Rheinbach, Aachen und Düren) ist dieser Effekt deutlich sichtbar (Abbildung 5-4).

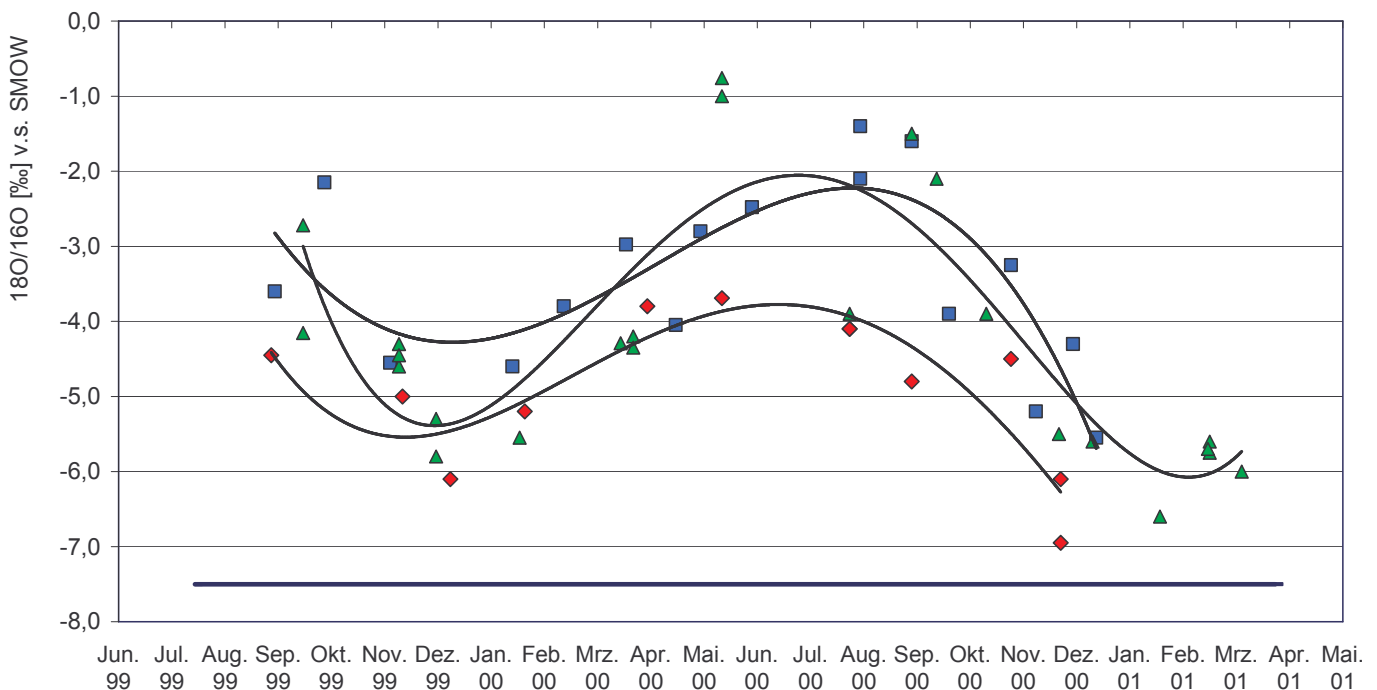


Abbildung 5-4: Jahreszeiteinfluss auf die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse im Gewebewasser. Zusätzlich dargestellt ist der Graph des jahreszeitlichen Trends als Polynom 3. Grades. Der Grundwasserwert ist als untere blaue Randlinie eingefügt.

Ein ähnlicher jahreszeitlicher Einfluss wurde auch in der Untersuchung von Milchproben nachgewiesen [**Kornexl 1997**].

In diesem Zusammenhang ist das Trinkwasser der Rinder als Einflussgröße auszuschließen, da die Trinkwasserversorgung der Betriebe auf einer Grund- bzw. Talsperrenwasserversorgung beruht, mit jahreszeitlich nahezu konstanten Isotopenverhältnissen.

Der jahreszeitliche Effekt ist aber nicht nur durch die jahreszeitliche Schwankung der Isotopenverhältnisse des Niederschlagswassers zu erklären, denn durch die Transpirationsfraktionierung des Gewebewassers in den Pflanzen werden die Isotopenverhältnisse im Gewebewasser zusätzlich angereichert (siehe 3-6).

Zur vollen Bedeutung gelangen diese Anreicherungen jedoch erst unter Betrachtung der Nahrungszusammensetzung des Rindes innerhalb eines Jahres.

Vom Frühjahr bis in den Frühherbst ist eine Fütterung von Grünfutter mit Wasseranteilen von 75 - 85 % möglich. Der Wasseranteil des Futters geht im Winter durch dessen Konservierung auf ca. 30 – 40 % in Anwelksilage, bzw. 12 % im Trockengrünfutter oder Rauhfutter zurück.

Zur Wasserbedarfsdeckung eines Rindes werden 4 - 5 l Wasser je kg verzehrte Futter-Trockenmasse benötigt [**Kirchgeßner 1997**]. Theoretisch könnte der Bedarf an Wasser annähernd durch das Weidefutter alleine gedeckt werden, in der Praxis ist das Trinkwasser (Brunnen-, Leitungswasser) natürlich weiterhin nötig. Der Wasseranteil im Weidegras stellt trotzdem einen wesentlichen Faktor in der Deckung des Wasserbedarfs dar. Die Wasserbedarfsdeckung aus dem Futter vermindert sich im Winter rapide um den Faktor 2 bis 3, so dass das Rind im wesentlichen seinen Wasserbedarf durch das Trinkwasser decken muss.

Einen Hinweis darauf geben die Proben aus Rheinbach. Diese zeigen eine geringe jahreszeitliche Anreicherung in den Sommermonaten im Vergleich zu den Referenzproben aus Aachen und Düren. Ein wesentlicher Unterschied liegt in der Futterzusammensetzung, da das Futter in Rheinbach ganzjährig hohe Silageanteile enthält.

Der prozentuale Wasseranteil aus dem Trinkwasser ist daher in der Gesamtbetrachtung der Nahrung stetig höher. Entsprechend wird die Anreicherung des Gewebewassers der

Futterpflanzen stärker kompensiert, was sich in geringeren Anreicherungen der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotope im Gewebewasser der Fleischproben zeigt.

Möglicherweise tragen erhöhte Transpirationseffekte des Körpers im Sommer weiterhin zur Anreicherung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse im Gewebewasser bei. So zeigt das Transpirationswasser der menschlichen Haut Abreicherungen gegenüber dem Körperwasser von 19 ‰ [Schoeller 1986]. Ähnlich den Beobachtungen von Longinelli (siehe Kapitel 3.5) zeigte das Gewebewasser eine stetige Anreicherung gegenüber dem vorherrschenden Grundwasser, deren $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse bei $-7,3$ ‰ bis $-7,6$ ‰ liegen.

Ein ähnlicher jahreszeitlicher Effekt konnte sowohl für die untersuchten norddeutschen, als auch für die süddeutschen Fleischproben nachgewiesen werden (Abbildung 5-8).

Die D/H Isotopenverhältnisse im Gewebewasser zeigen ähnliche jahreszeitliche Anreicherungen. Die Amplitude scheint im direkten Vergleich gegenüber den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen jedoch geringer ausgeprägt zu sein.

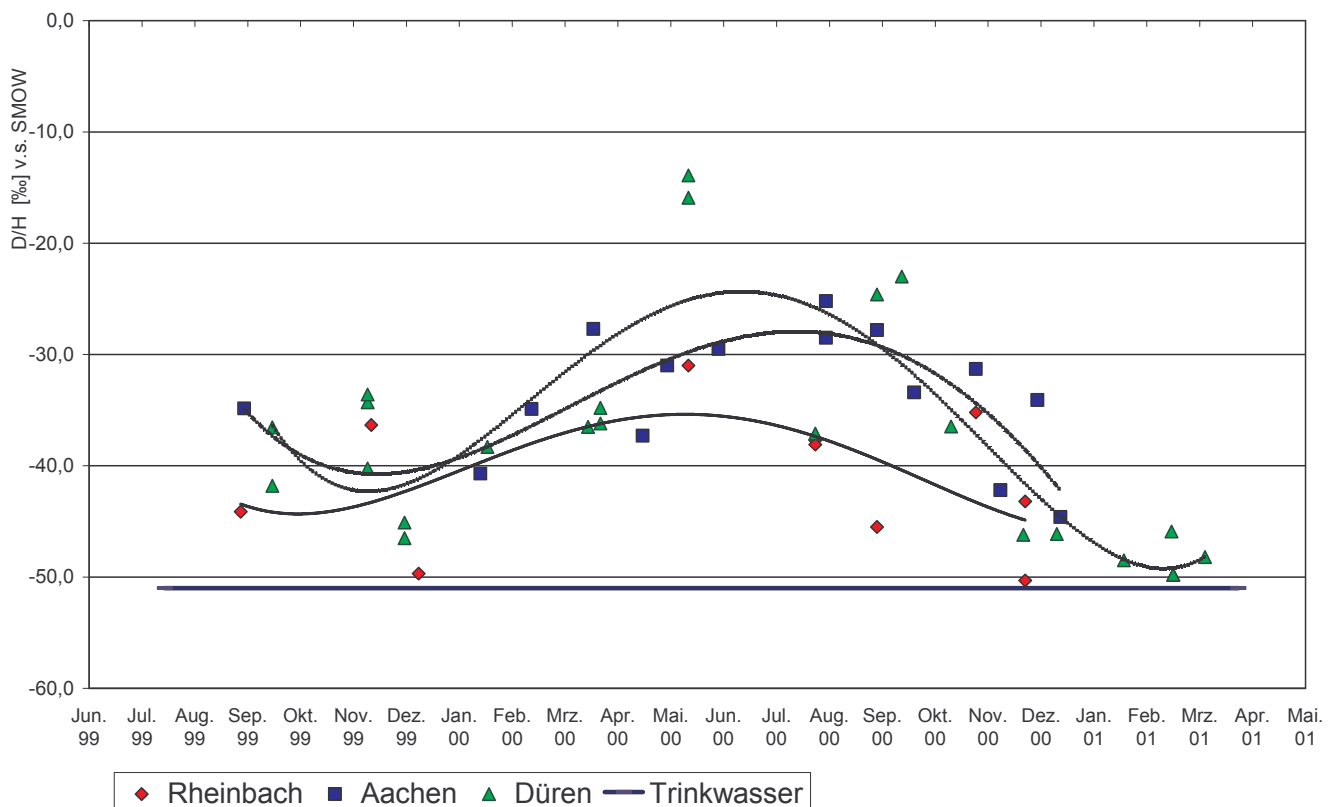


Abbildung 5-5: Jahreszeitliche Variation der D/H Isotopenwerte im Gewebewasser. Zusätzlich dargestellt ist der Graph des jahreszeitlichen Trends als Polynom 3. Grades. Der Grundwasserwert ist als untere blaue Randlinie integriert.

Aufschluss über diese hypothetische Annahme kann eine zweidimensionale Auftragung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse gegen die D/H Isotopenverhältnisse geben (Abbildung 5-6).

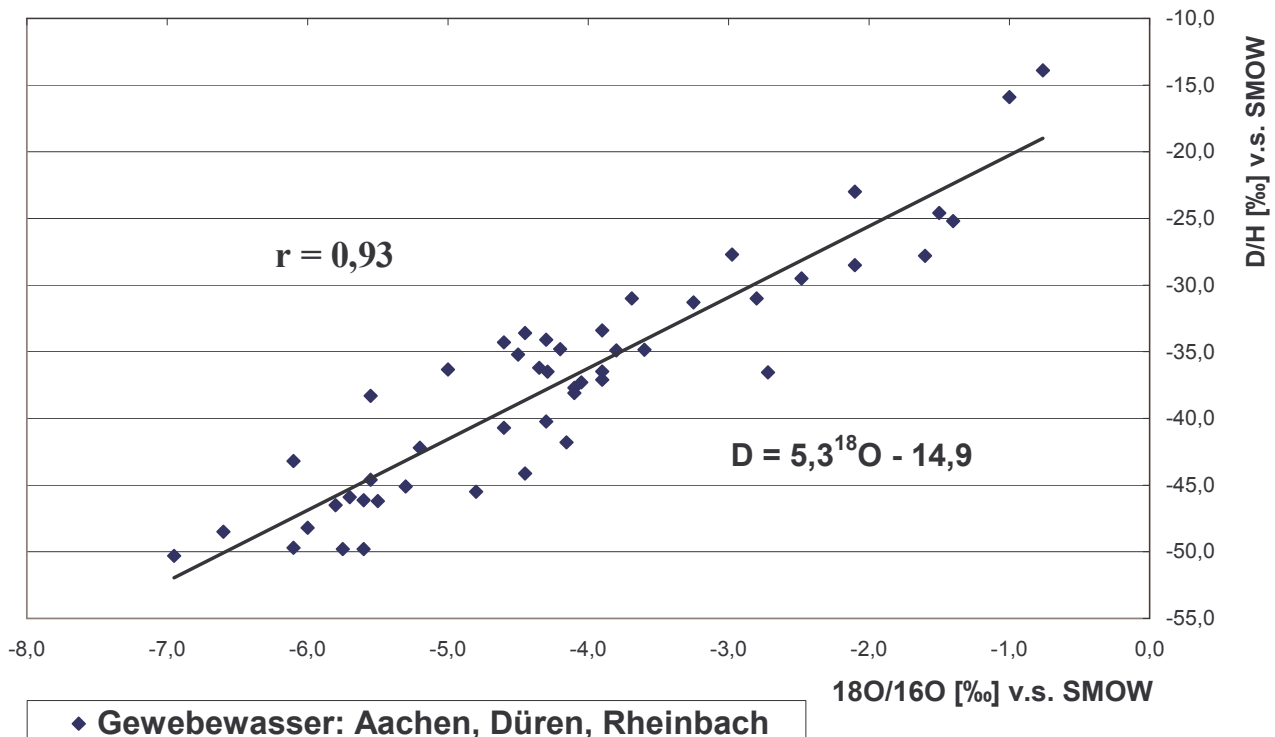


Abbildung 5-6: D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse im Gewebewasser von Proben aus Aachen, Düren und Rheinbach. Zusätzlich wird der Korrelationskoeffizient (r) und die ermittelte Korrelationsgleichung angegeben.

Die Ermittlung des Korrelationskoeffizienten aus diesem Probenkollektiv ($r = 0,93$) zeigt, dass die D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse eine sehr hohe Abhängigkeit bzw. Korrelation aufweisen. Ähnliche Korrelationskoeffizienten konnten auch bei den Proben aus Nord- und Süddeutschland bestimmt werden (Abbildung 5-7).

Wird die Geradengleichung ermittelt, so ist festzuhalten, dass sich die Steigung der Gleichung gegenüber der „*meteoric water line*“ signifikant von 8 auf 5,3 verringert hat.

Eine Erklärung dieser abgeschwächten Steigung ist durch Beobachtungen von Dunbar [Dunbar 1983] möglich, da das Gewebewasser von Trauben verschiedener klimatischer Zonen im D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnis eine andere Korrelation aufwies als die der „*meteoric water line*“. Die von Dunbar ermittelte Korrelation war gegeben durch:

$$\delta D = 3,9\delta^{18}\text{O} - 6,1.$$

Die Steigung der Gleichung hat sich demnach gegenüber der Korrelation der „*meteoric water line*“ mehr als halbiert bzw. Änderungen im D/H Isotopenverhältnis sind in Bezug auf die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse um den Faktor 2 verringert.

Im Ergebnis sind deshalb die D/H Isotopenverhältnisse in der Veränderung wesentlich konservativer.

Eine ähnliche Korrelation ist ebenfalls für das Grünfütter anzunehmen. Da dieses einen wesentlichen Anteil an der Wasserbedarfsdeckung hat, muss zwangsläufig eine Mischkorrelation aus „*meteoric water line*“ und einer „Dunbar“-Line vorliegen, d.h. die Steigung liegt zwischen dem Minima um ca. 4 ‰ und dem Maxima um ca. 8 ‰.

Ein entsprechendes Ergebnis zeigen die Korrelationen der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse im Gewebewasser von Proben aus dem Großraum Köln (Abbildung 5-6), sowie Proben aus Nord- und Süddeutschland (Abbildung 5-7).

In diesem Zusammenhang ist auffallend, dass die Steigung in Norddeutschland mit einem Wert von 4,5 ‰ wesentlich geringer ist als in Süddeutschland mit einem Wert von 5,5 ‰. Die untersuchten Proben aus dem Großraum Köln weisen dabei eine Steigung zwischen diesen beiden auf, diese tendiert aber mit einem Wert von 5,3 ‰ eher zu Süddeutschland. Weiterhin hat sich der positive Wert der Konstanten der ermittelten Geradengleichung von +10 in der „*meteoric water line*“ ins Negative verkehrt, d.h. es liegen nun Geradenkonstanten von -15 ‰ bis -22 ‰ vor.

Unter Berücksichtigung des Ansatzes, dass zwei unterschiedliche Ausgangskorrelationen (Trinkwasser / Gewebewasser der Pflanzen) maßgeblich für diese neue Mischkorrelation des Gewebewasserpools verantwortlich sind, sollten diese neuen Steigungen und Konstanten auch über einen theoretischen Ansatz beschreibbar sein.

Als Ausgangsgröße für das Gewebewasser der Pflanzen wurde eine Grünfütterprobe (Probennahme: Juni 2000, Rheinbach) mit $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen von -3,8 ‰ und D/H Isotopenverhältnissen von -42 ‰ verwendet. Mit den Mittelwerten der Isotopenverhältnisse des Trinkwassers von -7,5 ‰ in den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ bzw. -50 ‰ in den D/H Isotopenverhältnissen des Großraums Köln (Aachen, Düren, Rheinbach) wurden in 10 % Schritten theoretische Mischisotopenverhältnisse erstellt, d.h. 10 % Gewebewasser + 90 % Trinkwasser bis 90 % Gewebewasser + 10 % Trinkwasser.

Entsprechend wurden Mischisotopenverhältnisse von Nord- und Süddeutschland erstellt. Da keine Grünfütterproben aus diesen Regionen zur Verfügung standen, musste auf eine Hilfsprobe zurückgegriffen werden.

Zum einen wurden die Isotopenverhältnisse des Gewebewassers von Äpfeln (n = 11) aus dem Raum Konstanz mit $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen von -5,1 ‰ und D/H

Isotopenverhältnissen von -52‰ und zum anderen wurden die Isotopenverhältnisse des Gewebewassers von Äpfeln ($n=14$) aus dem Raum Hannover mit $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen von $-4,2\text{‰}$ und D/H Isotopenverhältnissen von -44‰ verwendet.

Die Grundwasserisotopenverhältnisse dieser Regionen liegen in den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen bei $-10,4\text{‰}$ (Konstanz) und $-8,0\text{‰}$ (Hannover) und in den D/H Isotopenverhältnissen bei -73‰ (Konstanz) und -54‰ (Hannover).

Die theoretisch ermittelten Korrelationen (Abbildung 5-8) zeigen tendenziell ähnliche Steigungen. So ist die errechnete Steigung von Süddeutschland mit $5,8\text{‰}$ ähnlich der gefundenen von $5,5\text{‰}$.

Diese theoretische Steigung ist ebenfalls größer als die theoretische aus Norddeutschland mit $5,1\text{‰}$ und dem Großraum Köln mit $4,8\text{‰}$.

Die theoretischen Geradenkonstanten zeigen im Vergleich mit den empirisch gefundenen ebenfalls die signifikant negativen Werte von ca. -22‰ .

Dieser theoretische Ansatz beschreibt sicherlich nur einen einfachen Lösungsansatz, der nicht alle Einflussmöglichkeiten widerspiegelt. So zeigen die D/H Isotopenverhältnisse der theoretischen Korrelationen erheblich negativere Isotopenverhältnisse mit einer Verschiebung von ca. -20‰ gegenüber den empirisch gefundenen D/H Isotopenverhältnissen.

Dennoch werden die gefundenen Isotopenverhältnisse im Gewebewassers tendenziell auffallend gut widerspiegelt, so dass sie als mögliche Erklärung der Isotopenverhältnisse des Gewebewassers der Rinder sicherlich anzuführen sind.

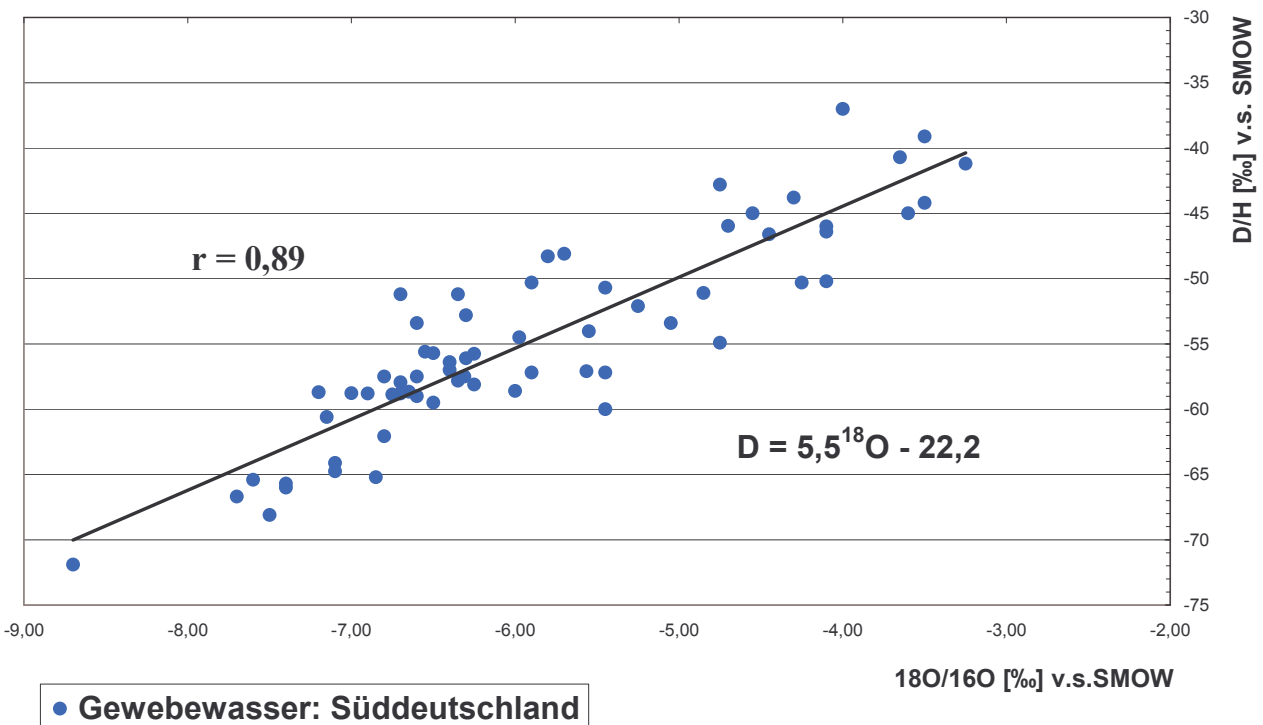
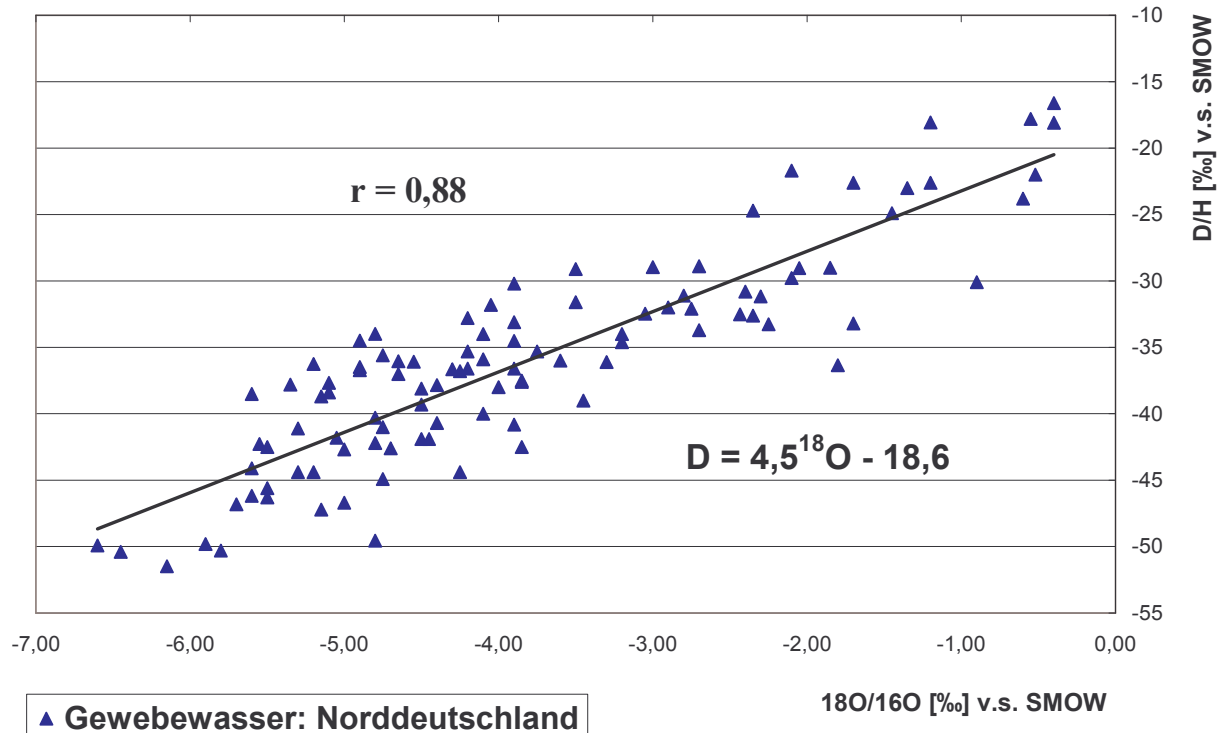


Abbildung 5-7: D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse von Proben aus Nord- und Süddeutschland. Zusätzlich wird der Korrelationskoeffizient (r) und die ermittelte Korrelationsgleichung angegeben.

