

## Vergleichbarkeit von Qualitätsuntersuchungen mit den Bildschaffenden Methoden (Kupferchlorid-Kristallisation)

Nicolaas Busscher, Johannes Kahl, Gaby Mergardt, Jens-Otto Andersen, Machteld Huber, Angelika Meier-Ploeger

**Problemstellung:** Die Methode der Kupferchlorid-Kristallisation wird erfolgreich zur ganzheitlichen Qualitätserfassung von Lebensmitteln eingesetzt (Balzer-Graf 1994, Andersen et al. 2001). Damit können nach Aussage dieser Autoren sowohl der Einfluss unterschiedlicher Anbausysteme als auch diverser Verarbeitungsschritte in Pflanzen und pflanzlichen Produkten nachgewiesen werden. Für den Einsatz der Methode zur Qualitätserfassung ökologischer Produkte im Routinebetrieb muss die Methode validiert werden. Validierung bedeutet die Prüfung, ob eine bestimmte Fragestellung mittels der Methode eindeutig beantwortet werden kann (DIN ISO 17025). Eine Validierung ist auch die Voraussetzung für eine allgemeine wissenschaftliche Anerkennung dieser ganzheitlichen Methode. Der methodische Ansatz wird von der Fragestellung bestimmt (Kahl et al. 2002). Bei dem hier gewählten Ansatz gibt es vier verschiedene Möglichkeiten, die Qualitätsuntersuchungen zu vergleichen: Durch Bestimmung der Wiederholpräzision (repeatability), der Laborpräzision (intermediate precision), der Vergleichspräzision (reproducibility) oder der Methodenrobustheit (robustness) (vgl. Kromidas 2000). Um diese Verfahrensmerkmale bestimmen zu können, sind notwendig: 1. Definiertes Probenmaterial in ausreichender Menge, 2. Dokumentierte Prozesse, 3. Statistische Auswertung der Ergebnisse, 4. Mehr als drei Laboratorien, die mit der Methode arbeiten. Diese Bestimmungen sind aus den bisher veröffentlichten Arbeitsergebnissen zur Kupferchlorid-Kristallisation anderer Autoren nicht möglich. Diese Arbeit soll zeigen, welche Voraussetzungen notwendig sind, um die Qualitätsuntersuchungen mit Bildschaffenden Methoden (Kupferchlorid-Kristallisation) wissenschaftlich anwenden und auswerten zu können (Vergleichbarkeit der Aussagen wissenschaftlicher Untersuchungen).

**Arbeitshypothesen:** A. Die generelle Hypothese, die nur zum Teil durch die vorliegende Arbeit bewiesen werden kann, lautet: Die Kupferchloridkristallisation kann als Verfahren nach den Vorgaben der DIN ISO 17025 validiert werden. Es lassen sich Verfahrensmerkmale wie Präzision und Robustheit bestimmen. B. Hypothesen dieser Arbeit: Die Prozessschritte der Kupferchlorid-Kristallisation können in normativen Dokumenten festgelegt und der Einfluss des jeweiligen Schrittes auf das Ergebnis kann geprüft werden. Für den Prozessschritt „Kristallisation“ kann der Einfluss der wesentlichen Faktoren systematisch untersucht und statistisch ausgewertet werden.

**Methoden:** Die Verfahrens- und Methodvalidierung soll mit biologischem Probenmaterial aus definierten Anbauversuchen, wie dem DOK-Versuch (FIBL/CH) durchgeführt werden. Das Probenmaterial liegt in ausreichender Menge vor und wird von einer unabhängigen Stelle kodiert und versendet. Lebensmittelproben unterliegen aber einer natürlichen Veränderung mit der Zeit und scheiden somit für eine mehrjährige systematische Untersuchung aus. Zur Kristallisation und für den Auswertungsschritt können chemische Substanzen verwendet werden, deren Verhalten mit dem der biologischen Proben im Prozessschritt „Kristallisation“ verglichen werden kann (Morris & Morris, 1939, Ballivet et al. 1999). Als Referenzsubstanz wird das Molekül Polyvinylpyrrolidon (PVP) eingesetzt, das bereits erfolgreich mit der Methode getestet wurde (Andersen et al. 1998). Zur Technik und zur Anwendung der Kupferchlorid-Kristallisation vgl. Beckmann 1959, Pettersson 1967, Engquist 1970, Balzer-Graf & Balzer 1991, Andersen 2001, Ballivet et al. 1999. Die Kristallisation geschieht in eigens dafür konstruierten Klimakammern, deren Verdampfungseinheit erschütterungs-