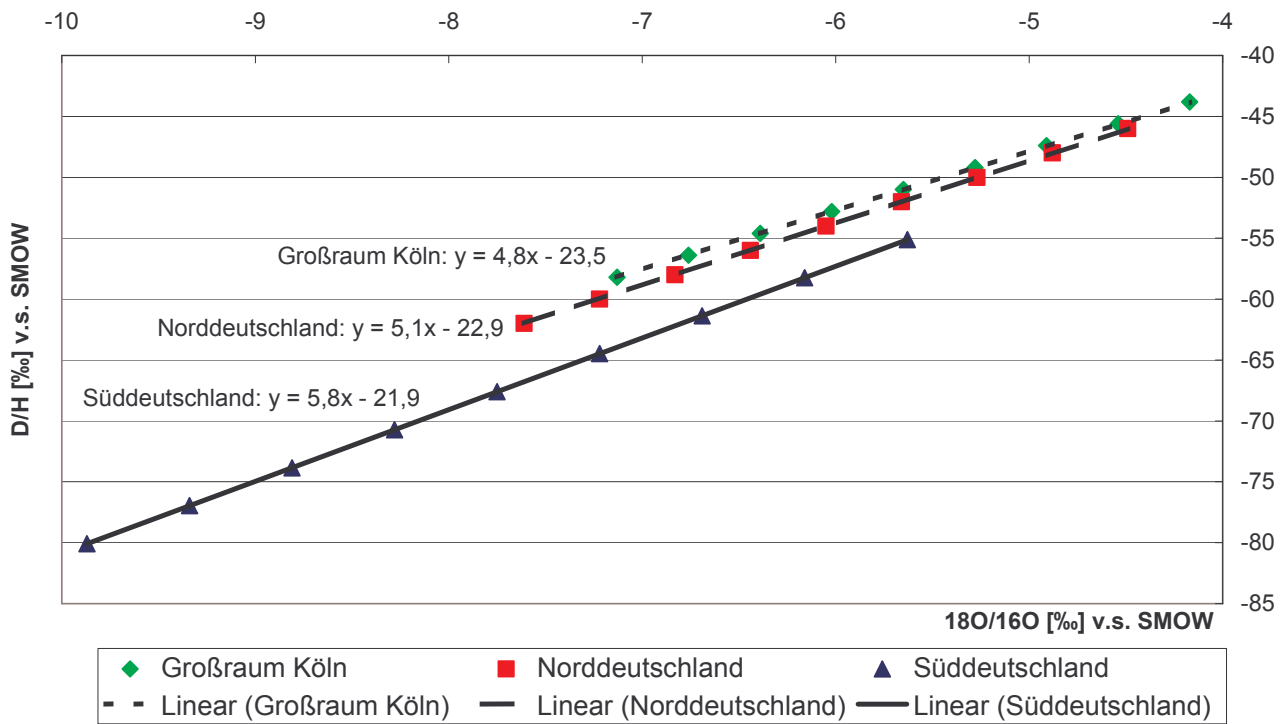


Abbildung 5-8: D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse der theoretischen Korrelationen von Proben aus Nord-, Süddeutschland und dem Großraum Köln.

5.3 Differenzierung zwischen nord- und süddeutschem Rindfleisch

Die Isotopenverhältnisse im nord- und süddeutschen Grundwasser unterscheiden sich, wie erörtert, um ca. 3 ‰ (Abbildung 3-2). Unter Anwendung der „*meteoric water line*“ entspricht dies einem Unterschied in den D/H Isotopenverhältnissen von ca. 21 ‰.

Werden diese Isotopenunterschiede der Region annähernd durch das Trinkwasser bzw. durch die Pflanze an die Tiere weitergegeben, sollte eine signifikante Trennung möglich sein. Generell ist aus den vorher erörterten Ergebnissen dabei zu berücksichtigen, dass die D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse des Wasserpools der Pflanzen nur noch einen abgepufferten regionalen Bezug aufweisen. Somit ist die hohe Diskrepanz zwischen den Regionen im Gewebewasser der Rinder bei längerfristiger Beobachtung besonders in den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen nicht wiederzufinden (Abbildung 5-9).

Dennoch zeigen die Regionen Unterschiede. Die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse in den Proben aus Norddeutschland sind im direkten Vergleich angereicherter als die Proben aus Süddeutschland. Die Abreicherung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse im Winter als auch die Anreicherung im Sommer ist in beiden Regionen gut zu erkennen. Die jahreszeitlich stärker ausgeprägten Anreicherungen im $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnis im Vergleich zum D/H sind ebenfalls abzulesen.

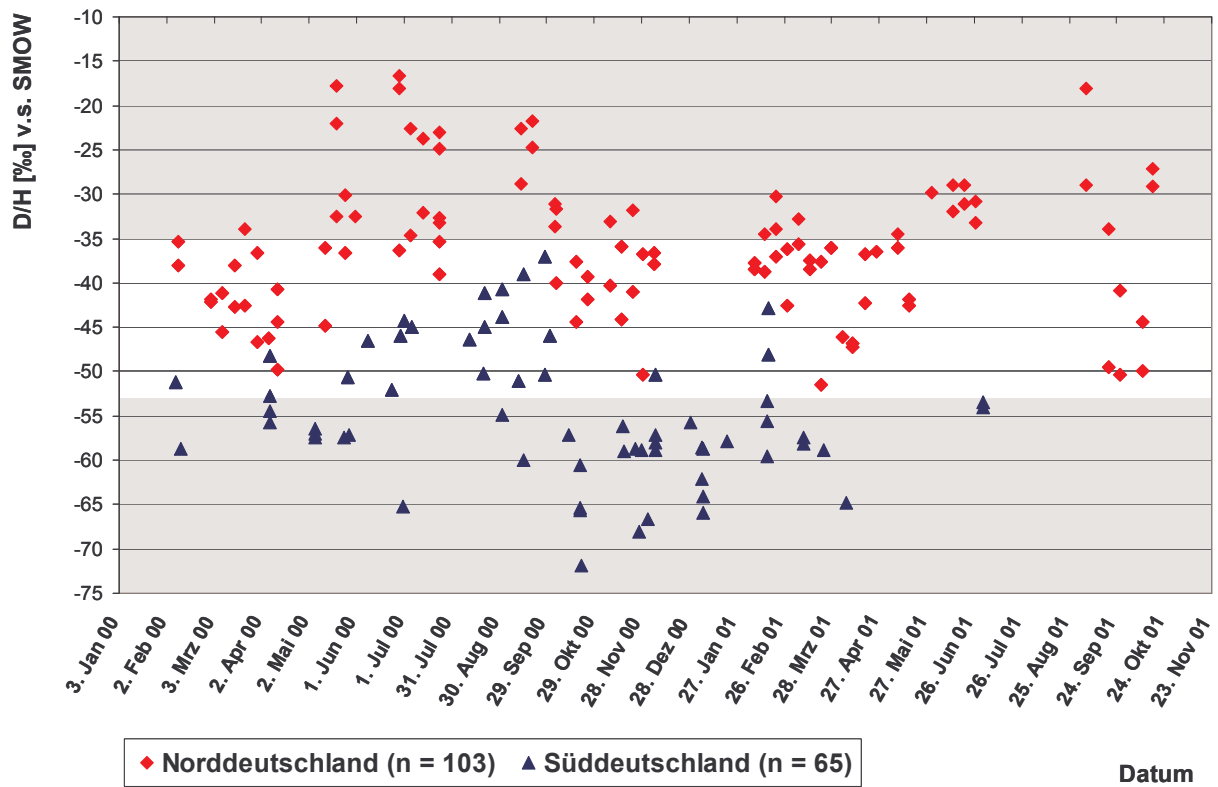
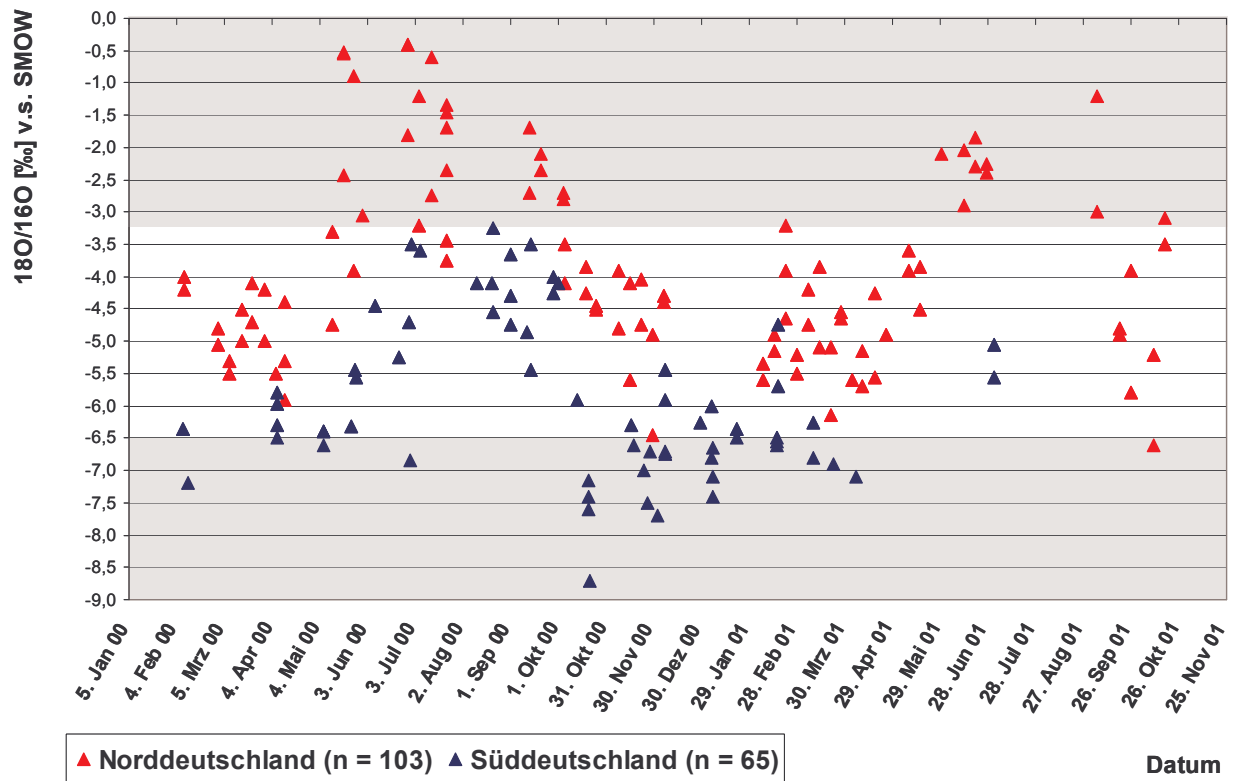


Abbildung 5-9: $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse in Rindfleischproben aus Nord- und Süddeutschland.

Werden die beiden Probenkollektive in ihrer Gesamtheit verglichen, ergibt sich, dass die Nordproben im $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnis einen Mittelwert von $-3,7\text{‰}$ und einen Median von $-4,1\text{‰}$ aufweisen (Abbildung 5-10). Die Isotopenverhältnisse des Probenkollektivs weichen damit leicht von einer Normalverteilung ab. Im Gegensatz dazu weist das Probenkollektiv aus Süddeutschland einen abgereicherten Mittelwert von $-5,9\text{‰}$ und einen Median von $-6,3\text{‰}$ auf, ebenfalls leicht abweichend von der Normalverteilung. Im summarischen Vergleich sind die Proben aus Norddeutschland damit um ca. $2,2\text{‰}$ angereicherter als die Proben aus Süddeutschland. Da die D/H Isotopenverhältnisse mit den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen korreliert sind, ergeben sich ähnliche Ergebnisse. Im Mittel und im Median zeigen die norddeutschen Proben einen D/H Isotopenwert von annähernd -36‰ . Die Isotopenverhältnisse der süddeutschen Proben sind im Mittel mit einem Isotopenwert von -55‰ und einem Median von -56‰ abgereicherter. Die Differenz zwischen den beiden Probenkollektiven liegt damit bei ca. -19‰ bis -20‰ . Die Spannweite der Proben liegt zwischen $6,2\text{‰}$ im $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ bzw. 35‰ im D/H für Norddeutschland und $5,5\text{‰}$ im $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ bzw. 35‰ im D/H für Süddeutschland. Beide Probenkollektive weisen damit eine enorme Spannweite auf, die auf die jahreszeitlichen An- bzw. Abreicherungen des Gewebewassers zurückzuführen sind. Wird der jahreszeitliche Einfluss nicht berücksichtigt, können Fehlinterpretationen entstehen. So konnten in einer halbjährigen Untersuchung des Gewebewassers von Rindfleischproben aus Paderborn, Itzehoe, Schweinfurt und Kulmbach keine signifikanten $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenunterschiede festgestellt werden [Hergerdig 2002], da der Median aus den verschiedenen Proben der Monate über die gesamte Messzeit gebildet wurde.

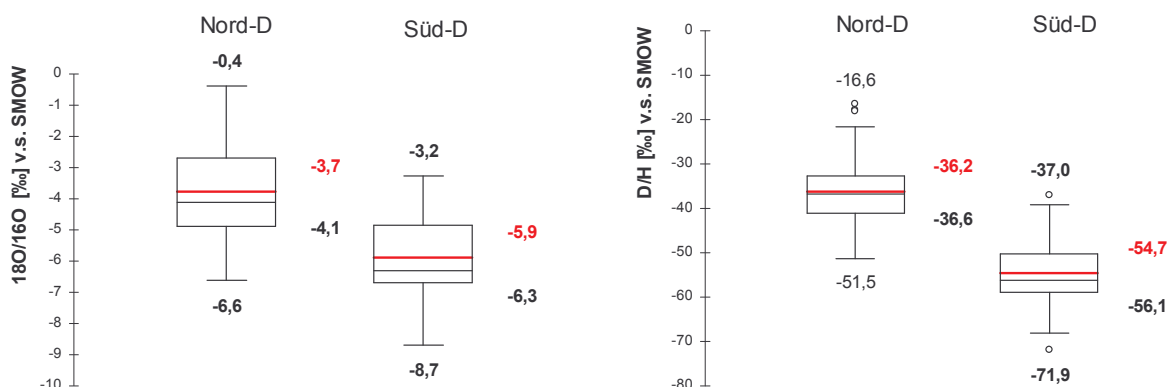


Abbildung 5-10: Boxplots der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse der Probenkollektive aus Nord- und Süddeutschland (Mittelwert: schwarz; Median: rot).

Ohne die Berücksichtigung der Jahreszeit lassen sich nur Schranken definieren, die das norddeutsche bzw. süddeutsche Probenkollektiv beschreiben, d.h. man definiert den ermittelten Maximalwert der süddeutschen Proben als untere Schranke für die norddeutschen Proben und umgekehrt den beobachteten Minimalwert der norddeutschen Proben als obere Schranke für die süddeutschen Proben. Damit sind Proben mit $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen aus Deutschland mit höheren Abreicherungen als $-6,6\text{‰}$ als süddeutsche und oberhalb von $-3,3\text{‰}$ als norddeutsche Proben zu klassifizieren. Die Schranken sind durch eine graue Unterlegung in der Abbildung gekennzeichnet (Abbildung 5-9). Damit ergibt sich, dass nur 34 % der untersuchten norddeutschen Proben bzw. 35 % der süddeutschen der jeweiligen Region sicher zuzuordnen sind. Bessere Ergebnisse werden durch die Betrachtung der D/H-Isotopenverhältnisse erzielt. Als untere Schranke für die norddeutschen Proben ist dabei -37‰ , als obere für die süddeutschen Proben -52‰ anzusetzen. Daraus ergibt sich, dass 62 % den norddeutschen und 66 % den süddeutschen Proben zugeordnet werden können. Wenn die Jahreszeit der Rinderschlachtung nicht bekannt ist, lassen sich mit den D/H Isotopenverhältnissen demnach bessere Zuordnungen erreichen. Zieht man die Zeit als weitere Variable in Betracht, so ist eine visuelle Differenzierung durch eine zweidimensionale Darstellung möglich, indem die 3 Variablen Datum, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ sowie D/H einer Datenreduktion mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse unterzogen werden (Abbildung 5-11). Zur übersichtlicheren Orientierung wurde der Datenpool vorab in zwei Teile aufgesplittet. Die erste Teilmenge enthält die Periode April bis September (Sommer), die zweite die Periode Oktober bis März (Winter). Die bestimmten Vektoren aus der dargestellten Hauptkomponentenanalyse enthalten 97 % bzw. 98 % der ursprünglichen Informationen. Eine Differenzierung der Proben ist damit weitgehend möglich, jedoch nicht vollständig. Es gibt sowohl in der Sommer- als auch in der Winterperiode Überschneidungen der Probenkollektive. Führt man mit den ermittelten Isotopenverhältnissen $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H der beiden Probenkollektive eine Diskriminanzanalyse durch, so ergeben sich von 65 untersuchten süddeutschen Proben und 103 norddeutschen 7 Fehler innerhalb des süddeutschen Kollektivs bzw. 9 Fehler innerhalb des norddeutschen (Tabelle 5-3).

	Anzahl	Vorhersage		Korrekte Diskriminierung [%]
		Süddeutschland	Norddeutschland	
Süddeutschland	65	58	7	89,2
Norddeutschland	103	9	94	91,2

Tabelle 5-3: Diskriminanzanalyse anhand der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse der Proben aus Nord- und Süddeutschland.

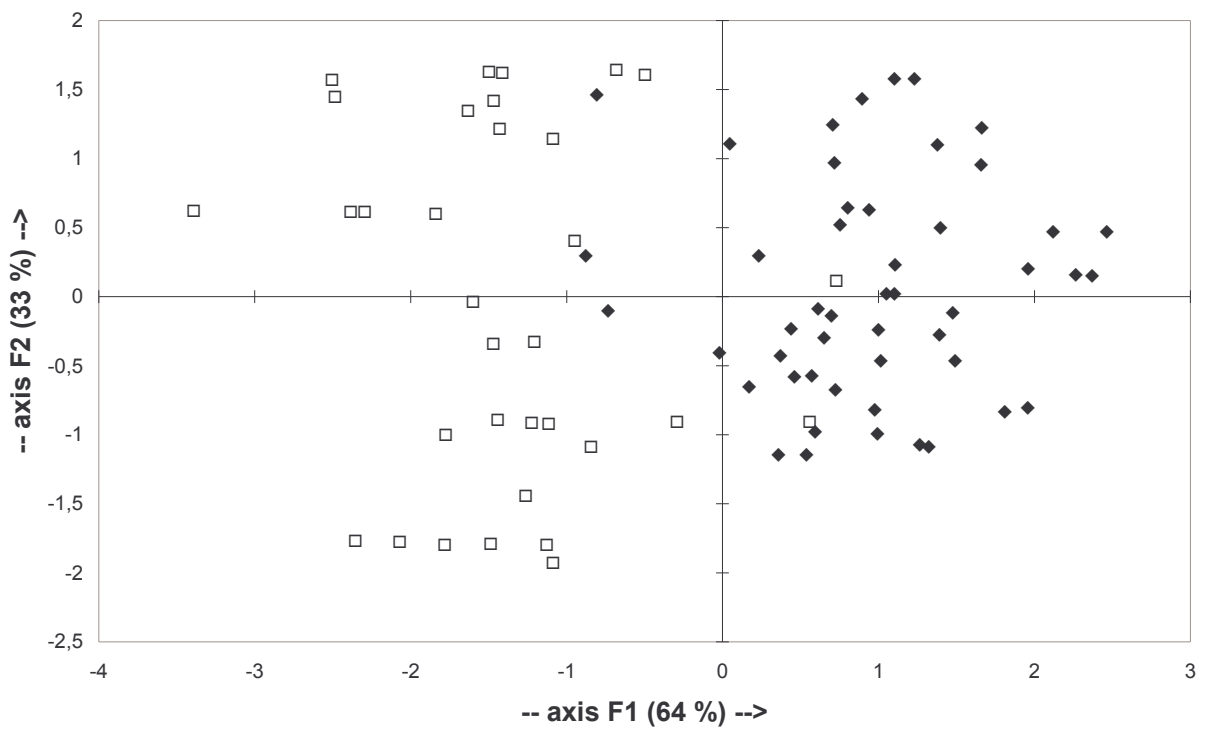
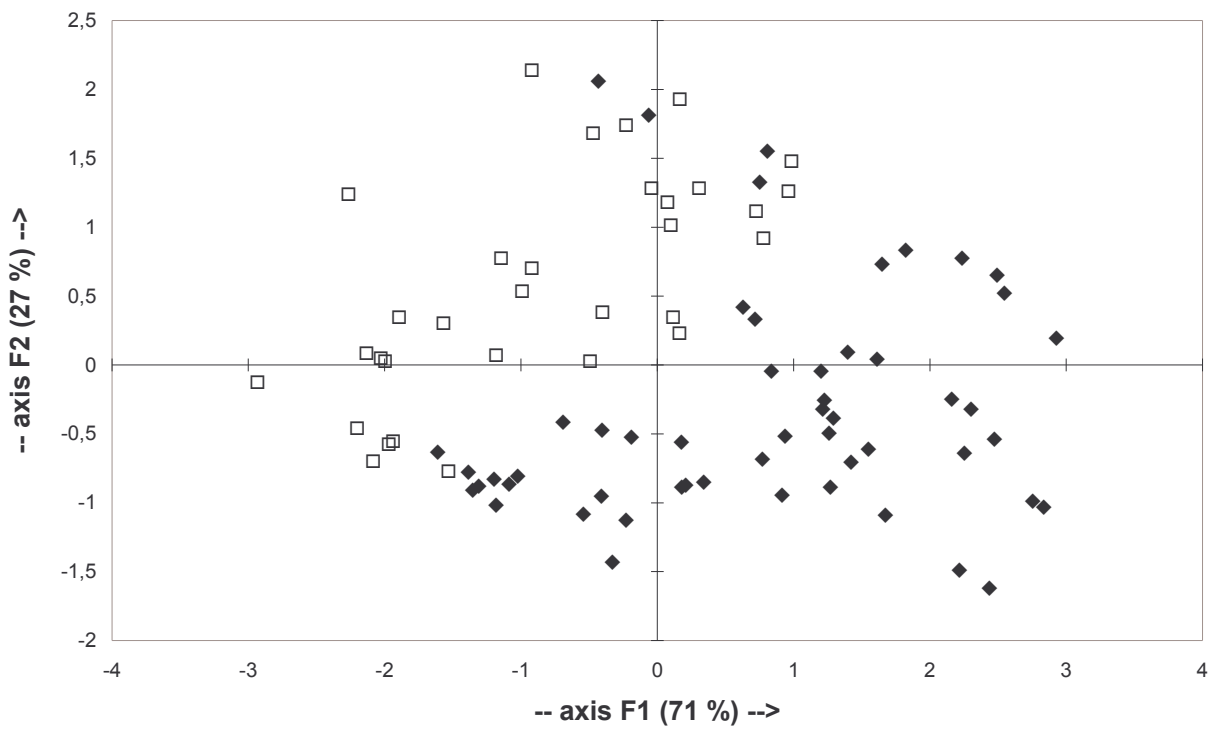


Abbildung 5-11: Hauptkomponentenanalyse der Proben aus Süddeutschland: □ und Norddeutschland: ◆
 Die neuen Variablen enthalten 98 % bzw. 97 % der ursprünglichen Information.

5.4 Differenzierung zwischen argentinischem und deutschem Rindfleisch

In einer weiterführenden Zusammenarbeit mit dem Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Krefeld wurde deklarierte außereuropäische – vornehmlich argentinische- Rindfleischware untersucht.

Der jahreszeitliche Durchschnittswert der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotope im Niederschlag aus Argentinien (IAEA 1983) wird für einige Regionen in nebenstehender Abbildung wiedergegeben (Abbildung 5-12). Tendenziell ist davon auszugehen, dass die Durchschnittswerte zwischen - 4 bis - 7 ‰ liegen. Die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse im Grundwasser von Argentinien sind mindestens um ca. + 3 ‰ angereicherter als in Deutschland. Eine Unterscheidungsmöglichkeit sollte schon auf dieser Grundlage möglich sein. Eine Überprüfung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse im Gewebewasser argentinischer Proben bestätigt diese Hypothese (Abbildung 5-13). Diese zeigen im Vergleich zu den deutschen Proben ebenfalls angereicherte $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse im Gewebewasser. Im visuellen Vergleich ist erkennbar, dass die argentinischen von den deutschen Referenzproben gut zu trennen sind, ohne dass der jahreszeitliche Effekt berücksichtigt werden muss. Dennoch zeigen zwei argentinische Referenzproben Werte, die norddeutschem Rindfleisch entsprechen.

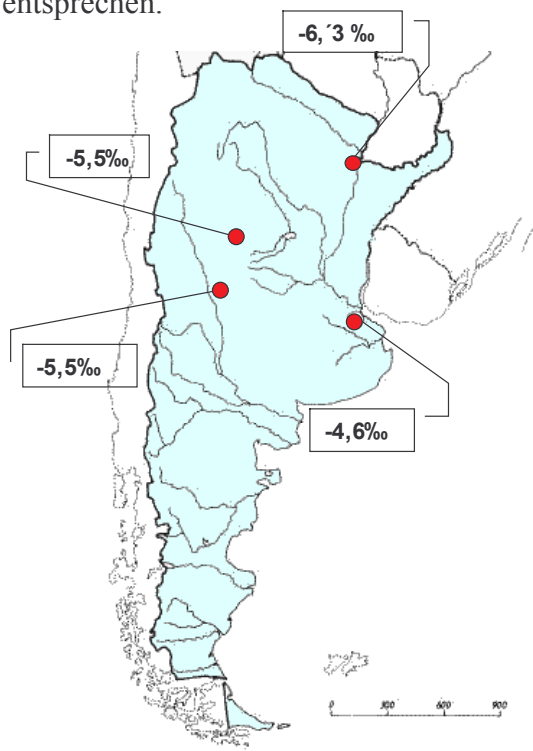


Abbildung 5-12: $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse in argentinischem Grundwasser (IAEA 1983).

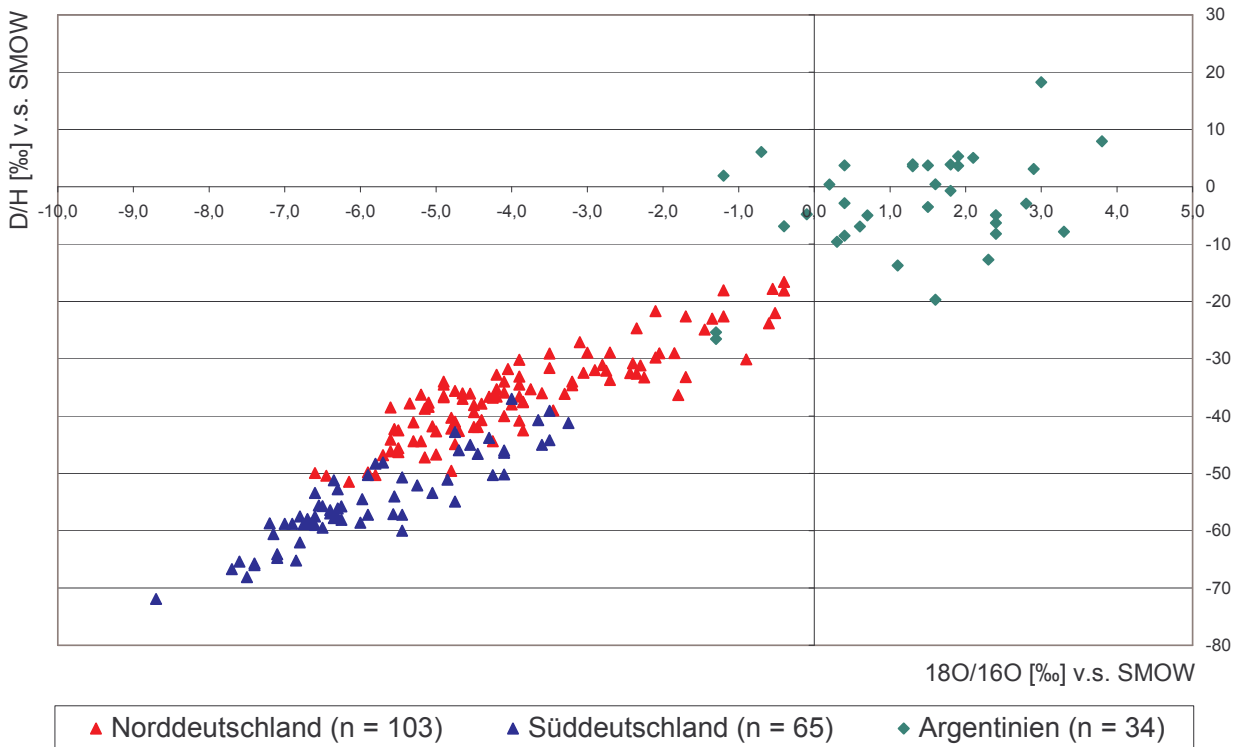


Abbildung 5-13: Vergleich der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse deutscher und argentinischer Rindfleischproben.

Da keine näheren Informationen über den Schlachtzeitpunkt und die engere lokale argentinische Herkunft des Rindfleischs verfügbar waren, ist es nicht möglich, diese Proben als signifikante Ausreißer zu beurteilen und so aus der Gesamtdiskussion zu eliminieren. Eine Box Plots Betrachtung (Abbildung 5-14) zeigt, dass diese beiden Proben nur im D/H als Ausreißer anzusehen sind. Im $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnis liegen sie im Rahmen des 1,5fachen Interquartilabstandes. Im Vergleich mit den beiden deutschen Probenkollektiven ergibt sich, dass das argentinische Probenkollektiv eine hohe Anreicherung aufweist, mit einem $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenwert von +1,5 ‰ im Median und einem Mittelwert von +1,2 ‰. Der D/H Isotopenwert zeigt einen Median von -1,8 ‰ und einen Mittelwert von -2,8 ‰.

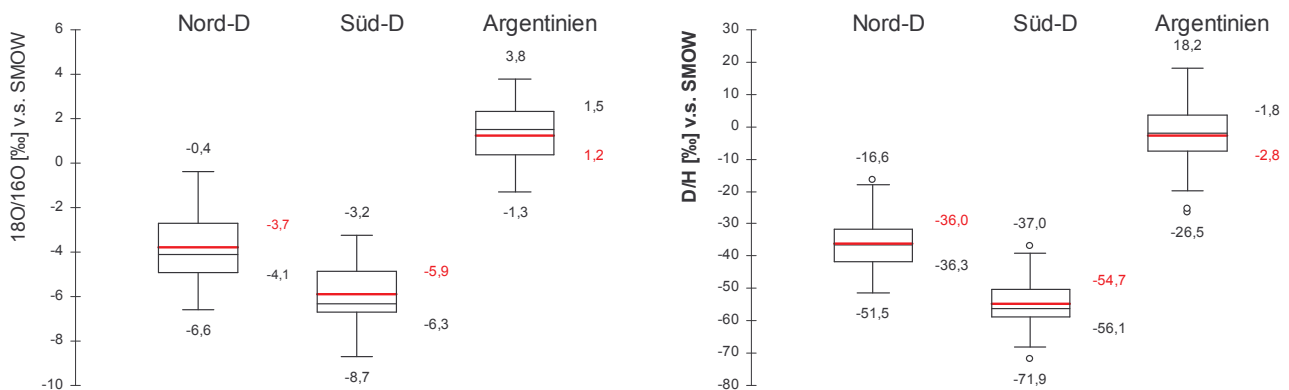


Abbildung 5-13: Boxplots des norddeutschen (n = 103) und süddeutschen (n = 65) Probenkollektivs im Vergleich zum argentinischen Probenkollektiv (n=34). Mögliche Ausreißer werden in der Abbildung als Kreise dargestellt (Mittelwert: schwarz; Median: rot).

Ähnlich dem untersuchten deutschen Probenkollektiv liegt die Spannweite der Proben bei 5,1 ‰ im $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnis und 44 ‰ im D/H Isotopenverhältnis.

Nimmt man die Box-Plots als Bewertungsgrundlage, so sind die argentinischen und süddeutschen Probenkollektive signifikant voneinander zu trennen. Im Vergleich des norddeutschen Probenkollektivs mit den argentinischen Proben gibt es leichte Überschneidungen in den Whiskers, also innerhalb des 1,5fachen Interquartilabstandes. Eine vollständige Differenzierung ist somit nicht gegeben.

Zur Überprüfung des Fehlers in der Differenzierung des argentinischen von den beiden deutschen Probenkollektiven kann eine Diskriminanzanalyse angewendet werden.

Unterteilt man zwischen dem norddeutschen und süddeutschen Probenkollektiv, so ist Süddeutschland und Argentinien zu 100 % differenzierbar (Tabelle 5-4). Das norddeutsche Probenkollektiv weist im Vergleich zu dem argentinischen sechs Zuordnungsfehler auf (zwei argentinische und vier norddeutsche Proben).

	Anzahl	Vorhersage		Korrekte Diskriminierung [%]
		Süddeutschland	Argentinien	
Süddeutschland	65	65	0	100
Argentinien	34	0	34	100
Norddeutschland	103	99	4	94,1
Argentinien	34	2	32	96,1

Tabelle 5-4: Diskriminanzanalyse anhand der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse der deutschen und argentinischen Proben.

5.5 Differenzierung zwischen Chile, Österreich und Deutschland

Im Juni 2001 wurden weitere ausländische Referenzproben aus der Region Kärnten ($n = 10$) in Österreich und aus dem Großraum Puerto Varas in Chile ($n = 10$) untersucht. Die Ermittlung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse zeigte, dass sie Isotopenwerte aufwiesen, die ohne Berücksichtigung der Zeit im Mittel den deutschen Referenzwerten zuzuordnen sind (Abbildung 5-15).

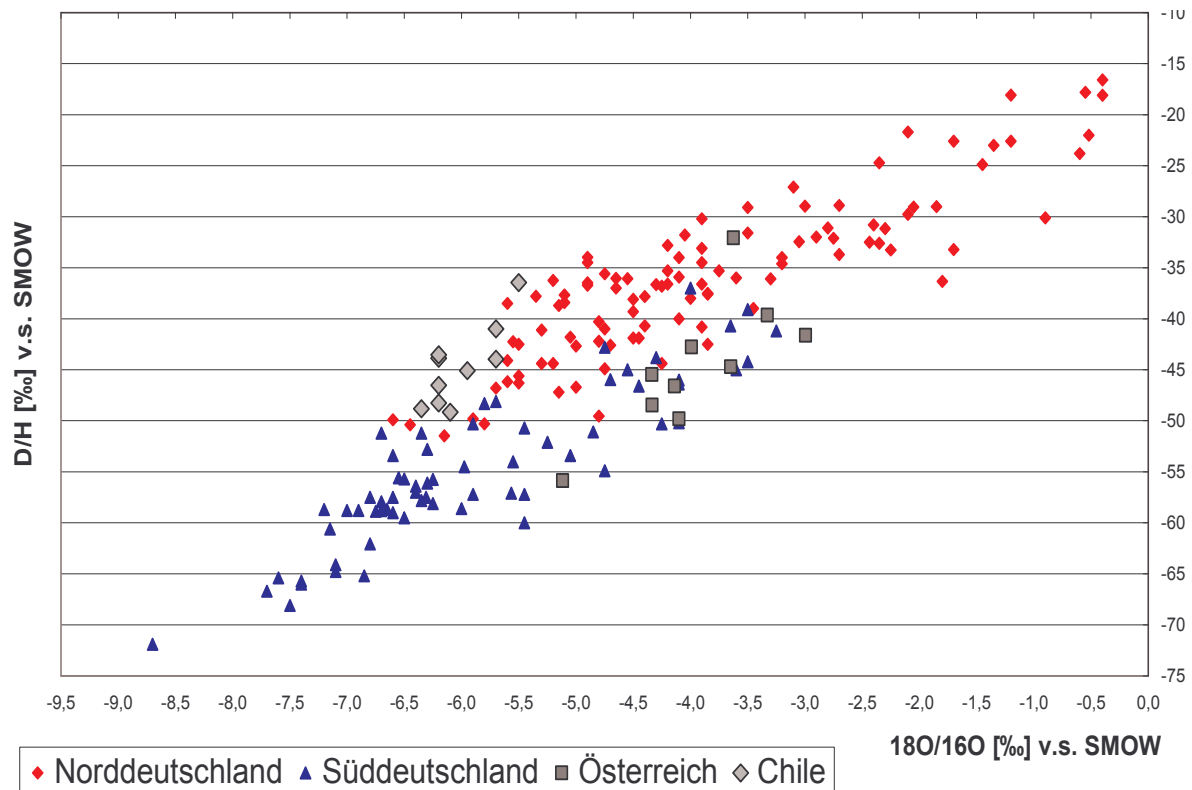


Abbildung 5-15: $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse von Deutschland, Chile und Österreich im Vergleich.

Danach ist eine Differenzierung deutscher Referenzproben von chilenischen und österreichischen Fleischproben nicht möglich. Unterscheidet man die Proben jedoch unter Berücksichtigung des Zeitpunktes der Schlachtung, ergeben sich dennoch Differenzierungsmöglichkeiten. In die Betrachtung wurde deshalb eine Hauptkomponentenanalyse mit deutschen Referenzproben aus dem Monat Juni und den umgebenden Monaten Mai und Juli einbezogen (Abbildung 5-16). Aus der Abbildung 5-16 lässt sich entnehmen, dass zwischen den süddeutschen Referenzproben und den Proben aus Österreich und Chile keinerlei Differenzierungsmöglichkeiten bestehen. Dagegen ist das norddeutsche Probenkollektiv unterscheidbar.

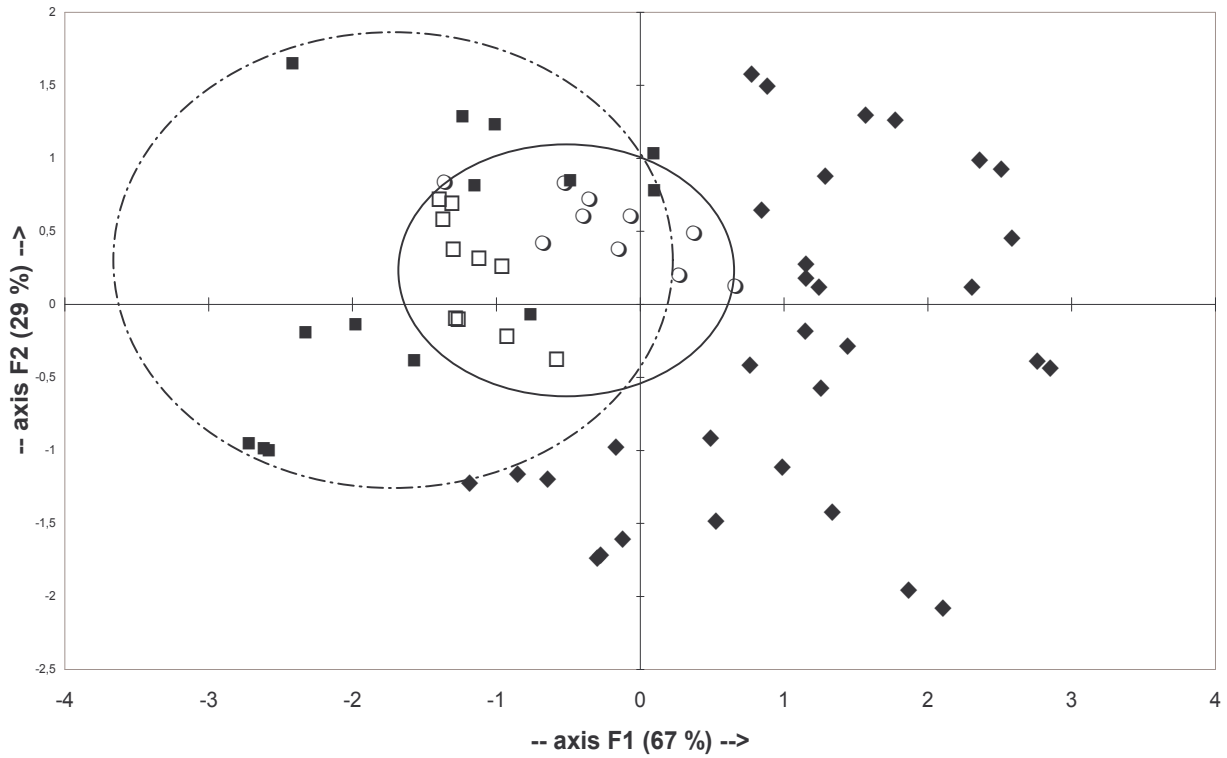


Abbildung 5-16: Hauptkomponentenanalyse der Proben aus Süddeutschland: ■, Norddeutschland: ◆, Chile: ○ und Österreich: □.

Die Diskriminanzanalyse ergibt, dass die chilenischen Proben zu 100 % von den norddeutschen Referenzproben zu differenzieren sind. Innerhalb des deutschen Probenkollektivs besteht ein Zuordnungsfehler, womit die Diskriminierung 96,8 % beträgt. Der Vergleich der Referenzproben aus Norddeutschland mit denen aus Österreich weist dagegen sechs Zuordnungsfehler auf (Tabelle 5-5).

	Anzahl	Vorhersage			Korrekte Diskriminierung [%]
		Norddeutschland	Chile	Österreich	
Norddeutschland	32	26	1	5	81,3
Chile	10	0	10	0	100
Österreich	10	1	0	9	90

Tabelle 5-5 Diskriminanzanalyse der norddeutschen, chilenischen und österreichischen Probenkollektive.

Ohne die engere zeitliche und geographische Aufteilung (Unterscheidung zwischen Nord- und Süddeutschland) ist eine Differenzierung der chilenischen und österreichischen Referenzproben nicht möglich. So ergibt der direkte Vergleich des gesamten deutschen Probenkollektivs einen erheblichen Fehler in der Zuordnung deutscher Proben (Tabelle 5-6). Demnach würden die chilenischen und österreichischen Proben zwar annähernd richtig abgegrenzt, jedoch weisen die Zuordnungen des deutschen Probenkollektivs eine enorme Fehlerquote auf.

	Anzahl	Vorhersage			Korrekte Diskriminierung [%]
		Deutschland	Chile	Österreich	
Deutschland	168	90	31	47	53,5
Chile	10	0	10	0	100
Österreich	10	1	0	9	90

Tabelle 5-6 Diskriminanzanalyse des deutschen, chilenischen und österreichischen Probenkollektivs.

5.6 Das 5 ‰ Konzept

Leitet man aus den dargelegten $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Grundwasserwerten von Nord- und Süddeutschland eine mögliche Differenzierungsgüte ab, so ist festzustellen, dass eine Differenz von ca. 3 ‰ zwar eine Differenzierung unter Berücksichtigung der Jahreszeit annähernd erlaubt, aber erst bei einer Isotopendifferenz von 5 ‰, die mindestens zwischen Argentinien und Süddeutschland anzunehmen ist, eine signifikante Differenzierung auch ohne Kenntnis der Jahreszeit möglich ist (Kapitel 6.4).