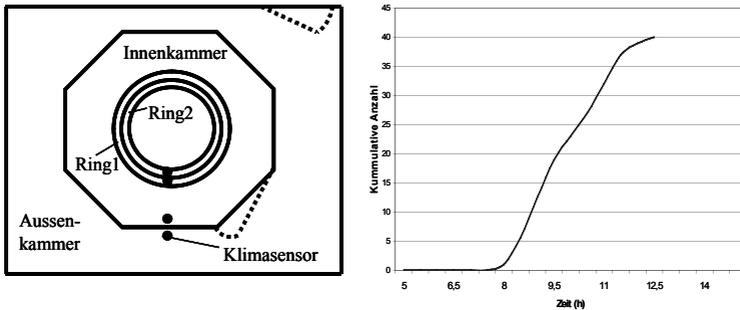
frei aufgebaut wird (nähere Beschreibung der Kammern, s. Andersen 2001). In einer Neuentwicklung fügte Andersen einen zweiten Ring zu, sodass 43 Platten pro Durchgang untersucht werden können. Die eigentliche Kristallisationskammer befindet sich in einem Raum (Aussenkammer), dessen Klimaparameter Temperatur und Feuchte ebenfalls konstant gehalten werden. Die Klimakonditionen der Kristallisations- und der Aussenkammer werden an verschiedenen Stellen kontinuierlich gemessen und online überwacht. Zwei Sensoren befinden sich über den eigentlichen Kristallisationsringen und je ein Sensor an der Innen- und Aussenwand der Kristallisationskammer. Zusätzlich wird mit Hilfe einer Wetterstation die zum Zeitpunkt der Untersuchung herrschenden Wetterdaten kontinuierlich aufgezeichnet. Die Dokumentation der jeweiligen Prozessschritte und die Erfassung der Bedingungen während der Probensequenz wird computerunterstützt erfasst. Die visuelle Auswertung der Bilder nach definierten Kriterien wird durch eine computergestützte Bilderfassung ergänzt. Für die computergestützte Bildauswertung werden die Bilder gescannt und die Textur über eine Transformation der Graustufenverteilung statistisch analysiert (Andersen et. al. 1999). Die Ermittlung der Verfahrensmerkmale wird in drei für dieses Vorhaben zusammengeschlossenen Laboratorien mit vier baugleichen Kammern (je eine am Louis Bolk Instituut/NL und in Hertha/DK, zwei an der Universität Kassel/D) durchgeführt. Die Koordination dieses „triangle“-Projektes liegt an der Universität Kassel. Alle drei Laboratorien verwenden die gleichen dokumentierten Prozeduren für alle Verfahrensschritte.

Materialien Kammer: Ringe: Acryl,  $\varnothing$  500-1012cm; Rahmen: Stahl,  $\varnothing$  532-984cm; Wand Innenkammer: Holz-Hohlprofile mit 3 Lagen 500mm isover Isolierung; Sensoren: Feuchte (0-100%) und Temperatur (-40..+80°C), Hydroclip-S, rotronic; Datenerfassung: 6-Kanal-Farbschreiber, PSQ890 RLKUC, Jaquet; Luftbefeuchter: LW24, venta; Luftentfeuchter: KAUT 03800 T; Feuchteregele: Werkstätten, Universität Kassel; Temperaturregler: Werkstätten, Universität Kassel; Wetterstation: MWS9, Reinhard System- und Messelectronic