Unter Verwendung der IAEA-Reports 226 und 264 [IAEA 226, IAEA 264] und Grundwassermessdaten der Agroisolab GmbH ergeben sich aus der unteren Tabelle (Tabelle 5-7) zu entnehmende signifikante Differenzierungsmöglichkeiten deutscher Rindfleischproben von ausländischen Proben. Die Möglichkeit zur Unterscheidung ist nicht länderspezifisch zu betrachten, sondern bezieht sich auf die Region der Messstation der vorliegenden IAEA-Daten, bzw. der eigenvermessenen Wasserproben (Agroisolab GmbH). Als „norddeutsch“ wird dabei die geographische Lage oberhalb des 51° Breitengrades angenommen, da hier die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse des Grundwassers tendenziell angereichertere Werte als -8 ‰ aufweisen. Als „süddeutsch“ wird die geographische Lage unterhalb des 49° Breitengrades angenommen, da hier die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse des Grundwassers tendenziell unterhalb von -10 ‰ liegen. Damit ergeben sich die in der folgenden Tabelle (Tabelle 5-7) dargestellten, aus den Grundwasserdaten abgeleiteten theoretischen Differenzierungsmöglichkeiten:

Land	Ort	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ [‰] v.s. SMOW	Differenzierungsmöglichkeit	
			Norddeutschland	Süddeutschland
Portugal	Faro	-4,5		X
Türkei	Antalya	-4,8		X
Schweiz	Meiringen	-12,0	X	
Brasilien	Manaus	-2,7	X	X
Neuseeland	Kaitaia	-4,1		X
Russland	Moskau	-12,0	X	
Kanada	Vancouver	-12,1	X	
Irland	Belfast	-6,4		X
Mexiko	Mérida	-3,8	X	X
USA	Washington	-6,7		X
USA	Salt Lake City	-16,2	X	X
Zypern	Limassol	-3,1	X	X

Tabelle 5-7: Theoretische Differenzierungsmöglichkeit anhand der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse.

5.7 Isotope $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ als Charakteristika des Ortes

Die überregionale geographische Differenzierung ist mit den Isotopen $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ bzw. D/H zwar möglich, aber eine nähere lokale Unterscheidung kann mit diesen beiden Isotopen nicht erfolgen, da sich diese Isotopenverhältnisse nur großräumig verändern (Abbildung 3-2).

Als weitergehende zusätzliche Differenzierungsmöglichkeit können die stabilen Isotope des Stickstoffs und des Schwefels angewendet werden. Diese beiden Isotope spiegeln die spezifischen Bedingungen des Bodens wider, der über die Pflanze an das Rind weitergegeben wird. Sofern das Futter der Rinder aus dem gleichen engen lokalen Bereich stammt wie das Schlachtrind, ist mit Hilfe dieser Isotope eine engere geographische Einengung denkbar. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden über mehr als 18 Monate Fleischproben von den drei landwirtschaftlichen Betrieben aus Düren, Rheinbach und Aachen untersucht. Die Höfe liegen in einem Radius von ca. 50 km (Abbildung 4-1).

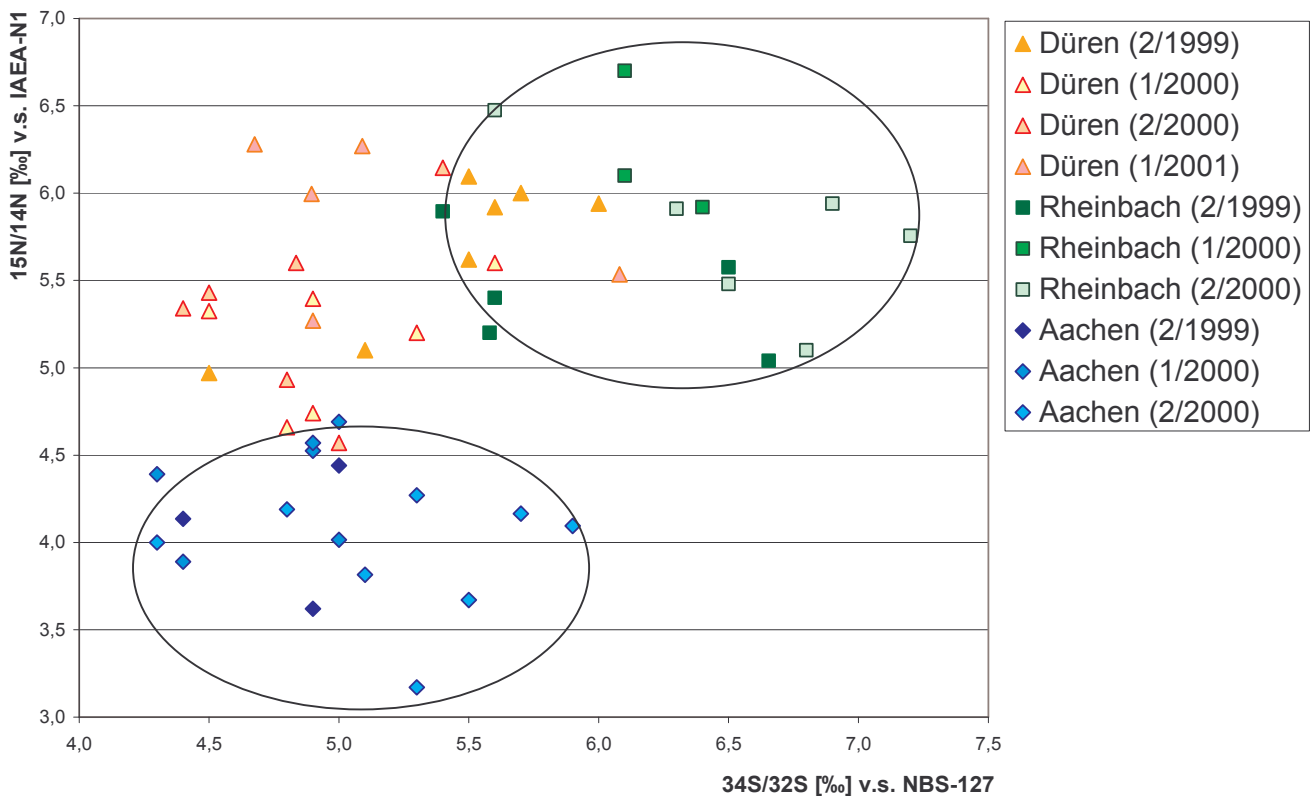


Abbildung 5-17: Differenzierung von Rindfleischproben aus Aachen, Düren und Rheinbach mit Hilfe der stabilen Isotope des Stickstoffs und Schwefels. Zur Darstellung der unterschiedlichen zeitlichen Probenziehung wurden die Proben in Halbjahresintervalle aufgeteilt. 2/1999 ist damit das 2. Halbjahr des Jahres 1999. Jedes Halbjahr erhält schließlich eine Abstufung der jeweiligen Grundfarbe.

Im Ergebnis sind langzeitliche (innerhalb von 18 Monaten) Differenzmöglichkeiten gegeben (Abbildung 5-17). Das Probenkollektiv aus Aachen ist im Vergleich zum Probenkollektiv aus Rheinbach gut zu differenzieren, es weist sowohl im $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ als auch im $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnis abgereicherte Werte auf. Die Proben aus Düren bilden Schnittmengen mit den Proben aus Aachen und auch Rheinbach, so dass eine vollständige Differenzierung nicht gegeben ist. In der Tendenz haben die Proben aus Düren im Vergleich zu dem Probenkollektiv aus Rheinbach jedoch abgereicherte Isotopenverhältnisse im Schwefel und verglichen mit dem Probenkollektiv aus Aachen angereicherte Isotopenverhältnisse im Stickstoff.

Innerhalb des achtzehnmonatigen Intervalls der Probenziehung ist in den Isotopenverhältnissen der Rindfleischproben keine zeitliche Tendenz bzw. starke Veränderung zu erkennen gewesen. Trotz der Schwankungen zeigt sich, dass die vom Ort vorgegebenen Isotopenverhältnisse der Nahrung im Fleisch wiederzufinden sind.

Verwendet man zur Differenzierung die Diskriminanzanalyse, so ergibt sich, dass das Probenkollektiv aus Aachen im Vergleich zu dem Probenkollektiv aus Rheinbach keine Zuordnungsfehler aufweist (Tabelle 5-8). Dagegen zeigen die Probenkollektive aus Düren und Rheinbach insgesamt sechs Zuordnungsfehler. In der Summe lässt sich dieses Probenkollektiv damit nur zu 84 % differenzieren. Der Vergleich von Düren und Aachen erbringt ebenfalls drei Zuordnungsfehler, so dass die Differenzierung beider Probenkollektive bei 93 % liegt.

Die Verwendung der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse ist damit geeignet, die Rindfleischproben aus Rheinbach und Düren signifikant zu unterscheiden und kann somit als kleinräumige Differenzierungsmethode genutzt werden.

	Anzahl	Vorhersage			Korrekte Diskriminierung [%]
		Düren	Rheinbach	Aachen	
Düren	24	18	3	3	75
Rheinbach	14	3	11	0	78,6
Aachen	17	0	0	17	100

Tabelle 5-8 Diskriminanzanalyse der Probenkollektive aus Aachen, Düren und Rheinbach.

In einer fortführenden Untersuchung wurden über einen Zeitraum von 18 Monaten Proben von 11 verschiedenen landwirtschaftlichen Ökobetrieben aus Norddeutschland analysiert (Abbildung 5-18). Die Anzahl der Einzelproben von den einzelnen Biohöfen lag zwischen 5 bis 13.

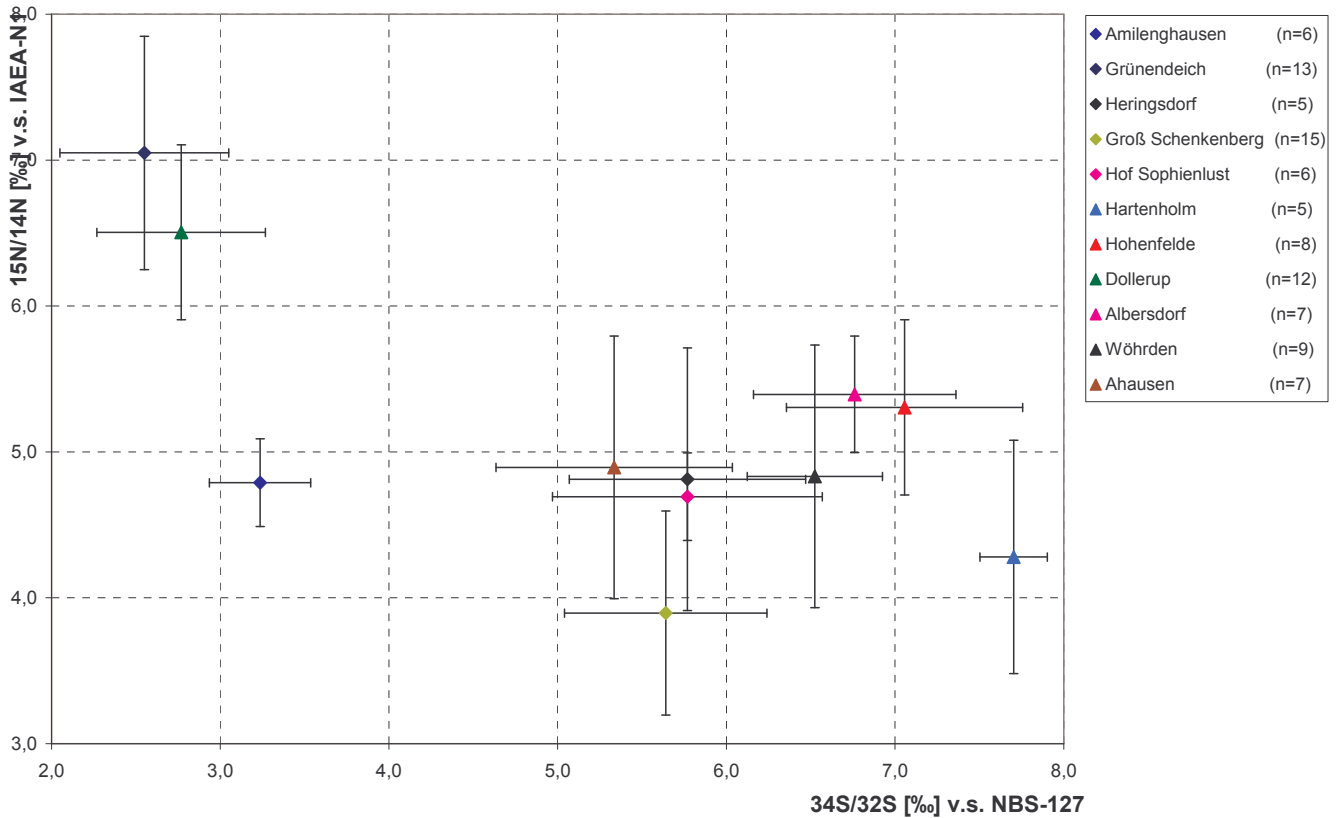


Abbildung 5-18: Vergleich von verschiedenen Probenkollektiven aus Norddeutschland. Dargestellt werden die Mittelwerte der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse mit den zugehörigen Standardabweichungen. Zu den jeweiligen ökologischen Agrarbetrieben werden in Klammern die Anzahl der untersuchten Rindfleischproben angegeben.

Ähnlich der Differenzierung der Proben aus Aachen, Düren und Rheinbach sind die ortsspezifischen Isotopenverhältnisse der Nahrung auch in den norddeutschen Rindfleischproben erkennbar. Bedenkt man den langen Zeitraum der Beprobung, so weisen die Referenzproben der einzelnen Biobetriebe eine verhältnismäßig geringe Varianz auf. So weisen die Probenkollektive in den $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen eine Standardabweichung von 0,6 ‰ und in den $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnissen eine Standardabweichung von 0,5 ‰ auf. Die erhaltenen Probenkollektive der Biohöfe zeigen in den Mittelwerten des Stickstoffs ein Minimum von 3,9 ‰ und ein Maximum von 7,0 ‰. Die Spannweite der Probenkollektive im Schwefelisotop ist im Vergleich größer. Es wurden Minimalwerte im Schwefel von 2,5 ‰ und Maximalwerte von 7,7 ‰ bestimmt. Die ermittelten Spannweiten deuten schon darauf

hin, dass die Isotopenverhältnisse des Stickstoffs und Schwefels eine Möglichkeit zur Unterscheidung bieten.

So zeigen die Probenkollektive aus Grünendeich und Dollerup in beiden Isotopen signifikante Unterschiede zu fast allen anderen Probenkollektiven. Sie weisen im Vergleich angereicherte Stickstoff- und abgereicherte Schwefelisotopenverhältnisse auf. Das Probenkollektiv aus Amelinghausen bietet durch seine abgereicherten Schwefelisotopenverhältnisse Unterscheidungsmöglichkeiten von den anderen Probenkollektiven. Es steht im Gegensatz zum Probenkollektiv aus Hartenholm, das auffällig angereicherte Schwefelisotopenverhältnisse aufweist und dadurch Differenzierungsmöglichkeiten zu den übrigen Probenkollektiven bietet.

Die ähnlichen Isotopenverhältnisse der Proben aus Dollerup und Grünendeich können zu der Vermutung führen, dass sie aus benachbarten Regionen mit gleicher Isotopentendenz im Schwefel und Stickstoff stammen. Dazu wird in der Abbildung 5-19 die geographische Lage der Biobetriebe skizziert.

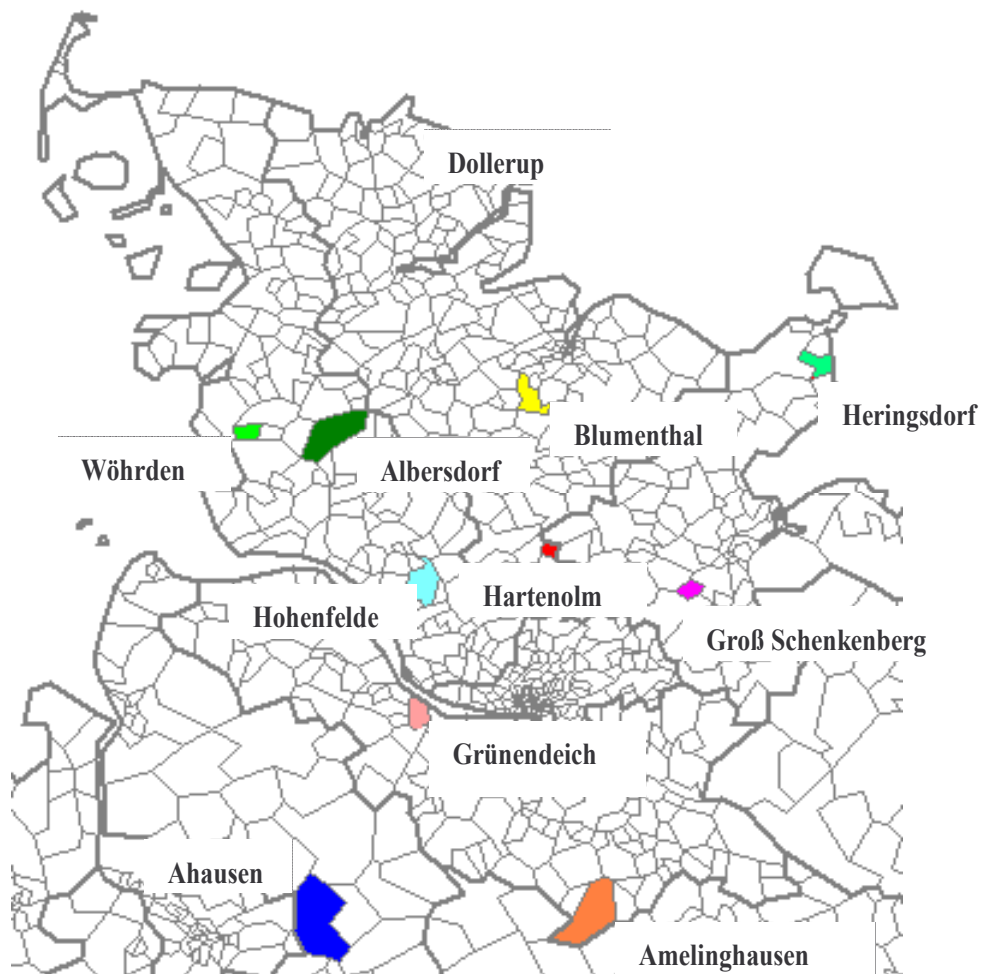


Abbildung 5-19: Geographische Herkunft der Probenlieferanten aus Norddeutschland.

Die beprobten Betriebe sind in Schleswig-Holstein und Niedersachsen angesiedelt. Deutlich erkennbar ist, dass die beiden Probenkollektive aus Grünendeich und Dollerup aus unterschiedlichen, nicht benachbarten Regionen stammen. Eine regionale Tendenz der Stickstoff- und Schwefelisotopenverhältnisse kann auch für die übrigen Proben nicht gefunden werden (Abbildung 5-20 a, b). Die Isotopenverhältnisse der untersuchten Proben bestätigen eher die Annahme, dass die Stickstoff- und Schwefelisotopenverhältnisse nur einen engen lokalen Bezug haben.

Auffallend ist jedoch, dass die Hauptmenge der Proben in der Abbildung 5-18 zwischen den $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen von 4 ‰ bis 6 ‰ und zwischen den $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnissen von 5 ‰ bis 7 ‰ liegen. Es sind im Mittel auch bei diesen Probenkollektiven Unterscheidungsmöglichkeiten vorhanden. Die Unterschiede sind jedoch unter Berücksichtigung der Standardabweichung nicht statistisch signifikant.

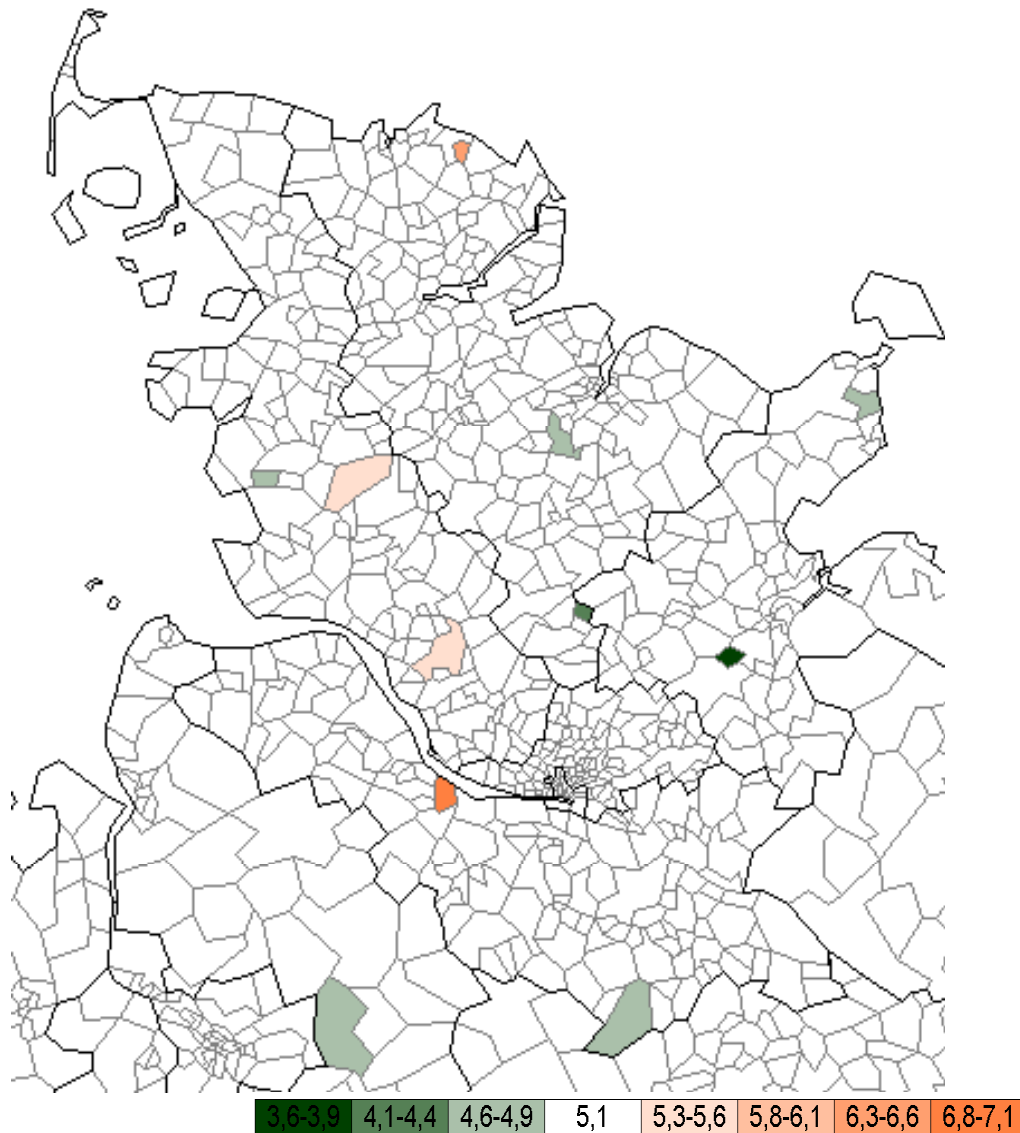


Abbildung 5-20a: Mittelwerte der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse [‰] der verschiedenen Fleischproben.

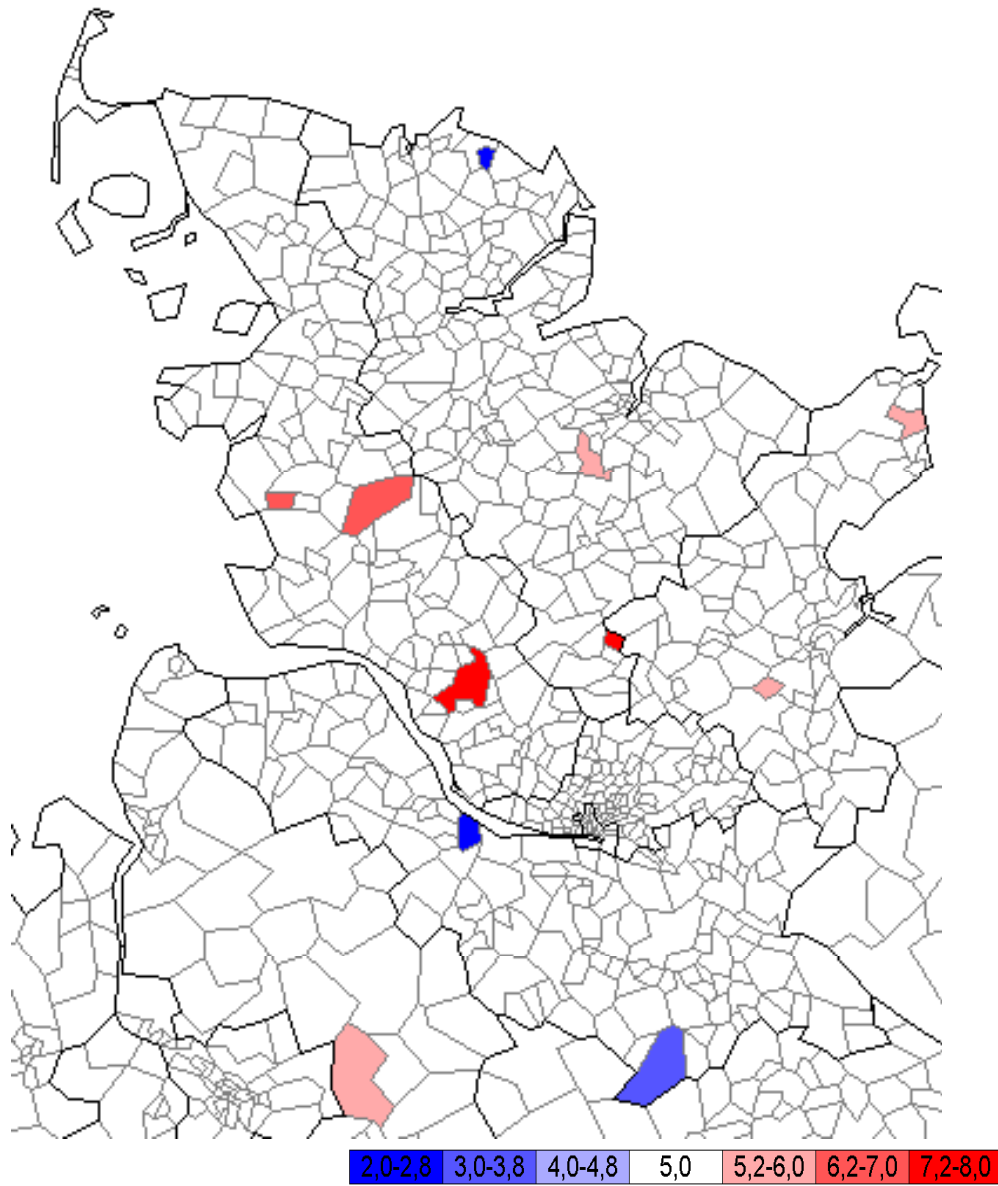


Abbildung 5-20b: Mittelwerte der $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse [%] der verschiedenen Fleischproben.

Es stellt sich die Frage, ob diese Häufigkeitsverteilung für Stickstoff und Schwefel auf eine Vielzahl von Biobetrieben aus Deutschland übertragbar ist. Deshalb wurde eine Häufigkeitsverteilung von Referenzproben aller Probenlieferanten aus Deutschland erstellt (siehe Abbildung 4-1 und 4-2). Vielfach stand von einzelnen Lieferanten eine größere Anzahl von Proben zur Verfügung. So besteht das Probenkollektiv aus Düren aus 22 Referenzproben. Damit diese Probenkollektive keine Verzerrung der Häufigkeitsverteilung ergeben, wurden von Biobetrieben mit mehr als einer Probe nur die Minimal- und Maximal-Isotopenwerte von Schwefel und Stickstoff übernommen. Insgesamt standen damit 51 Biobetriebe mit 83 Proben zur Verfügung. In der Betrachtung der Häufigkeitsverteilung der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotope ergibt sich, dass die Spannweite der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse einen Rahmen von 5,1 ‰ umfasst, mit einem Minimalwert von 3,1 ‰ und einem Maximalwert von 8,1 ‰ (Abbildung 5-21).

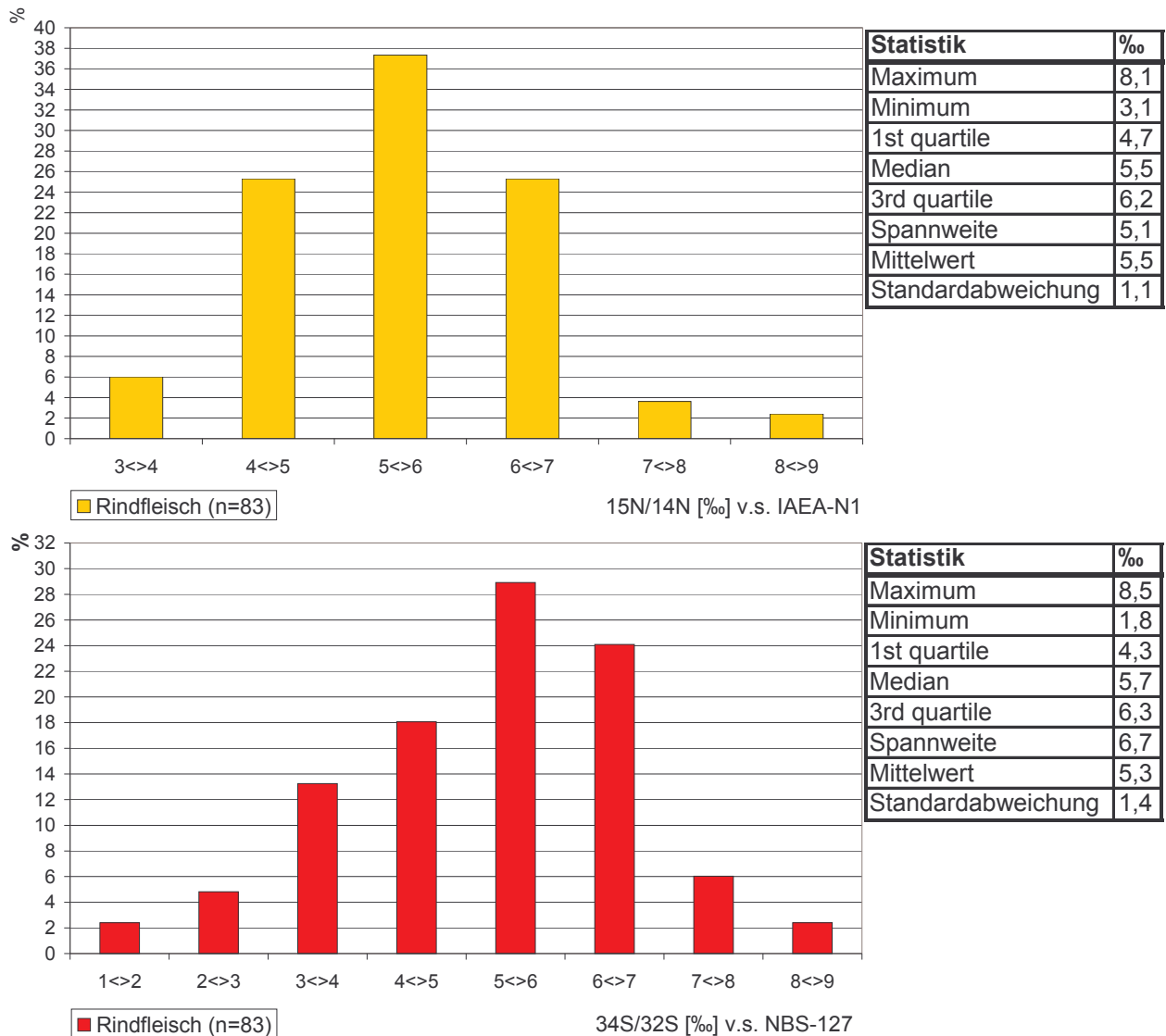


Abbildung 5-21: Häufigkeitsverteilung der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ in Rindfleischproben von verschiedenen Biohöfen.

Der Mittelwert der untersuchten Rindfleischproben weist ein $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnis von 5,5 ‰ auf. Er ist identisch mit dem Median, so dass von keiner Schiefe in der Häufigkeitsverteilung ausgegangen werden kann. Mehr als 88 % der untersuchten Rindfleischproben zeigen $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse, die zwischen 4 ‰ und 7 ‰ liegen. Wird ein 2σ Kriterium als Beschreibung des Probenkollektivs angewendet, so ergibt sich mit einer Standardabweichung von 1,1 ‰, dass 95 % der Proben zwischen den $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen von 3,3 ‰ und 7,7 ‰ wiederzufinden sind.

Die $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse deuten im Histogramm schon eine leichte Schiefe an. Dies manifestiert sich ebenfalls im Vergleich des Mittelwertes von 5,3 ‰ zum Median von 5,7 ‰. Die Spannweite der untersuchten Rindfleischproben umfasst einen Wert von 6,7 ‰ mit einem Minimalwert von 1,8 ‰ und einem Maximalwert von 8,5 ‰. Sie ist im direkten Vergleich damit um 1,6 ‰ größer als die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse der untersuchten Rindfleischproben. Die ermittelte Standardabweichung ist mit 1,4 ‰ dementsprechend etwas höher. Annähernd 84 % der untersuchten Proben zeigen $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse zwischen 3 ‰ und 7 ‰. Legt man ein 2σ Kriterium als Beschreibung der Varianz des Probenkollektivs an, so ergibt sich, dass 95 % der Proben zwischen 2,5 ‰ und 8,1 ‰ wiederzufinden sind.

Die Untersuchung der Proben wirft die Frage auf, ob diese gefundenen Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen für das gesamte deutsche Biorindfleisch repräsentativ sind. Die abschließende Klärung muss derzeit noch offen bleiben, da kein Probenkollektiv aus allen Region Deutschlands betrachtet wurde bzw. zur Verfügung stand. Bedenkt man allerdings, dass eine großräumige Betrachtung (Nord- und Süddeutschland) mit Proben aus unterschiedlichsten lokalen Regionen vorlag, ist zu vermuten, dass die gefundenen Mittelwerte und Varianzen eine Beschreibung der Fläche Deutschlands zulassen. Unter dieser Annahme liegt weiterführend die Frage nahe, ob diese Werte als Differenzierungsmöglichkeit von deutschem und internationalem Rindfleisch anwendbar sind. Zum Vergleich wurden die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse der Rindfleischproben aus Argentinien einbezogen. Insgesamt umfasste das argentinische Probenkollektiv 41 Rindfleischproben. Die Anzahl ist höher als in der Betrachtung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse, da für die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotope auch argentinisches Kochfleisch (Corned beef) verwendet werden konnte, das bei ersterer aufgrund des Einflusses des Kochwassers auf das Gewebewasser konsequent ausgeschlossen wurde.

Im Vergleich der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse der Probenkollektive aus Argentinien und Deutschland zeigt sich, dass die untersuchten argentinischen Proben im Mittel eine höhere Anreicherung in den Isotopen $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ aufweisen (Abbildung 5-21). So ist das argentinische Probenkollektiv mit einem Median von 9,5 ‰ im $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnis um 3,9 ‰ angereicherter als der Median des deutschen Probenkollektivs. Ein ähnliches Bild zeigt auch der Median in den $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen der beiden Probenkollektive. Der Median in den argentinischen Proben ist mit einem Isotopenwert von 7,7 ‰ um 1,7 ‰ angereicherter als der Median des deutschen Probenkollektivs. Die höhere Anreicherung der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse in den argentinischen Proben reicht aber nicht aus, um beide Probenkollektive signifikant zu differenzieren. Besonders in den $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen zeigt das argentinische Probenkollektiv eine große Spannweite, die die Isotopenverhältnisse des deutschen Probenkollektivs nahezu mit einschließt. Dennoch sind Differenzierungsmöglichkeiten gegeben. So weist das argentinische Probenkollektiv im dritten Quartil $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse von 8,2 ‰ auf. Der ermittelte Whisker des deutschen Probenkollektivs liegt jedoch bei 8,5 ‰, so dass damit eine Differenzierungsmöglichkeit für annähernd 75 % der argentinischen Proben gegeben ist. Andererseits ergeben $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse unterhalb von 4,8 ‰ einen Hinweis auf eine deutsche Rindfleischprobe bzw. angereicherte $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse oberhalb von 8,1 ‰ einen Hinweis auf eine argentinische Probe.

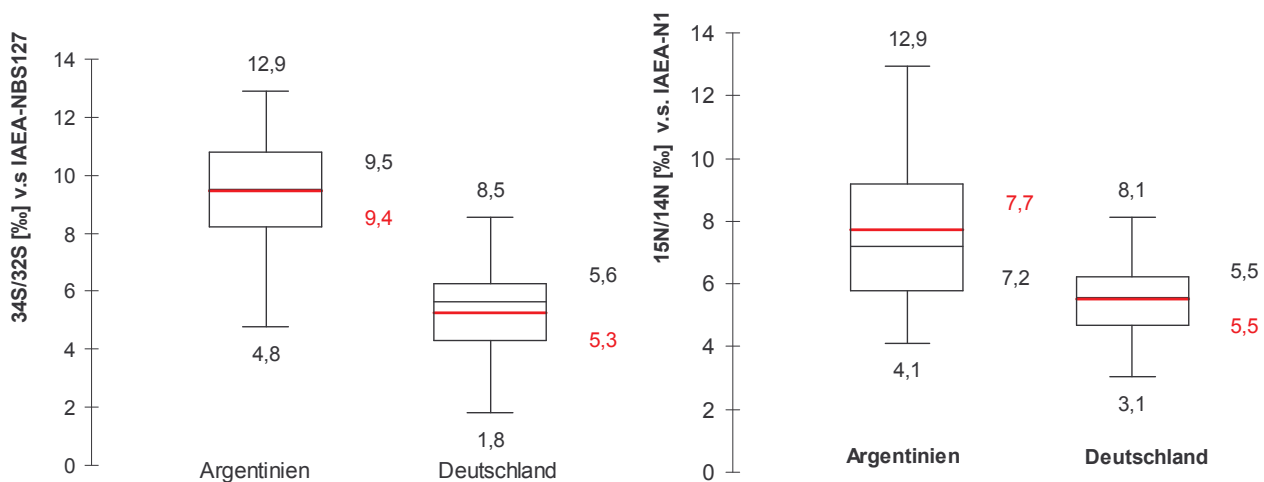


Abbildung 5-21: Boxplot-Vergleich der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse des argentinischen und deutschen Probenkollektivs.

Sicherlich haben die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotope die höchste Aussagekraft, wenn eine örtliche Angabe der Rindfleischherkunft gegeben ist, denn sie geben durch das Futter ein hof-, im Idealfall ein ortsspezifisches Isotopenmuster im Rindfleisch wieder. Die Kombination der Stickstoff- und Schwefelisotope mit den Sauerstoff- und Wasserstoffisotopen ermöglicht es damit, eine hohe Differenzierung zu erreichen. So sind die Proben aus Chile schon mit den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopen von deutschen Proben zu unterscheiden. Zieht man die Schwefelisotope hinzu, kann dieses Ergebnis signifikant abgesichert werden. Die untersuchten Proben zeigen in ihren $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnissen gegenüber den deutschen Proben eine erhebliche Anreicherung (Abbildung 5-22). Das Probenkollektiv aus Chile weist einen Median von 15,2 ‰ und einen annähernd gleichen Mittelwert (15,0 ‰) auf. Das deutsche Probenkollektiv ist mit seinem Median um annähernd 10 ‰ abgereicherter. Im Vergleich zeigt sich damit, dass sich die beiden Probenkollektive signifikant unterscheiden.

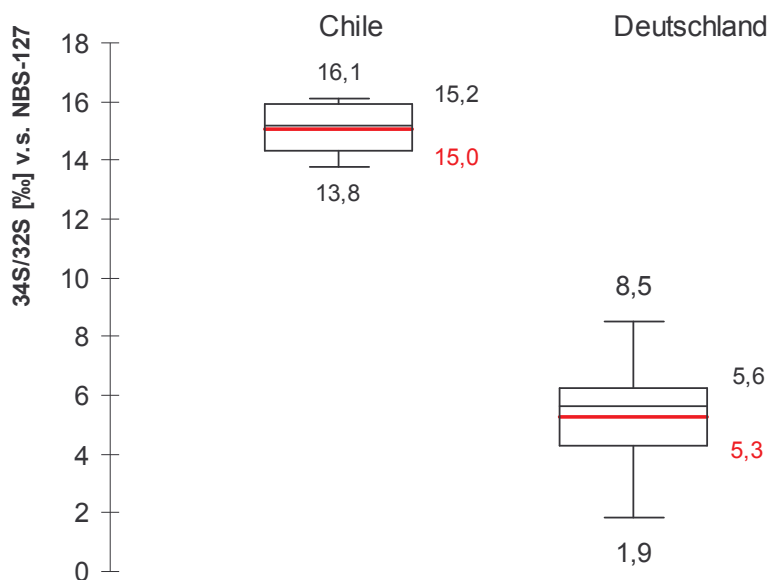


Abbildung 5-22: Boxplot-Vergleich der $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse des chilenischen und deutschen Probenkollektivs.

Gründe für diese hohe Anreicherung im Schwefel können einerseits in einer industriellen Kontamination liegen [Nielsen 1973], die von der Pflanze als Nahrung an das Rind weitergegeben wird, und andererseits die Ablagerung von angereichertem Meeressulfat, das als Aerosol vom Meer auf das Land getragen wird und einen angereicherten Isotopenwert von +21 ‰ aufweist [Rees 1978].

Betrachtet man die meeresnahe Lage von Puerto Varas, so liegt die Vermutung von einem Eintrag vom Meer nahe. Natürlich ist darauf hinzuweisen, dass der Großraum von Puerto Varas keine Aussagekraft über die $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse von Gesamtchile hat. Dennoch, mit der Zusatzinformation der Herkunft aus Puerto Varas, ist auf Grundlage dieser Daten das Probenkollektiv aus Chile signifikant mit Hilfe der stabilen Isotope des Schwefels zu differenzieren. Die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse der zehn untersuchten chilenischen Proben zeigen mit einem Mittelwert von 5,0 ‰ und einer Standardabweichung von 0,3 ‰ ähnliche Isotopenverhältnisse wie sie die deutschen Proben aufweisen. Deshalb kann man mit den stabilen Isotopen des Stickstoffs keine Unterscheidung durchführen.

5.8 Futter als Kriterium der Haltungsform

Es ist ein wesentlicher Anspruch der landwirtschaftlichen Biobetriebe, dass eine artgerechte Tierhaltung angestrebt wird. Im Gegensatz zur intensiven Mast- und Rinderhaltung, bei der die Rinder ganzjährig im Stall gehalten werden, praktizieren die Biobetriebe die extensive Rinderhaltung, die sich aus Weidegang im Sommer und Laufstall im Winter zusammensetzt.

Neben der artgerechteren Haltung liegt der Hauptunterschied in der Gewichtszunahme während der Mast. Bei der intensiven Mast werden energiereiche Futtermittel wie beispielsweise Maissilage, Getreide und Soja-Extraktionsschrot verfüttert. Die tägliche Gewichtszunahme liegt zwischen 1,1 und 1,5 Kilogramm je Tier. Bei der extensiven Mast bildet weniger energiereiches Futter wie Gras und Grassilage die Futtergrundlage. Die tägliche Gewichtszunahme ist wesentlich geringer und liegt bei 0,9 bis 1,1 Kilogramm je Tier.

Aus ökonomischer Sicht ist die intensive Mästung die profitablere Variante, da das Mastvieh schneller das Schlachtgewicht von ca. 600 bis 650 kg erreicht. Der überwiegende Teil des Rindfleisches in Deutschland stammt deshalb aus intensiver Masthaltung. Ein wesentlicher Grund für diese Schnellmästung ist der Einsatz von Maissilage, die die notwendige energiereiche Nahrungsgrundlage liefert. Die Verwendung von Maissilage fehlt weitgehend in der ökologischen Landwirtschaft bzw. hat hier nur eine Bedeutung bei einer zusätzlichen Milchproduktion. Mais ist mit Zuckerrohr, Hirse und Sorghum ein typischer Vertreter der C4-Pflanzen und unterscheidet sich damit maßgeblich in seinem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnis von der Mehrzahl der wichtigsten Kulturpflanzen, wie z. B. den einheimischen Getreidearten, Gräsern, Kartoffeln und Sojabohnen. Diese Besonderheit kann zum Nachweis und der Unterscheidung von C4 bzw. C3 Pflanzenzusätzen in verschiedenen Lebensmitteln eingesetzt werden, z.B. im Nachweis des Zusatzes von Rohrzucker in Honig oder als Unterscheidungsmöglichkeit eines Single Malt Whiskey (typisches Weizenprodukt) von Bourbon Whiskey (typisches Maisprodukt) [Winkler 1980]. In ähnlicher Weise kann die Nahrungsbasis bestimmt werden. So ist bekannt, dass die Nahrung von Menschen in Amerika stärker auf C4-Pflanzen basiert, im Gegensatz zu Deutschland, wo die Nahrungsbasis mehr C3-gewichtet ist. Diese Unterschiede lassen sich in den $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnissen der Haare nachweisen [Nakamura 1982, Wajih 1986]. Betrachtet man die Nahrungsbasis

mittels der untersuchten ökologischen Rindfleischproben, ergibt sich die in der Abbildung 5-23 dargestellte Häufigkeitsverteilung des Rohproteins.

In die Häufigkeitsverteilung wurden insgesamt 223 ökologisch produzierte Proben einbezogen. Mehr als 85 % der Proben liegen zwischen den Isotopenverhältnissen von -27‰ und -25‰ . Der Median der gesamten Proben liegt bei $-25,8\text{‰}$, der Mittelwert bei $-25,6\text{‰}$. Als Minimalwerte wurden Isotopenverhältnisse von $-28,2\text{‰}$ und Maximalwerte von $-20,3\text{‰}$ gefunden.