**Ergebnisse:** Es wurden für jeden Prozessschritt normative Dokumente entwickelt, die jeden einzelnen Prozessschritt beschreiben. Die computerunterstützte Labordokumentation ermöglicht eine detaillierte Rückverfolgung von jedem Ergebnis einer Qualitätsbestimmung. Die Einwaagen der Substanzen und Proben, sowie das Volumen der pipettierten Lösungen werden dabei mit den Positionen auf dem Kristallisationsring und den Bedingungen während der Kristallisation zu einem Dokument verbunden. Es wurde eine Klimaregelung entwickelt, die es erlaubt, die Klimakonditionen der Kristallisations- und Aussenkammer unabhängig von der wetterbedingten Schwankung der Aussenfeuchte konstant zu halten. Die Temperatur der Kristallisationsringe und die Temperatur und Feuchte der Aussenkammer können auf  $\pm 0,1^\circ\text{C}$  und  $\pm 0,5\%$  rH genau eingestellt werden. Mit der Labordokumentation können zusätzlich die (manuell zu ermittelnden) Zeiten des Kristallisationsbeginns in Abhängigkeit von den beiden Kristallisationsringen und den Positionen auf dem jeweiligen Ring in Beziehung gesetzt werden. Damit können mögliche Unterschiede zwischen den Ringen, als auch in den Positionen bestimmt werden (zur Ermittlung der Wiederholpräzision). Die Bedingungen der Aussenkammer beeinflussen die Bedingungen in der Kristallisationskammer. Mit der Regelung der Bedingungen der Aussenkammer und der „Abdeckung“ des Wasserreservoirs in der Kammer, können die Startkonditionen für jeden Kristallisationsdurchgang vorgegeben werden. Steuerungsgrösse ist der mittlere Kristallisationsbeginn der Platten über alle Positionen beider Ringe, die für jede Messung und jede Kammer eingestellt werden kann. Die Einstellung erfolgt über die Änderung der Feuchte in der Aussenkammer. Die statistische Korrelation zwischen der eingestellten Feuchte in der Aussenkammer und der ihr folgenden Feuchte auf dem Ring konnte aufgrund von Hystereseeffekten noch nicht erfolgen. Der Beginn der Kristallisation innerhalb der 43 Positionen bei einer Messung erfolgt nicht zur gleichen Zeit, sondern folgt einer statistischen Verteilung, die unabhängig von der jeweiligen Position der

Platte auf dem Ring ist. Sowohl PVP als auch die biologischen Proben Möhre und Weizen zeigen eine solche Verteilung, wobei sowohl die Konzentration als auch das Probenmaterial die Art und Weise des Kurvenverlaufs beeinflusst.

Schematischer Aufbau der Kammer (links), Kumulative Anzahl bereits mit der Kristallisation begonnener Platten gegen die Zeit nach Verdampfungsbeginn für eine Kammerbelegung von PVP und einer Möhrenprobe (je 50% Belegung der Positionen auf dem Ring, Startbedingungen Ring: 30°C, 50% rH) (rechts)



Die Kristallisation kann beginnen, wenn die Sättigungskonzentration überschritten und nachdem die entsprechende Menge Wasser verdunstet ist. Der Zeitpunkt des Kristallisationsbeginns ist für gleiche Kammerbelegung abhängig von der auf dem Kristallisationsring herrschenden relativen Feuchte (Korrelation  $r^2=0,97$ ). Je höher die Feuchte, desto später liegt der Start der Kristallisation (mittlere Dauer). Eine Änderung von 6% relativer Feuchte auf dem Ring bewirkt eine Verschiebung der Zeiten bis zu 6h. Ob dies ausschliesslich mit der Feuchte verbunden ist, muss untersucht werden. Auch die statistische Verteilung des Kristallisationsbeginns für die 43 Positionen ist abhängig von der auf dem Ring eingestellten relativen Feuchte. Die Auftragung der Steigung der Geraden aus der kumulativen Anzahl der bereits mit der Kristallisation begonnenen Positionen gegen verschiedene relative Startfeuchten auf dem Kristallisationsring für gleiche Kammerbelegung (PVP und Möhrenproben mit je 50% Kammerbelegung) zeigt, dass je höher die relative Feuchte ist, desto breiter die Verteilung des Kristallisationsbeginns innerhalb einer Kammer wird (Korrelation  $r^2=0,89$ ). Der Einfluss von unterschiedlichem Probenmaterial wurde bisher nicht untersucht. Die Zeit, bis zum Beginn der Kristallisation beeinflusst das Kristallbild. Je länger die Verdampfungsphase dauert (bedingt durch steigende relative Startfeuchte auf dem Ring), desto grösser wird der Bilddurchmesser. Eine logarithmische Auftragung des Durchmessers gegen die Zeit des Kristallisationsbeginns für zwei unterschiedliche PVP-Probenkonzentrationen mit gleicher Kupferchlorid-Konzentration ergibt eine Korrelation von  $r^2= 0,61$  bzw.  $0,55$ . Welche weiteren Faktoren die Bildgestalt beeinflussen, muss untersucht werden. Erste Untersuchungen mit PVP ergeben für die statistische Auswertung der computergestützten Bildauswertung einen signifikanten Unterschied zwischen Bildern, deren Kristallisationsbeginn nach 7-8h oder nach 11-15h liegt (Variable *energy*,  $P<0,01$ ). Für Möhrenproben ergibt der Vergleich zwischen unterschiedlichen Bilddurchmessern einen hochsignifikanten Unterschied zwischen Bildern eines Kammerdurchgangs (mittlere Zeit des Kristallisationsbeginns  $>14h$ ). Die statistische Auswertung der computergestützten Bildauswertung zeigt für die Variable *energy*  $P<0,001$ . In wie weit diese Streuung von den Kammerbedingungen beeinflusst wird, muss untersucht werden. Erste Untersuchungen weisen auf eine Zunahme der Streuung bei längerer Zeit bis zur Kristallisation hin.