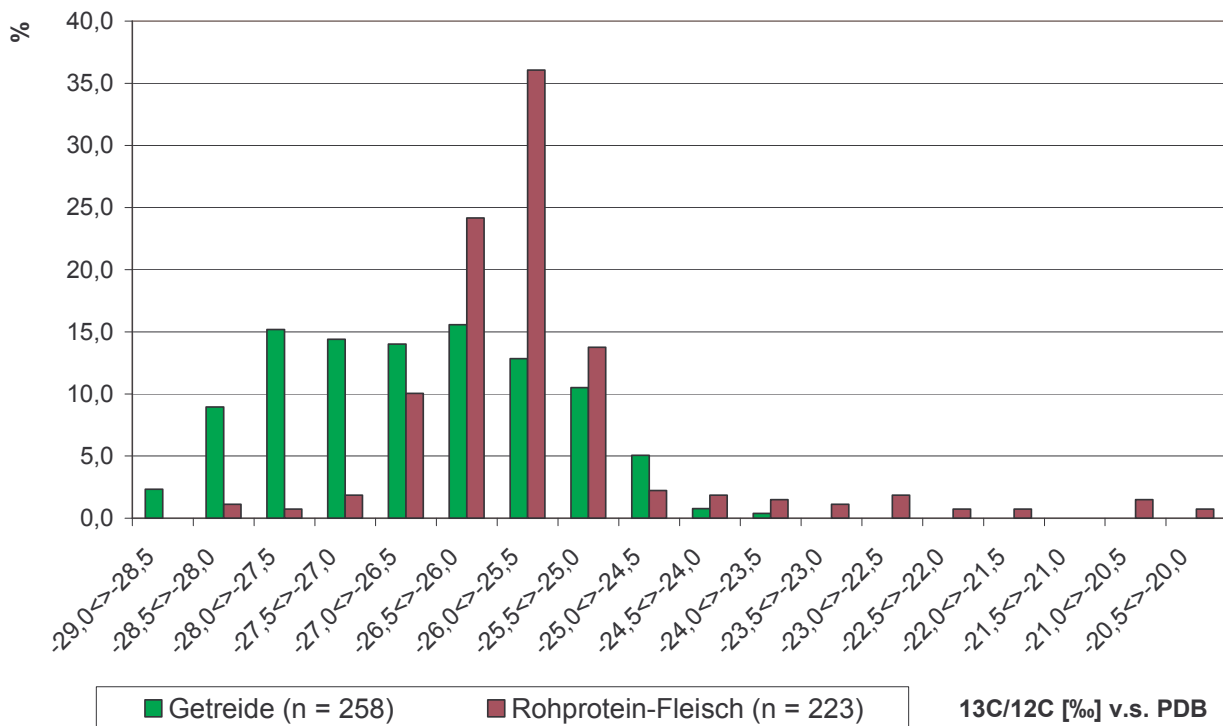


Abbildung 5-23: Vergleich der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse im Rohprotein des Rindfleischs und im Getreide.

Als direkter Vergleich zu dieser Häufigkeitsverteilung wurde die typische C3-Nahrungspflanze Getreide (Weizen, Roggen, Gerste) mit in die Betrachtung einbezogen. Natürlich stellt Getreide ein wertvolles Nahrungsmittel dar, das zwar in der Rindfütterung eingesetzt wird, aber nicht den Hauptbestandteil der Nahrung bildet. Dieser setzt sich in der ökologischen Landwirtschaft zusammen aus Wiesenheu oder Grassilage. Da die Getreidearten Weizen, Roggen und Gerste letztlich die Früchte von Ährengräsern sind, ist eine Übertragung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse gegeben. Insgesamt wurden 258 deutsche Getreideproben auf die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse untersucht.

Im direkten Vergleich der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse der beiden Probenkollektive von Rindfleisch und Getreide weisen die Getreideproben tendenziell angereichertere $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse auf.

Dies spiegelt sich entsprechend im Mittelwert von $-26,7\%$ und Median von $-26,6\%$ wider. Der Vergleich unterstreicht die Ergebnisse von DeNiro [DeNiro 1978], dass die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse im Gewebe im Vergleich zum Futter um 1% angereichert vorliegen.

Legt man die gefundenen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse des Getreides als Grenzwert für einen C4-Zusatz an, so ist unter der Berücksichtigung der Anreicherung von 1% ab einem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenwert von -23% von einem C4-Futterzusatz auszugehen. Lediglich 5% der untersuchten Proben zeigen diese angereicherten Isotopenverhältnisse von -23% . Dies steht im Gegensatz zu den gefundenen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnissen von 21 untersuchten kommerziellen Proben aus konventioneller Haltung. Hier hatten mehr als 85% der Proben $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenwerte über -23% und 66% oberhalb von -20% (Abbildung 5-24). Drei Proben bzw. 14% zeigten dabei $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse die angereicherter als -14% waren, so dass davon auszugehen ist, dass diese Rinder eine überwiegend C4-basierende Nahrungsquelle zur Verfügung hatten.

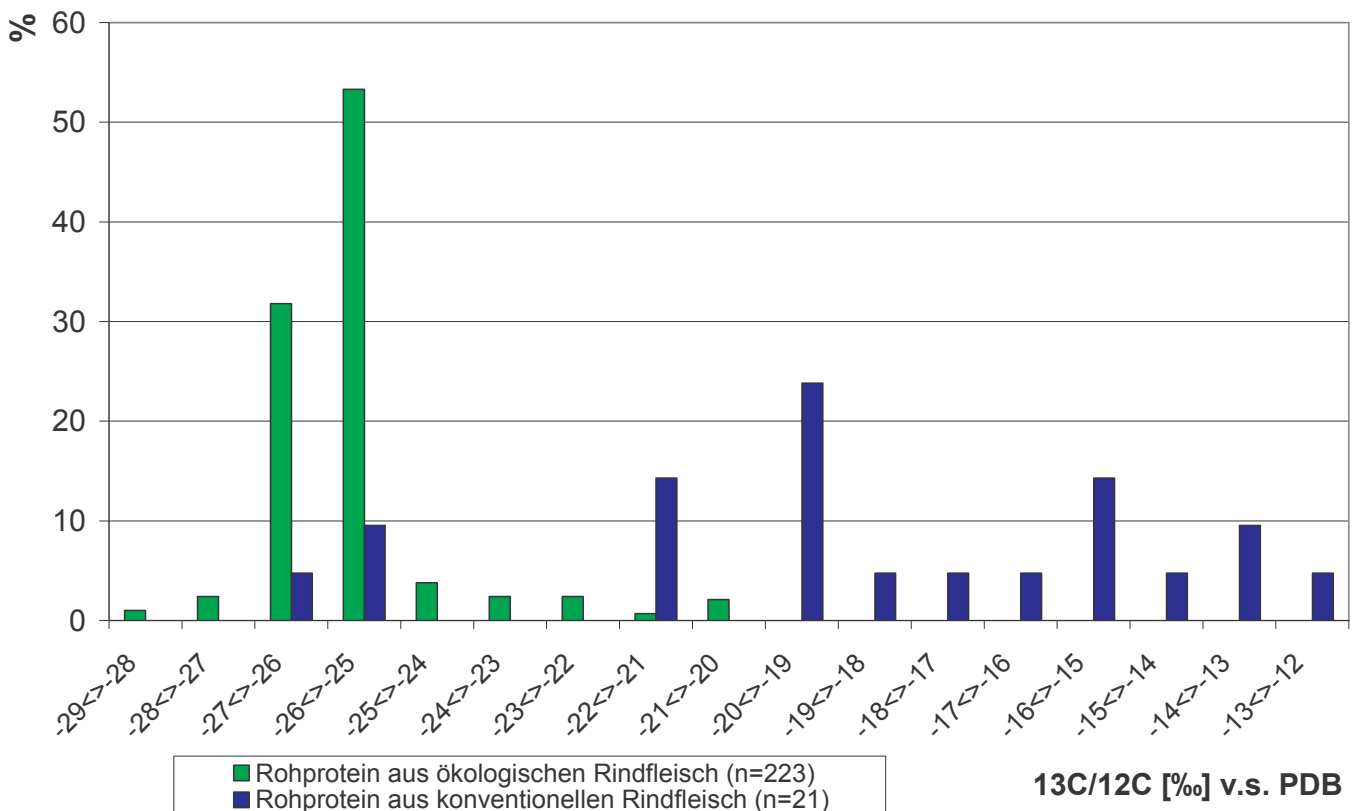


Abbildung 5-24: Vergleich der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse vom Rohprotein des Rindfleischs der ökologischen und konventionellen Landwirtschaft.

Diese Häufigkeitsverteilung in den $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnissen unterstreicht den weitgehenden Maiseinsatz in der kommerziellen Fütterung. Dagegen zeigen die ermittelten $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse der ökologisch produzierten Proben, dass die C4-Fütterung nur eine minimale Bedeutung in deren Rinderhaltung hat. Isotopenverhältnisse oberhalb von -20‰ , wie sie überwiegend bei den kommerziellen Proben vorlagen, wurden nicht gefunden. Als Ergebnis lässt sich folgern, dass bei $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnissen oberhalb von -20‰ im Rohprotein einer ökologisch produzierten Rindfleischprobe der Verdacht einer konventionellen Herkunft gegeben ist.

Bieten die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse eine geeignete Möglichkeit, die Futterbasis im Hinblick auf C4- bzw. C3- Pflanzenfutter im Rindfleisch abzuleiten, so können die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse genutzt werden, um die Nahrungskette zu verfolgen, da stetig bei jeder Nahrungskettenstufe einer Anreicherung um 3‰ des heterotrophen Organismus gegenüber der Nahrung vorliegt [Minagawa 1984].

In geschlossenen Systemen, wie sie z. B. in Oasen vorliegen, können damit hohe Anreicherungen im Boden, Pflanzen und Tieren von 20‰ erreicht werden [Schwarcz 1999]. Somit ist es denkbar, dass die Verfütterung von tierischer Nahrung an Rinder signifikant angereicherte $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse im Gewebe erzeugt. Zur Überprüfung dieser These wurden von insgesamt 45 Tiermehlproben die Isotopenverhältnisse des Stickstoffs bestimmt und mit den ermittelten Isotopenverhältnissen des Rohproteins der 223 Fleischproben aus der ökologischen Landwirtschaft verglichen. Dabei zeigt sich, dass über 66% der Tiermehlproben $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse unter 4‰ aufweisen (Abbildung 5-25).

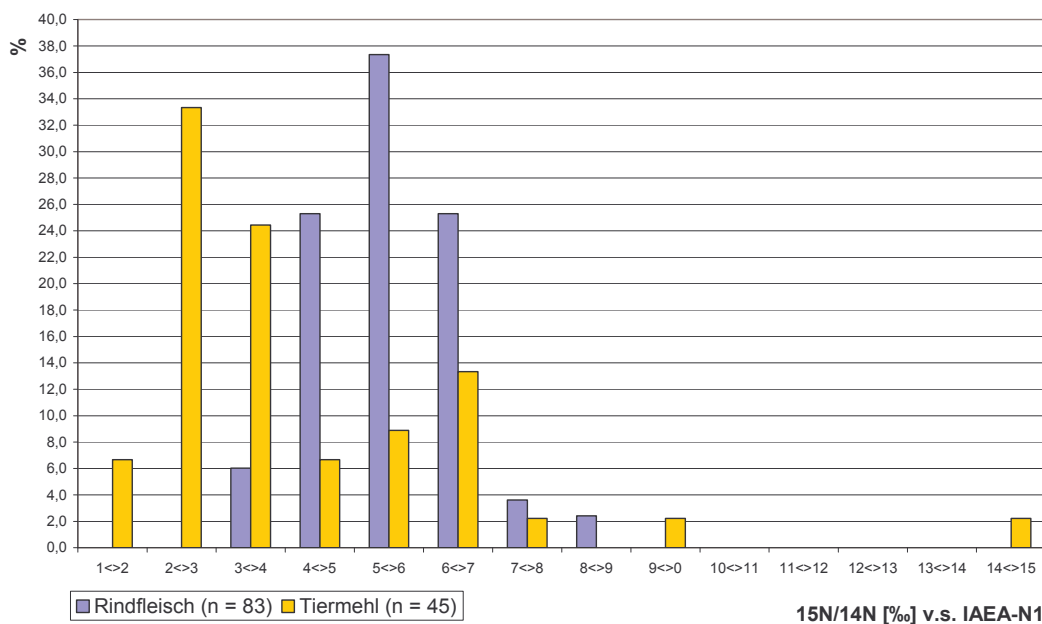


Abbildung 5-25: Häufigkeitsverteilung der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse im Tiermehl und im Rohprotein von ökologischem Rindfleisch.

Die Mehrzahl der Futterproben zeigen damit tendenziell eine Abreicherung in den $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen im Vergleich zum Rohprotein. Geht man davon aus, dass die Nahrung mit einer Anreicherung von 3 ‰ in den Isotopenverhältnissen des Rohproteins wiedergegeben wird, so werden $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse erzeugt, die vollständig im Rahmen der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse von ökologisch produziertem Rindfleisch liegen. Ein Nachweis der Tiermehlverfütterung ist daher mit den $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen nicht möglich.

Es wurden jedoch auch Tiermehle gefunden, die Anreicherungen der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse um 9 ‰ aufwiesen. Sie lagen außerhalb des bestimmten Maximalwertes der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse vom Rohprotein der ökologischen Rindfleischproben. Basierte die Stickstoffversorgung lediglich auf dieser Futtergrundlage, so wäre ein signifikanter Nachweis möglich. Diese Proben bildeten jedoch mit einem Anteil von unter 5 % des untersuchten Probenkollektivs die Ausnahme.

5.9 Transportproblem

Tiertransporte auch über große Distanzen gehören gerade in der konventionellen Mastwirtschaft von Rindern in Zeiten offener Märkte zum Alltagsbild. BSE hat dies sicherlich eingeschränkt, jedoch hat sich gerade in Deutschland eine daraus resultierende Besonderheit entwickelt, bei der Schlachtungen gerne in Bundesländern durchgeführt werden, die den zwingenden BSE-Test mitsubventionieren.

Wird ein Tier lediglich zur Schlachtung in eine neue Region gebracht, so sollten über die D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse eine Verknüpfung zur ursprünglichen Mastregion erhalten bleiben. Problematischer wird es, wenn Rinder nicht direkt geschlachtet werden, sondern kurzzeitig in der neuen Region verweilen. Die Änderung der Isotopenverhältnisse im Trinkwasser und der Nahrung muss in einem Bioorganismus unter Berücksichtigung spezifischer Turnover-Zeiten zwangsläufig zu neuen Isotopenverhältnissen im Rind führen. Ein argentinisches Rind, das längere Zeit in Deutschland ernährt wird, wird damit „eingedeutscht“, d.h. es zeigt in den D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen des Gewebewassers die Isotopenverhältnisse der entsprechenden Region.

Daraus ergibt sich zwangsläufig die Fragestellung, wie gravierend eine kurzzeitige Veränderung der Wasserisotopenverhältnisse auf die Isotopenverhältnisse des Gewebewassers wirken.

In einer Zusammenarbeit mit der Universität Bonn wurden jeweils 8 Rinder in einem Zeitraum von 7 Tagen vor der Schlachtung mit einer neuen Trinkwasserquelle versorgt. Die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse des Trinkwassers liegen in Bonn bei $-7,4\text{‰}$ und für D/H bei -49‰ . Als neue Trinkwasserquelle wurde ein stark angereichertes Wasser aus der Alpenregion mit $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen von $-11,3\text{‰}$ und D/H Isotopenverhältnissen von -88‰ verwendet.

Der Versuch wurde nicht an den üblichen Experimenten mit doppelmarkiertem hoch angereichertem $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H – Wasser angelehnt. Derlei Experimente werden gerade im medizinischen Bereich zur Berechnung von Energieumsätzen verwendet, indem mit Hilfe des angereicherten Wassers eine einmalige Dosis verabreicht wird und die exponentielle Abklingrate der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse im Urin und Speichel ermittelt werden [Schoeller 1986].

In diesem Versuch wurde eine permanente Änderung der Trinkwasserquelle vollzogen, so dass in einer Intervallabstufung von 7, 5 und 3 Tagen jeweils 2 Rinder auf dieses Alpen-Wasser als Trinkwasser umgestellt wurden. Als Nullwert wurden zwei Tiere bei der ursprünglichen Trinkwasserversorgung aus Bonn belassen.

Das Lebendgewicht der Rinder lag zwischen 600 bis 700 kg. Der Wasseranteil im Rind liegt bei ca. 56 %, dies entspricht damit einer absoluten Wassermenge von ca. 350 bis 400 l in den Schlachtrindern.

Bedenkt man, dass Rinder dieser Gewichtsklasse ca. 20 bis 30 l Wasser pro Tag verbrauchen, sollten sich die Isotopenverhältnisse im Gewebewasser des Rindes nach 7 Tagen minimal um ca. 1,2 ‰ und maximal um ca. 1,9 ‰ in den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen (Abbildung 5-26) verändern.

Bei der Berechnung der beiden Graphen wurden dabei die Einflussgrößen auf den Gewebewasserpool des Rindes (Abbildung 3-4) lediglich auf das Trinkwasser konzentriert und daraus die Veränderung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse in 5 l Intervallen berechnet.

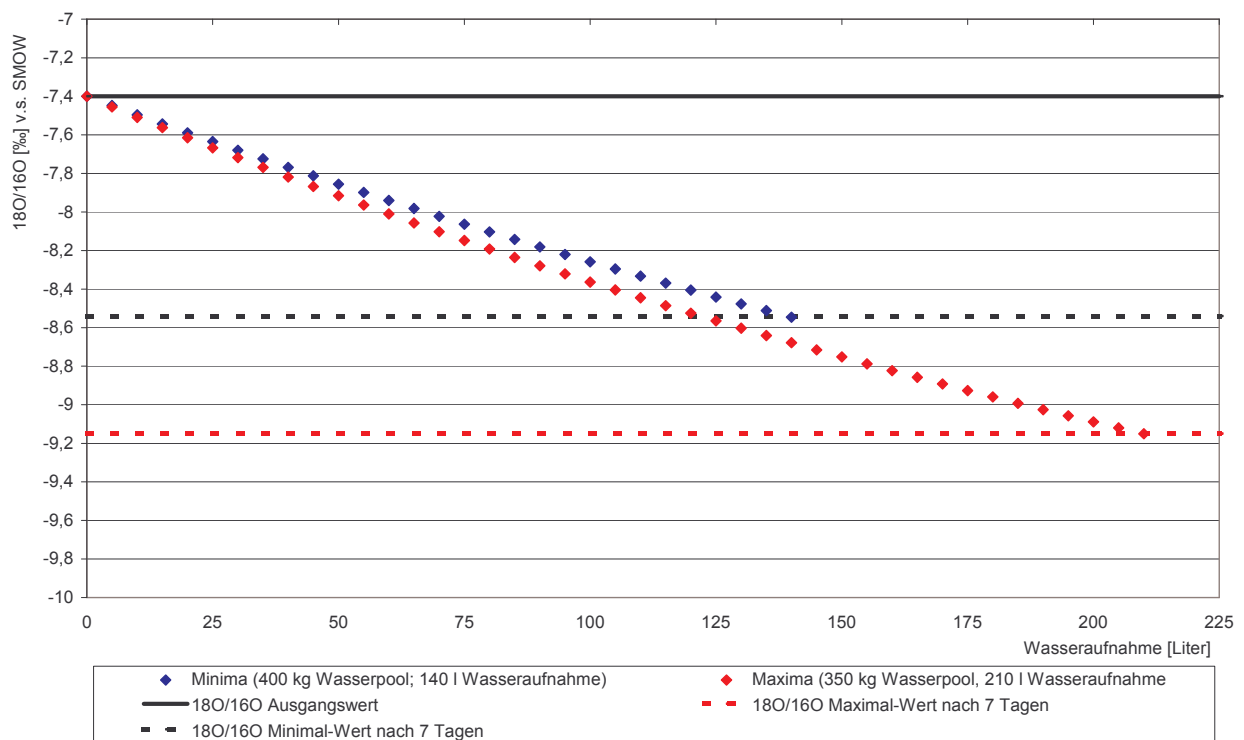


Abbildung 5-26: $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Abreicherungsgraph mit einer hypothetischen Wasseraufnahme innerhalb von 7 Tagen von 140 l (Minima- Punkte: blau) bzw. 210 l Wasser (Maxima – Punkte rot).

Für die Überprüfung wurde Probenmaterial aus 7 verschiedenen Partitionen des Rindes nach der Zerlegung entnommen (Tabelle 5-9). Die daraus bestimmten $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse werden als Mittelwerte und zugehörige Standardabweichung in der Abbildung 5-28 dargestellt.

Nr.	Teilstücke des Rindes
1.	Dünnung
2.	Roastbeef
3.	Hochrippe
4.	Brust
5.	Bug
6.	Kamm
7.	Keule

In der Wahl der verschiedenen Proben aus dem Rind wurde darauf Wert gelegt, eine möglichst breitgefächerte Probenauswahl aus den verschiedenen Partitionen des Rindes zu berücksichtigen (Abbildung 5-27).

Tabelle 5-9: Aufzählung untersuchter Rindfleisch-Partitionen.

Im Ergebnis weisen die D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse nach einem 7tägigen Wasserwechsel nur eine geringe Abreicherung auf. Die Abreicherung liegt im Mittel der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse unterhalb 0,8 ‰ und in den D/H Isotopenverhältnissen unterhalb 6 ‰.

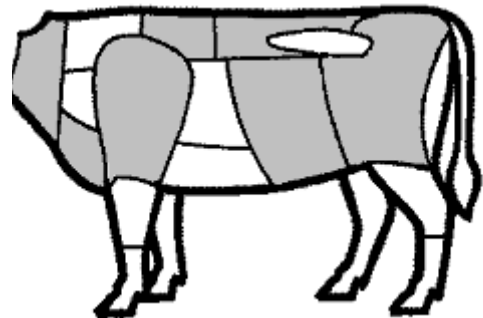


Abbildung 5-27: Entnahmepartitionen der Proben.

Zu erklären ist diese abgeminderte Abreicherung durch die in der theoretischen Betrachtung vernachlässigten Einflussgrößen des Gewebewassers der Nahrung als auch durch das Stoffwechselwasser aus der Organik.

Nach Bryant [Bryant 1999] liefert dieses Stoffwechselwasser einen 10 % Beitrag zu den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen des Wasserpools des Körpers. Das Gewebewasser der Nahrung liegt selbst im Trockenfutter nicht unterhalb von 12 ‰. In der Summe ist deshalb davon auszugehen, dass minimal 22 ‰ der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse nicht aus dem Trinkwasser stammen, sondern aus heimischem Futter geliefert werden.

Vereinfacht können diese zusätzlich puffernden Einflüsse durch eine Abnahme der Wasseraufnahme um den Faktor 0,78 berücksichtigt werden. Damit ist die Wasseraufnahme innerhalb von 7 Tagen auf 165 l (Maximal) bzw. 110 l (Minimal) zu beschränken.

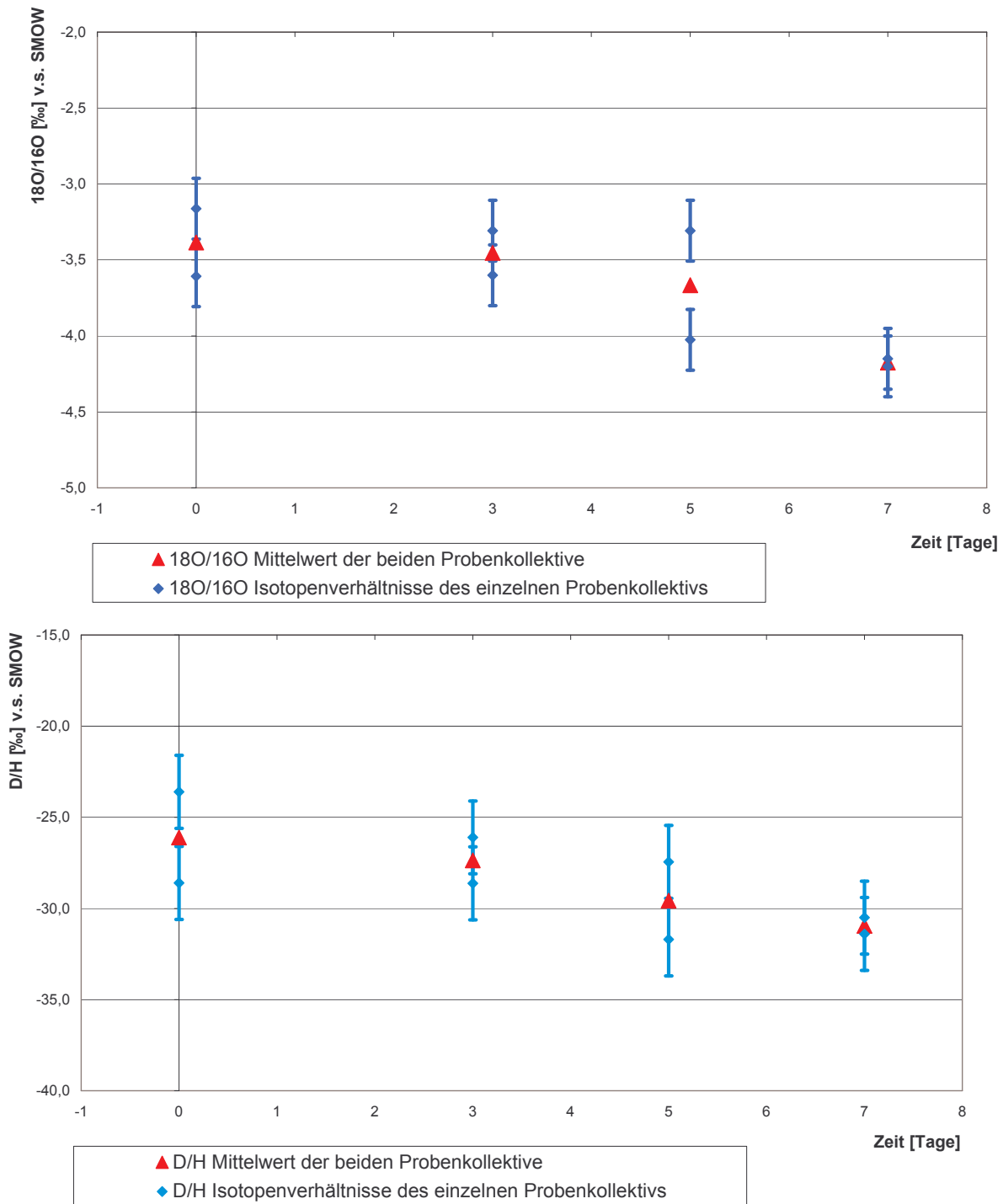


Abbildung 5-27: Abreicherungen der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse des Wassers der 8 verschiedenen Probenkollektive nach einer Änderung der Isotopenverhältnisse des Trinkwassers innerhalb von Zeitintervallen von 3, 5, 7 Tagen.

Unter diesen Voraussetzungen ergeben sich daraus theoretische Abreicherungen von 0,9 ‰ bzw. 1,4 ‰ in den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen. Dies ergibt eine erste gute Näherung zu den gefundenen Isotopenverhältnissen.

Weiterhin ist der Wasseranteil der Nahrung im allgemeinen sicherlich höher einzuschätzen als der theoretisch verwendete Wert des Trockenfutters. Durchschnittlich sind gerade bei der häufigen Silageverfütterung minimale Wasseranteile von ca. 30 ‰ anzunehmen.

Entsprechend ist die Wasseraufnahme um den Faktor 0,6 zu verfeinern. Die theoretischen Abreicherungen liegen damit innerhalb von 7 Tagen bei minimal 0,6 ‰ bzw. maximal 1,0 ‰ in den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen. Wird der Korrelationskoeffizient der „*meteoric water line*“ als vereinfachter Bezugswert zwischen den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnissen vorausgesetzt, sind D/H Isotopenverhältnisse von 5 ‰ und 8 ‰ abzuleiten. Diese theoretischen Annahmen beschreiben damit gut die Ergebnisse des Praxisversuchs.

Unter Berücksichtigung dieser Annahmen haben Transportzeiten von 3 Tagen mit einem deutlichen Wechsel der Isotopenverhältnisse im Trinkwasser von annähernd 4 ‰ keinen signifikanten Einfluss auf die Isotopenverhältnisse des Wasserpools der Rinder. Im Ergebnis ist dabei lediglich von einer Abreicherung von 0,3 ‰ bis 0,5 ‰ in den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen bzw. 2 ‰ bis 4 ‰ in den D/H Isotopenverhältnissen auszugehen.

Bedenkt man, dass diese Veränderung der Isotopenverhältnisse im Wasser sicherlich Extremfälle sind, können kurzzeitige Standortänderungen (< 7 Tage) von Rindern als nicht problematisch für eine regionale Bewertung eingeschätzt werden.

5.10 Chargenüberprüfung von Rindfleisch

Die Möglichkeiten einer Rückverfolgung von Rindfleisch beruhen, wie schon dargestellt, auf einer variablen und spezifischen Isotopenzusammensetzung des Trinkwassers und der Nahrung. Daraus ergibt sich zwangsläufig, dass eine Einzelrückverfolgung von Rindern wie sie mit einer angelegten DNA-Datenbank möglich ist, mit Hilfe der stabilen Isotope nicht realisierbar ist. Ein Probenkollektiv von Rindern mit gemeinsamer Nahrungs- und Trinkwasserquelle sollte immer ähnliche Isotopenverhältnisse im Gewebe aufweisen.

Andererseits ergibt sich daraus der Vorteil, dass eine Übertragbarkeit in der Form eines Chargenabgleichs mit Hilfe der stabilen Isotope möglich ist. Diese Möglichkeit ist bei der DNA-Analytik nicht gegeben.

Eine Schwierigkeit ergibt sich jedoch aus den Ergebnissen des Kapitels 5.1, denn eine Einzelprobe aus dem Rind kann eine erhebliche Abweichung zum Gesamtmittelwert aufweisen.

Auch ist offen welche Deckungsgleichheit der Isotopenverhältnisse in einem Probenkollektiv von Rindern vorliegt.

Zur Klärung dieser beiden Fragen wurde auf die Proben des Transport-Wasserversuches zurückgegriffen. Sicherlich ist dabei anzumerken, dass hierbei keine echte Charge vorlag, da die Schlachtung innerhalb eines Zeitraumes von 8 Tagen durchgeführt wurde. Daraus kann sich eine mögliche Veränderung der Isotopenverhältnisse des Rindfleisches durch die Nahrungsquelle ergeben und somit die Chargenähnlichkeit der Isotopenverhältnisse beeinflussen. Eine wesentliche Nahrungsumstellung wurde jedoch innerhalb dieses Zeitraumes nicht vollzogen.

Die Basis der Einzelmittelwerte der Rinder besteht dabei aus 8 Einzelproben (Tabelle 5-10). Dieser Probenumfang zeigt eine ähnlich geringe Standardabweichung, wie sie bei dem hohen Probenumfang von 30 Proben aus den untersuchten Rindern des Kapitels 5.1 gegeben war.

Alle Rinder weisen in den Einzelmittelwerten nur eine geringe Standardabweichung von lediglich 0,1 bis 0,2 ‰ in den $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnissen und 0,2 bis 0,3 ‰ in den $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen auf.

Somit ist auch die signifikant schlechtere Standardabweichung in den $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen wiederzufinden.

Nr.	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ [‰]	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ [‰]	$^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ [‰]
	v.s. IAEA-PDB	v.s. IAEA-N1	v.s. IAEA-NBS127
Rind 1	-25,4 +/- 0,1	5,1 +/- 0,3	6,6 +/- 0,1
Rind 2	-25,5 +/- 0,1	5,2 +/- 0,3	6,6 +/- 0,2
Rind 3	-25,4 +/- 0,1	4,9 +/- 0,3	6,7 +/- 0,2
Rind 4	-25,7 +/- 0,1	4,9 +/- 0,2	6,6 +/- 0,1
Rind 5	-25,7 +/- 0,1	4,7 +/- 0,3	6,6 +/- 0,1
Rind 6	-25,7 +/- 0,1	4,9 +/- 0,2	6,7 +/- 0,1
Rind 7	-25,7 +/- 0,1	4,6 +/- 0,2	6,5 +/- 0,2
Rind 8	-25,6 +/- 0,1	4,7 +/- 0,2	6,4 +/- 0,2
Mittelwert	-25,6	4,9	6,6
Standardabweichung	0,1	0,2	0,1

Tabelle 5-10: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse in den acht untersuchten Rinder.

Der Gesamtmittelwert der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse des Probenkollektivs aus Bonn weist eine Standardabweichung von lediglich 0,1 ‰ auf. Ähnlich den Einzelergebnissen zeigen die $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse wiederum eine etwas schlechtere Standardabweichung von 0,2 ‰.

Entsprechend umfasst die Spannweite der Mittelwerte der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse einen Bereich von 0,6 ‰ gegenüber 0,3 ‰ bei den $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnissen.

Die D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse wurden in der Betrachtung vernachlässigt, da der Gesamtmittelwert durch die Veränderung der Isotopenverhältnisse des Trinkwassers natürlich fehlerbelastet ist.

Dennoch sollte festgehalten werden, dass die Standardabweichungen der Einzelmittelwerte der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse ähnliche Werte aufweisen, wie sie in der Einzeluntersuchung des Kapitels 5.1 wiederzufinden sind. So liegen Standardabweichungen von 0,1 bis 0,3 ‰ in den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen und 1 bis 2 ‰ in den D/H Isotopenverhältnissen vor.

Es kann zumindest abgeleitet werden, dass der Gesamtmittelwert eine ähnlich geringe Standardabweichung von ca. 0,1 ‰ in den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und 2 ‰ in den D/H Isotopenverhältnissen aufweisen sollte.

Aufgrund des Versuches mit abgereichertem Trinkwasser liegen hierbei natürlich schlechtere Standardabweichungen von 0,4 ‰ in den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und 3 ‰ in den D/H Isotopenverhältnissen vor.

Als Resultat lässt sich schließen, dass ein Probenumfang von 8 Proben ausreichend ist, einen repräsentativen Mittelwert der Isotopenverhältnisse des Rindes zu bestimmen. Wird entsprechend die Probennahme gestaltet, so ist damit eine gute Möglichkeit gegeben, eine nachträgliche Chargenüberprüfung durchzuführen.

Dabei ist es nicht notwendig, dass alle Rinder einer Charge zeitgleich geschlachtet werden. Ein Zeitraum von 8 Tagen hat nach den vorliegenden Werten keinen signifikanten Einfluss. Dies gilt jedoch nur unter der Voraussetzung, dass die Nahrungsgrundlage keiner signifikanten Änderung unterworfen ist.

Unter Berücksichtigung der auffallend homogenen und geringen Standardabweichungen sollte auch eine weitere Reduzierung der Probenanzahl auf ca. 4 Proben für eine repräsentative Probe möglich sein.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde geprüft, welche Möglichkeiten die stabilen Isotope der Bioelemente bieten, die Herkunft und die Nahrungsbasis von Rindfleisch rückverfolgen zu können. Im Vordergrund standen Rindfleischproben aus der ökologischen Landwirtschaft, da gerade hier durch das hofeigene Futter eine Verknüpfung bis zum Ort vorliegt.

Die Homogenität der Isotopenverhältnisse im Rind wurde anhand zweier Kompletzerlegungen von einem Jung- und einem Altrind überprüft. Es konnte in den 30 untersuchten Fleischpartitionen eine Schwankungsbreite der verschiedenen Isotopenverhältnisse von Wasserstoff, Sauerstoff, Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel festgestellt werden, aber unter Betrachtung der Mittelwerte mit der zugehörigen Standardabweichung sind diese Schwankungsbreiten in beiden Rindern als gering zu bewerten. Die gefundenen Spannweiten der einzelnen Isotope in den beiden Rindern konnten im Vergleich mit verschiedenen Fleischpartitionen von 69 weiteren Rindern bestätigt werden. Einen Sonderfall bilden die Isotopenverhältnisse des Stickstoffs. Diese zeigten in beiden Rindern eine signifikant höhere Spannweite. So ist die Standardabweichung im Vergleich zu den Isotopenverhältnissen von Kohlenstoff und Schwefel nahezu verdoppelt. Dies kann auf die Isotopenanreicherungen von 3 ‰ innerhalb des Stoffwechsels zurückzuführen sein. So wird die vorgegebene Basisspannweite der Isotopenverhältnisse der Nahrung zusätzlich verbreitert, da innerhalb des Organismus die Proteinneubildung auch aus eigenen Ressourcen des Rindes gewährleistet wird, die entsprechend um 3 ‰ angereichert vorliegen.

Auch zeigten besonders die Isotopenverhältnisse des Stickstoffs in einigen Partitionen eine Tendenz zu angereicherten (Kamm) bzw. abgereicherten (dickes Bugstück) Isotopenverhältnissen. Derzeit ist die Versuchsbasis sicherlich noch zu gering, um hierzu eine Verallgemeinerung zu vollziehen, dies kann entsprechend nur durch weitere Untersuchungen verifiziert werden. Die übrigen Isotopenverhältnisse zeigten dagegen keine signifikanten Tendenzen in den verschiedenen Partitionen, so dass die Variabilität der Isotopenverhältnisse auf spezifische „Turnover“-Zeiten zurückzuführen sind.

Die Ähnlichkeit der Standardabweichungen der untersuchten Isotopenverhältnisse im Alt- und Jungrind weist darauf hin, dass das Alter keinen zusätzlichen Einfluss auf die Isotopenverhältnisse hat.

Die Untersuchung der D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse des Gewebewassers von 3 verschiedenen Betrieben aus dem Großraum Köln über einen Zeitraum von 18 Monaten zeigte, dass ein jahreszeitlicher Einfluss vorhanden ist. So sind die D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse im Sommer gegenüber dem Winter angereicherter.

Dies kann auf die unterschiedliche Herkunft des Wassers zurückzuführen sein. Im Winter überwiegt der Trinkwassereinfluss, dagegen hat im Sommer das angereicherte Nahrungswasser des Weidefutters einen erheblichen Anteil an der Bilanz der Wasserversorgung des Rindes.

Diese spezifischen Wasserbilanzen konnten auch in einem theoretischen Ansatz skizziert und nachvollzogen werden.

Werden die jahreszeitlichen Einflüsse auf die D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse nicht berücksichtigt, so ist eine Differenzierung von dem untersuchten nord- und süddeutschen Probenkollektiv insbesondere unter Einbeziehung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnisse nur bedingt möglich.

Erst die Berücksichtigung des zusätzlichen Parameters der Jahreszeit erlaubt eine signifikante Differenzierung von ca. 90 %. Entsprechend ist eine signifikante Unterscheidung von außerdeutschem Rindfleisch nur möglich, wenn erhebliche Isotopenunterschiede von annähernd 5 % in den $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Isotopenverhältnissen vorliegen. Dies ist in der Untersuchung des argentinischen Probenkollektivs weitgehend erfüllt, so dass eine signifikante Differenzierung von über 95 % möglich ist.

Dagegen konnte ein chilenisches und österreichisches Probenkollektiv nur unter Berücksichtigung der Jahreszeit signifikant vom deutschen Probenkollektiv differenziert werden.

Unter Berücksichtigung der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse ist eine weitergehende Differenzierung möglich. Durch die hofeigene lokale Fütterung werden die spezifischen Isotopenverhältnisse des Bodens über die Pflanzen an die Rinder weitergegeben, dies ermöglicht die Differenzierung von Biobetrieben wie Rheinbach, Düren und Aachen, die aus dem gleichen engen lokalen Bereich stammen. Ähnliche Möglichkeiten konnten auch in der Betrachtung von 11 Betrieben aus Norddeutschland gefunden werden. Die deutschen Proben wiesen dabei eine Häufigkeitsverteilung auf, die zwischen 3,1 ‰ und 8,1 ‰ in den $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnissen und 1,4 und 8,5 ‰ in den $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnissen lag. Die Vielzahl von mehr als 83 untersuchten Betrieben aus Nord- und Süddeutschland legen eine repräsentative Spannweite für Deutschland nahe.

Dies ermöglicht auch eine zusätzliche Differenzierung von ausländischen Proben. So umfasste das Probenkollektiv aus Chile angereichertere $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Isotopenverhältnisse, die zwischen 13,8 ‰ und 16,1 ‰ lagen. Im argentinischen Probenkollektiv wurden $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse mit Anreicherung des Stickstoffs von bis zu 12,9 ‰ festgestellt.

Die Isotopenverhältnisse des Kohlenstoffs können als Kriterium der Haltungform verwendet werden. Gerade die kommerziellen Rindfleischproben zeigten erhebliche Anteile an C4-Pflanzen. Diese hohen Anteile wurden in 223 Rindfleischproben aus der ökologischen Landwirtschaft nicht gefunden, so dass dieses als zusätzliches Kriterium zur Differenzierung der ökologischen zur kommerziellen Landwirtschaft genutzt werden kann. Ein Nachweis einer Tiermehlverfütterung mit Hilfe der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenverhältnisse ist nach derzeitigem Kenntnisstand nicht gegeben.

Eine regionale Standortänderung des Rindes mit neuen Trinkwasserverhältnissen der stabilen Isotope des Wasserstoffs und Sauerstoffs hat nach den Ergebnissen des durchgeführten Versuches keine signifikanten Auswirkungen auf den Gewebewasserpool des Rindes, sofern nur eine kurzzeitige Änderung unterhalb von 7 Tagen vorliegt. Dies ist gerade im Schlachttransport gegeben. Werden dabei die Rinder mit der gleichen Nahrung ernährt, so können die stabilen Isotope der Bioelemente genutzt werden, um Chargenüberprüfungen durchzuführen.

7 Abstract

Organic beef originating principally from Germany was analyzed for the hydrogen, carbon, oxygen, nitrogen and sulfur stable isotopic composition to test the possibility of tracing back the geographical origin.

First the stable isotopic distribution of the elements of life in different parts of beef was analyzed. For that verification 30 beef parts of two cattle with different ages were examined. Concerning the standard deviation the variances of the isotopic ratios were small in both examined cattle. These variances of the stable isotopes of life could be confirmed in comparison with 69 further samples of ecological farming.

The isotopic ratios of nitrogen have to be mentioned. In comparison with carbon and sulfur the standard deviation is doubled in both examined cattle. This could be an effect of the 3 ‰ nitrogen shift of the metabolism. The variances of the remaining stable isotopes of life have to be more or less an effect of the turnover of the metabolism.

Taking the ages of the cattle into account, there is no hint that the different ages have an effect on the stable isotopic variances of the stable isotopes of life in the meat.

Since there is a well-known pattern of D/H and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ in meteoric water and in ground water, there should be an existing link to the tissue water in the beef.

Therefore different organic beef samples from various German farms have been collected and analyzed over nearly two years. To check the differentiation of foreign beef, samples from Argentina, Chile and Austria were included in the study. The analyses of meat samples indicate that it is possible to trace back the region e.g. Argentina and Germany.

An important parameter for the differentiation is the seasonal effect of the tissue water, as it could be demonstrated with samples from 3 German farms in the Colonial bay.

Including the seasonal effect of oxygen and hydrogen in the discrimination procedure it is possible to differentiate between samples of north and south Germany and also foreign samples from Chile and Austria.

Otherwise without the seasonal effect, optimal differentiation could only be done if there is a significant difference of 5 ‰ in the ground water, respectively for $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratio.

By including the stable isotope ratios of the other elements of life further information is available: soils show different isotopic ratios of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ depending on the geological composition, cultivation and atmospheric sulfur deposition. As organic farming is

mainly obliged to use only self produced fodder, that ratio is reflected in the beef as well. Therefore it is possible to differentiate samples from the same region, as it could be demonstrated on organic beef samples from three farms (Aachen, Düren, Rheinbach) in the Colonia bay and eleven farms in north Germany.

The study analyzed samples from 83 farms in Germany, where the ranges of nitrogen and sulfur ratio of Germany could be set between 3,1 ‰ and 8,1 ‰ for nitrogen and 1,4 ‰ and 8,5 ‰ for sulfur ratios.

If it is stated that the analyzed ranges are more or less representative for Germany, the nitrogen and sulfur ratio could also be used to differentiate foreign samples e.g. Chile and Argentina.

Certainly authenticity of beef is not only linked with the geographical origin but can also reflect the differentiation of organic and conventional farming. The fodder of organic cattle farming consists mainly of C3-plants and the use of C4-plants is more usual in conventional cattle farming. A $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio above -20 ‰ appears as a limit for organic farming.

As the cattle are often transported in various regions for slaughtering, the influence of new drinking water was checked in a short experiment where 8 cattle from a university farm in Bonn got in two-day steps drinking water from alpine regions. In comparison with the drinking water from Bonn, its D/H and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios were significant decreased. Nevertheless there was no significant effect in the tissue water of the beef within seven days.

8 Literatur

1. Allison G.B. (1982) The relationship between ^{18}O and deuterium in water in sand undergoing evaporation. *J. Hydrology* 55, 151-161.
2. Allison G.B.; Gat J.R.; Leaney F.W.J. (1985) The relationship between deuterium and oxygen-18 delta value in leaf water. *Chemical Geol.* 58, 146-156.
3. Araguas-Araguas L.; Froehlich K.; Rozanski K. (2000) Deuterium and oxygen-18 isotope composition of precipitation and atmospheric moisture. *Hydrol. Process.* 14, 1341-1355.
4. Ayliffe L.K.; Chivas A.R. (1990) Oxygen isotope composition of the bone phosphate of Australian kangaroos: Potential as a palaeoenvironmental recorder. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 54, 2603-2609.
5. Backhaus K.; Erichson B.; Plinke W.; Weiber R. (1994) *Multivariate Analysenmethoden.* Springer Verlag. Berlin .
6. Becker J.S.; Dietze H.J. (2000) Precise and accurate isotope ratio measurements by ICP-MS. *Fresenius J. Anal. Chem.* 368, 23-30.
7. Belitz H.D.; Grosch W. (1992) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie.* Springer Verlag. Berlin Heidelberg New York.
8. Bigeleisen J. (1965) Chemistry of Isotopes. *Science* 147, 463-471.
9. Boner M.; Förstel H. (2001) Überprüfung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopenverhältnisse im Schaum- und Perlwein. *Deut. Weinbau.* 15, 18-23.
10. Bottinga Y.; Craig H. (1969) Oxygen isotope fractionation between CO_2 and water and the isotopic compositions of marine atmospheric CO_2 . *Earth Planet. Sci. Letters.* 5, 285-295.
11. Brodersen C.; Pohl S.; Lindenlaub M.; Leibundgut C. (2000) Influence of vegetation structure on isotope content of throughfall and soil water. *Hydrol. Process.* 14, 1439-1448.
12. Bryant J.D.; Froehlich P.N. (1995) A model of oxygen isotope fractionation in body water of large mammals. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 4523-4537.
13. Chambers L.A.; Trudinger P.A. (1978) Microbiological fractionation of stable sulfur isotopes: a review and critique. *Geomicrobiology. J.* 1, 249-293.
14. Chukhrov F.V.; Ermilova L.P.; Churikov V.S.; Nosik L.P. (1980) The isotopic composition of plant sulphur. *Org. Geochem.* 2, 69-75.
15. Clay D.E.; Engel R.E.; Long D.S.; Liu Z. (2001) Nitrogen and water stress interact to influence carbon-13 discrimination in wheat. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65, 1823-1828.
16. Cohen E.; Saguy I. (1984) Measurements of oxygen-18/Oxygen-16 stable isotope ratio in citrus juice: A comparison of preparation methods. *J. Agric. Food. Chem.* 32, 28-30.
17. Coleman M. L.; Shepherd T. J.; Durham J. J.; Rouse J. E.; Moore G. R. (1982) Reduction of water with Zinc for hydrogen isotope analysis. *Anal. Chem.* 54, 993-995.
18. Craig H. (1957) Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factor for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 12, 133-149.
19. Craig H. (1961) Isotopic variations in meteoric waters. *Science* 133, 1702-1703.

20. Criss R.E. (1999) Principles of stable isotope distribution. Oxford University Press. Oxford.
21. Dansgaard W. (1964) Stable isotopes in precipitation. *Tellus* 16, 436-467.
22. Dawson T.E.; Ehleringer J.R. (1991) Streamside trees that do not use stream water. *Nature* 350, 335-336.
23. Dawson T.E.; Pate J.S. (1996) Seasonal water uptake and movement in root systems of Australian phreatophytic plants of dimorphic root morphology: a stable isotope investigation. *Oecologia*. 88, 430-434.
24. DeNiro M. J.; Epstein S. (1977) Mechanism of Carbon Isotope Fractionation associated with Lipid Synthesis. *Science* 15, 261-263.
25. DeNiro M.J.; Epstein S. (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 42, 495-506.
26. DeNiro M.J.; Epstein S. (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 45, 341-351.
27. DeNiro M.J.; Schoeniger M. (1983) Stable carbon and nitrogen isotope ratios of bone collagen: variations within individuals, between sexes, and within populations raised on monotonous diets. *J. Archaeol. Science* 10, 199-203.
28. Dennis M.J. (1998) Recent developments in food authentication. *Analyst*. 123, 151R-156R.
29. Doughton J.A.; Saffigna P.G.; Vallis I. (1991) Natural abundance of ^{15}N in barley as influenced by prior cropping or fallow, nitrogen fertilizer and tillage. *Austr. J. Agric. Res.* 42, 723-733.
30. Dunbar J.; Wilson A.T. (1983) Oxygen and hydrogen isotopes in fruit and vegetables juices. *Plant Physiol.* 72, 725-727.
31. Ehrenberger F.; (1998) Quantitative organische Elementaranalyse. Wiley-VCH. Weinheim.
32. Epstein S.; Zeiri L. (1988) Oxygen and carbon isotopic compositions of gases respired by humans. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85, 1727-1731.
33. Falk M.; Becker R.; Marohn F. (1995) *Angewandte Statistik mit SAS: Eine Einführung*. Springer Verlag. Berlin Heidelberg New York.
34. Farquhar G.D. (1983) On the nature of carbon isotope discrimination of C_4 species. *Aust. J. Plant Physiology.* 10, 205-226.
35. Farquhar G.D.; O'Leary M.H. Berry J.A. (1982) On the relationship between carbon isotope discrimination and intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 9, 121-137.
36. Fernandez J.; Panarello H. O.; Schobinger J. (1999) The Inka mummy from mount aconcagua: Decoding the geographic origin of the "Messenger to the Deities" by means of stable carbon, nitrogen, and sulfur isotope analysis. *Geoarchaeology.* 14, 27-46.
37. Finkelstein D.N. (1975) 99,9999% Reinste Stoffe in Wissenschaft und Praxis. Urania-Verlag. Moskau.
38. Focken U.; Becker K. (1998) Metabolic fractionation of stable carbon isotopes: implications of different proximate compositions for studies of the aquatic food web using ^{13}C data. *Oecologia* 115, 337-343.
39. Förstel H. (1978) The Enrichment of ^{18}O in Leaf Water Under Natural Conditions. *Rad. Environm. Biophys.* 15, 323-344.
40. Förstel H. (1985) Die natürliche Fraktionierung der stabilen Sauerstoff-Isotope als Indikator für

- Reinheit und Herkunft von Wein. *Naturwissenschaften*. 72, 449-455.
41. Förstel H. (2000) Wasser deckt die Herkunft auf. *Kartoffelbau*. 12, 546-547.
42. Förstel H.; Hützen H. (1982) $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnis im Grundwasser der Bundesrepublik Deutschland. Kernforschungsanlage Jülich GmbH, Jülich.
43. Förstel H.; Hützen H. (1984) Variation des Verhältnisses der stabilen Sauerstoff-Isotope im Grundwasser der Bundesrepublik Deutschland. *GWF-Wasser/Abwasser*. 125, 21-25.
44. Gat J.R. (2000) Atmospheric water balance- the isotopic perspective. *Hydrol. Process*. 14, 1357-1369.
45. Gehre M.; Hoefling R.; Kowski P.; Strauch G. (1996) Sample preparation device for quantitative hydrogen isotope analysis using chromium metall. *Anal. Chem*. 68, 4414-4417.
46. Giesemann A.; Jäger H.-J.; Norman A.L.; Krouse H.R.; Brand W.A. (1994) On-line sulfur-isotope determination using an elemental analyser coupled to a mass spectrometer. *Anal. Chem*. 66, 2816-2819.
47. Gonfiantini R. (1978) Standard for stable isotope measurements in natural compounds. *Nature* 271, 535-536.
48. Gonzales-Martin I.; Gonzales-Perez C.; Hernandez Mendez J.; Marques-Macias E.; Sanz Poveda F. (1999) Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian swine. *Meat Science* 52, 437-441.
49. Graig H. (1957) Isotopic standards fro carbon and oxygen and corrections factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 12, 133-149.
50. Graig H. Gordon L.I. (1965) Deuterium and oxygen 18 variations in the ocean and the marine atmosphere. University of Rhode Island Publication. Vol. 3, 277-374.
51. Guy R.D.; Fogel M.L.; Berry J.A. (1993) Photosynthetic fractionation of the stable isotopes of oxygen and carbon. *Plant Physiology*. 101, 37-47.
52. Hachey D.L.; Wong W.W.; Boutton T.W.; Klein P.D. (1987) Isotope ratio measurements in nutrition and biomedical research. *Mass Spec. Rev.* 6, 289-328.
53. Handley L.L.; Raven J.A. (1992) The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. *Plant Cell Environ*. 15, 965-985.
54. Hegerding L.; Seidler D.; Danneel H-J.; Gessles A.; Nowak B. (2002) Sauerstoffisotopen-Verhältnis-Analyse zur Herkunftsbestimmung von Rindfleisch. *Fleischwirtschaft*. 4, 95-100.
55. Hobson A. (1999) Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: A review. *Oecologia* 120, 314-326.
56. Holbach B.; Förstel H.; Otteneder H.; Hützen H. (1994) Das Verhältnis der Stabilisotopen ^{18}O und ^{16}O zur Beurteilung von Auslandwein. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 198, 223-229.
57. Horita J. (1988) Hydrogen isotope analysis of natural water using an H_2 -water equilibration method: a special implication to brines. *Chemical Geology*. 72, 89-94.
58. Houerou G.; Kelly S. D.; Dennis M. J. (1999) Determination of the oxygen-18/oxygen-16 isotope ratio of sugar, citric acid and water from single strength orange juice. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 13, 1257-1262.
59. IAEA (1983) Enviromental Isotope Data No. 7: World Survey of Isotope Concentration in Precipitation (1976-1979). Technical Report Series No. 226. Wien.
60. IAEA (1986) Enviromental Isotope Data No. 8: World Survey of Isotope Concentration in Precipitation (1980-1983). Technical Report Series No. 264. Wien.

61. Jones R.J.; Ludlow M.M.; Throughton J.H. Blunt C.G. (1981) Changes in the natural carbon isotope ratios of the hair from steers fed diets of C₄, C₃ and C₄ Species in sequence. *Search*. 12, 85-87.
62. Kaltwasser E.; Thalacker R. (1980) Beitrag zur quantitativen Bestimmung von Reinprotein in Fleisch und Fleischerezeugnissen. *Fleischwirt*. 60, 1678-1679.
63. Karamanos R.E.; Rennie D.A. (1981) The isotope composition of residual fertilizer nitrogen in soil columns. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 316-325.
64. Keeling C.D.; Whorf T.P.; Wahlen M.; van der Plicht J. (1995) Interannual extremes in the rate of rise of atmospheric carbon dioxide since 1980. *Nature* 375. 666-670.
65. Kelly D. K.; Heaton K. D.; Brereton P. (2001) Deuterium/hydrogen isotope ratio measurement of water and organic samples by continuous-flow isotope ratio mass spectrometry using chromium as the reducing agent an elemental analyser. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 15, 1283-1286.
66. Kirchgeßner M. (1997) *Tierernährung: Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis*. DLG-Verlags-GmbH. Frankfurt (Main).
67. Koehler G.; Wassenaar L.I.; Hendry M.J. (2000) An automated technique for measuring D and ¹⁸O values of pore water by direct CO₂ and H₂ equilibration. *Anal. Chem.* 72, 5659-5664.
68. Kohl D.H.; Shearer G. (1980) Isotopic Fractionation associated with symbiotic N₂ Fixation and uptake of NO³⁻ by plants. *Plant Physiol.* 66, 51-56.
69. Körner C.; Farquhar G.D.; Wong S.C. (1991) Carbon isotope discrimination by plants follows latitudinal and altitudinal trends. *Oecologia*. 88, 30-40.
70. Kornexl B.E.; Werner T.; Rossmann A.; Schmidt H-L. (1997) Measurement of stable isotope abundances in milk and milk ingredients – a possible tool for origin assignment and quality control. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 205, 19-24.
71. Kroopnick P.; Craig H. (1972) Atmospheric oxygen: Isotopic composition and solubility fractionation. *Science*. 175, 54-55.
72. Krouse H.R. (1984) Geographical trends of carbon and sulphur isotope abundances in human kidney stones. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 48, 187-191.
73. Krouse H.R.; Grinenko V.A. (1991) Pedosphere and Biosphere. in: *Stable Isotopes in the Assessment of Natural and Anthropogenic Sulphur in the Environment*, Scope 42. Wiley, New York, 267-305.
74. Kwak T.J.; Zedler J.B. (1997) Food web analysis of southern California coastal wetlands using multiple stable isotopes. *Oecologia*. 110, 262-277.
75. Leuenberger M.; Siegenthaler U.; Langway C.C. (1992) Carbon isotope composition of atmospheric CO₂ during the last ice age from an Antarctic ice core. *Nature* 357, 488-490.
76. Liu B.; Phillips F.; Hoines A.; Campbell A.R.; Sharma P. (1995) Water movement in desert soil traced by hydrogen and oxygen isotopes, chloride, and chlorine-36, southern Arizona. *J. Hydrol.* 168, 91-110.
77. Longinelli A. (1984) Oxygen isotopes in mammal bone phosphate: A new tool for paleohydrological and paleoclimatological research ? *Geochim. Cosmochim. Acta.* 48, 385-390.
78. Longinelli A.; Peretti P. (1980) Oxygen isotopic composition of water mammal blood. First results. *Mass Spectr. In Bioch. Med. And Envir. Res.* 1, 135-139.
79. Luz B.; Kolodny Y.; Horowitz M. (1984) Fractionation of oxygen isotopes between mammalian bone phosphate and environmental drinking water. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 48, 1689-1693.

80. Lüttge U.; Kluge M.; Bauer G. (1994) Botanik. VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim.
81. Macko S.A.; Fogel Estep M.L.; Engel M.H.; Hare P.E. (1986) Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino acid transamination. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 2143-2145.
82. Macko S.A.; Fogel M.L.; Hare P.E.; Hoering T.C. (1987) Isotopic fractionation of nitrogen and carbon in the synthesis of amino acids by microorganism. *Chemical Geology.* 65, 79-92.
83. Manca G.; Gamin F.; Coloru G.C.; Del Caro A (2001) Characterization of the geographical origin of pecorino sardo chesse by casein stable isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) ratios and free amino acid ratios. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1404-1409.
84. Mariotti A.; Germon J.C.; Hubert P.M.; Kaiser P.; Letolle R.; Tardieux A. (1981) Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: Some principles; illustration for the denitrification and nitrification processes. *Plant Soil.* 62, 413-430.
85. Marriot C.A.; Hudson G.; Hamilton D.; Neilson R.; Boag B.; Handley L.L.; Wishart J.; Scrimgeour C.M.; Robinson D. (1997) Spatial variability of soil total C and N and their stable isotope signature in an upland grassland system. *Plant Soil.* 196, 151-162.
86. Matsuhisa Y.; Goldsmith J.R.; Clayton R.N. (1979) Oxygen isotope fractionation in the system quartz-albite-anorthite-water. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 42. 173-182.
87. Mc Kinney C.R.; McCrea J.M.; Epstein S.; Allen H.A. Urey H.C. (1950) Improvements in mass spectrometers for the measurements of small differences in isotope abundance ratios. *Rev. Sci. Instrum.* 21, 724-730.
88. Melzer E.; Schmidt H.-L. (1987) Carbon isotope effects on the pyruvate dehydrogenase reaction and their importance for relative carbon-13 depletion in lipids. *J. Biol. Chemistry.* 262, 8159-8164.
89. Metges C.; Kempe K.; Schmidt H.-L. (1990) Dependence of the carbon-isotope contents of breath carbon with milk, serum and rumen fermentation products on the $\delta^{13}\text{C}$ value of food in dairy cows. *Br. J. Nutrition.* 63, 187-196.
90. Metges C.C.; Petzke K. (1997) Measurement of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopic composition in individual plasma free amino acids of human adults at natural abundance by gas chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 247, 158-164.
91. Midwood A.J.; McGaw B. A. (1999) Recent developments in the analysis of light isotopes by continuous flow isotope ratio mass spectrometry. *Anal. Commun.* 36, 291-294.
92. Minagawa M.; Wada E. (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between ^{15}N and animal age. *Geochim. Cosmochim Acta.* 48, 1135-1140.
93. Nakamura K.; Schoeller D.A.; Winkler F.J.; Schmidt H.-L. (1982) Geographical Variations in the carbon isotope composition of the diet and hair in contemporary man. *Biomed. Mass Spectrom.* 9, 390-394.
94. Nielsen H. (1973) Isotopic composition of the mayor contributors to atmospheric sulfur. *Tellus,* 26, 213-221.
95. Nier A.O. (1947) A mass spectrometer for isotope and gas analysis. *Rev. Sci. Instrum.* 1947, 18, 398-411.
96. Nriagu J.O.; Coker R.D.; Barrie L.A. (1991) Origin of sulphur in Canadian arctic haze from isotope measurements. *Nature.* 349, 142-144.

97. O'Leary M.H. (1988) Carbon isotopes in photosynthesis. *Bioscience*. 38, 328-336.
98. Otsuki A.; Ino Y.; Fujii T. (1983) Simultaneous measurements and determinations of stable carbon and nitrogen isotope ratios, and organic carbon and nitrogen contents in biological samples by coupling of a small quadrupole mass spectrometer and modified carbon nitrogen elemental analyser. *Intl. Journal Mass Spectrom. Ion Physic.* 48, 343-346.
99. Peterson B.J. (1999) Stable isotopes as tracers of organic matter input and transfer in benthic food webs: A review. *Acta Oecologia*. 20, 479-487.
100. Peterson B.J.; Fry B. (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 293-320.
101. Piasentier E.; Valusso R.; Camin F.; Versini G. (2003) Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. *Meat Science*. 64, 239-247.
102. Ponsard S.; Averbuch P. (1999) Should growing and adult animals fed on the same diet show different $\delta^{15}\text{N}$ values? *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 13, 1305-1310.
103. Prändl O.; Fischer A.; Schmidhofer T.; Sinell H.J. (1988) *Fleisch – Technologie und Hygiene*. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart.
104. Preston T.; Owens N.J.P. (1983) Interfacing and automatic elemental analyser with an isotope ratio mass spectrometer: the potential for fully automated total nitrogen and nitrogen-15 analysis. *Analyst*. 108, 971-977.
105. Preston T.; Owens N.J.P. (1985) Preliminary ^{13}C measurements using a gas chromatograph interfaced to an isotope ratio mass spectrometer. *Biomed. Mass Spectrom.* 12, 510-513.
106. Prosser S.J. (1993) A novel magnetic sector mass spectrometer for isotope ratio determination of light gases. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*. 125, 241-266.
107. Rees C.E. (1973) A steady state model for sulphur isotope fractionation in bacterial reduction processes. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 37, 1141-1162.
108. Rees C.E.; Jenkins W.J.; Monster J. (1978) The sulphur isotopic composition of ocean water sulphate. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 4, 377-381.
109. Roeske C.A.; O'Leary M.H. (1984) Carbon isotope effects on the enzyme-catalyzed carboxylation of ribulose bisphosphate. *Biochemistry* 23, 6275-6284.
110. Roßmann A.; Haberhauer G.; Hölzl S. Horn P.; Pichlmayer F.; Voerkelius S. (2000) The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter. *Eur. Food. Res. Technol.* 211, 32-40.
111. Roßmann A.; Schmidt H.-L.; Reniero F.; Versini G.; Moussa I.; Merle M. H. (1996) Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 203, 293-301.
112. Santrock J.; Studley S. A.; Hayer J.M. (1985) Isotopic Analyses based on the mass spectrum of carbon dioxide. *Anal. Chem.* 57, 1444-1448.
113. Schoell M. (1980) The hydrogen and carbon isotopic composition of methane from natural gases of various origins. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 44, 649-661.
114. Schoeller D.A.; Leitch C.A.; Brown C. (1986) Doubly labelled water method: In vivo oxygen and hydrogen isotope fractionation. *Amer. J. Physiol.* 251, R1137-R1143.
115. Schoeller D.A. (1999) Isotope Fractionation: Why Aren't we what eat? *J. Archaeological Science*. 26,

- 667-673.
116. Schmidt H.-L.; Werner R. A.; Rossmann A. (2001) ^{18}O Pattern and biosynthesis of natural plant products. *Phytochemistry*. 58, 9-32.
117. Schnieder A. (2001) Herkunftsbestimmung von *Capsicum annuum* (Paprika) über die Isotopenverhältnisse der Bioelemente mittels Stabil-Isotopen-Methode. Fachhochschule Jülich. Jülich.
118. Schwarcz H.P. (1991) Some Theoretical Aspects of Isotope Paleodiet Studies. *J. Archaeological Science*. 18, 261-275.
119. Schwarcz H.P.; Dupras T.L.; Fairgieve S.I. (1999) ^{15}N Enrichment in the Sahara: In Search of a global Relationship. *J. Archaeological Sci.* 26, 629-636.
120. Shearer G.B.; Kohl D.H.; Commoner B. (1974) The precision of determination of the natural abundance of nitrogen-15 in soils, fertilizers, and shelf chemicals. *Soil Science*. 118, 308-314.
121. Siegenthaler U.; Oeschgerd H. (1980) Correlation of ^{18}O in precipitation with temperature and altitude. *Nature* 285, 314-316.
122. Slater C.; Preston T.; Weaver L.T. (2001) Stable isotopes and the international system of units. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 15: 1270-1273.
123. Steele K.W. (1983) Effect of rhizobial strain and host plant on nitrogen isotopic fractionation in legumes. *Plant Physiol.* 72, 1001-1004.
124. Steele K.W.; Daniel R.M. (1978) Fractionation of nitrogen isotopes by animals: a further complication to the use of variations in the natural abundance of ^{15}N for tracer studies. *J. Agricultural Science*. 90, 7-9.
125. Sutoh M.; Koyama T. Yoneyama T. (1987) Variations of natural ^{15}N abundances in the Tissues and digesta of domestic animals. *Radioisotopes*. 36, 74-77.
126. Thode H.G. (1991) Sulphur isotopes in nature and the environment: An overview. in: *Stable Isotopes in the Assessment of Natural and Anthropogenic Sulphur in the Environment*, Scope 42. Wiley, New York, 1-26.
127. Tieszen L.L.; Boutton T.W.; Tesdahl K.G.; Slade N.A. (1983) Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia*. 57, 32-37.
128. Tobias H.; Brenna J. T. (1996) High-Precision D/H measurement from organic mixtures by gas chromatography continuous-flow isotope ratio mass spectrometry using a palladium filter. *Anal. Chem.* 68, 3002-3007.
129. Trust B.A.; Fry B. (1992) Stable sulphur isotopes in plants: A review. *Plant Cell and Environment*. 15, 1105-1110.
130. Bulingame A.L.; Boyd R. K.; Gaskell S. J. (1996) Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 68, 599R-651R.
131. Turner G.L.; Gault R.R.; Morthrpe L.; Chase D.L.; Bergersen F.J. (1987) Differences in the natural abundance of ^{15}N in the extractable mineral nitrogen of cropped and fallowed surface soils. *Aust. J. Agric. Res.* 38, 15-25.
132. Wada E.; Mizutani H.; Minagawa M. (1991) The Use of Stable Isotopes for Food Web Analysis. *Crit. Reviews Food Science and Nutrition*. 30, 361-371.
133. Wajih N. (1986) Nutritional evaluation of selected meat based saudi arabian dishes. *Ecology of Food and Nutr.* 11, 171-182.

134. Whelan T.; Sacke W.M.; Benedict C.R. (1973) Enzymatic fractionation of carbon isotopes by phosphoenolpyruvate carboxylase in c4 plants. *Plant Physiology*. 51, 1051-1054.
135. Winkler J.; Schmidt H.-L. (1980) Einsatzmöglichkeiten der ¹³C-Isotopen-Massenspektrometrie in der Lebensmitteluntersuchung. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 94, 85-93.
136. Winner W.E.; Bewley J.D.; Krouse H.R.; Brown H.M. (1978) Stable sulphur isotope analysis of SO₂ pollution impact on vegetation. *Oecologia*. 36, 351-361.
137. Yakir D.; DeNiro M.J.; Gat J.R. (1990) Natural deuterium and oxygen-18 enrichment in leaf water of cotton plants grown under wet and dry conditions: evidence for water compartmentation and its dynamics. *Plant. Cell Environ.* 13, 49-56.
138. Yoneyama T.; Kouno K.; Yazaki J. (1990) Variation of natural ¹⁵N abundance of crops and soils in Japan with special reference to the effect of soil conditions and fertilizer application. *Soil Sci. Plant Nutr.* 36, 667-675.
139. Yoneyama T.; Nambiar P.T.C.; Lee K.K.; Srinivasa Rao B.; Williams J.H. (1990) Nitrogen accumulation in three legumes and two cereals with emphasis on estimation of N₂ fixation in the legumes by the natural ¹⁵N abundance technique. *Biol. Fertil. Soil.* 9, 25-30.
140. Yoneyama T.; Omata S.; Nakata S.; Yazaki J. (1989) Fractionation of nitrogen isotopes during the uptake and assimilation of ammonia by plants. *Plant Cell Physiol.* 21, 1211-1220.
141. Ziegler H.; Osmond C.B.; Stichler W.; Trimborn P. (1976) Hydrogen isotope discrimination in higher plants: correlations with photosynthetic pathway and environment. *Planta*. 128, 85-92.
142. Zundel G.; Miekeley W.; Grisi B.M.; Förstel H. (1978) The H₂O Enrichment in the Leaf Water of Tropic Tree: Comparison of Species from the Tropical Rain Forest and the Semi-Arid Region in Brazil. *Rad. Environm. Biophys.* 15, 203-212.