**Fazit:** In der vorliegenden Arbeit wird der wissenschaftliche Ansatz, die Methode zu validieren beschrieben und der Einfluss der Kammerbedingungen auf die Kristallisation systematisch untersucht und statistisch ausgewertet. Die Klimakonditionen haben einen signifikanten Einfluss auf die Streuung der Werte, sowohl innerhalb eines Kammerdurchgangs, als auch im Vergleich zwischen zwei Kammerdurchgängen. Bei der Einstellung der Startfeuchte auf dem Ring variieren die Feuchtenwerte die dafür erreicht werden müssen von Kammer zu Kammer; weitere Untersuchungen werden zeigen, ob dies auf die unterschiedlichen Abstände beim Aufbau der Kammern (bis zu 2 Jahren Differenz) an den einzelnen Orten zurückzuführen ist (Adaption des Werkstoffes). Eine Vergleichbarkeit von Qualitätsuntersuchungen mit den Bildschaffenden Methoden ist aus unserer Sicht möglich, wenn die experimentellen Randbedingungen bekannt und kontrolliert oder gemessen werden können. Die Festlegung der Prozessschritte in normativen Dokumenten und die Verfolgung der gesamten Probensequenz ist möglich und eine weitere Voraussetzung, um Qualitätsuntersuchungen mit den Bildschaffenden Methoden vergleichen zu können. Die hier vorgelegten Untersuchungen zur Methodenrobustheit im Prozessschritt Kristallisation erlauben die Ermittlung der Wiederhol- und Laborpräzision und sind damit Voraussetzung, die Vergleichspräzision mit der Durchführung von Ringversuchen ermitteln zu können. Das Problem einer fehlenden Bezugsnormale (und damit der Überprüfung der Richtigkeit) bleibt davon unberührt.

Die Autoren danken der Firma Eosta, der Iona Stichting, Mrs. und Mr. Kindersley, der Software AG Stiftung und der Triodos Stichting für die finanzielle Unterstützung des Vorhabens.

**Literaturangaben:** Andersen, J.-O. (2001): Development and application of the biocrystallisation method, Biodynamic Research Association, Denmark, Report No. 1

Andersen, J.-O., Henriksen, C.B., Laursen, J. u. A.A. Nielsen (1999): Computerised image analysis of biocrystallograms originated from agricultural products, Computers and electronics in agriculture 22, 51-69

Andersen, J.-O., Kaack, K., Nielsen, M., Thorup-Kristensen, K. u. R. Labouriau (2001): Comparative study between biocrystallisation and chemical analysis of carrots (*Daucus carota* L.) grown organically using different levels of green manures, Biological Agriculture and Horticulture 19, 29-48

Andersen, J.-O., Laursen, J. u. P. Kolster (1998): A refined biocrystallisation method applied in a pictomorphological investigation of a polymer, Elemente der Naturwissenschaft 68, 1-20

Ballivet, C., Knijpenga, H., Barth, J.-G. u. R. Clad (1999): Zur Empfindlichkeit der Methode der Kupferchloridkristallisation, Elemente der Naturwissenschaft 70, 1, 1-32

Balzer-Graf, U. (1994): Die Qualität ökologisch erzeugter Produkte, In: Ökologischer Landbau - Perspektiven für die Zukunft (Mayer et al. Hrsg.) Stiftung Ökologie und Landbau, 261-290

Balzer-Graf, U. u. F. Balzer (1991): Steigbild und Kupferchloridkristallisation - Spiegel der Vitalaktivität von Lebensmitteln, In: Meier-Ploeger & Vogtmann, 163-210

Beckmann, H. (1959): Über Keimbildung, Einkristallwachstum und Auffächerungswachstum von  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in rein wässrigen und eiweißhaltigen Lösungen, Dissertation Universität Bonn

Engquist, E. (1970): Gestaltkräfte des Lebendigen, Vittorio Klostermann Verlag, Frankfurt a.M.

Kahl, J., Busscher, N. u. A. Meier-Ploeger (2002): Von der Pflanze zum Bild-Motivation zur Arbeitstagung „Bildschaffende Methoden“ in Witzenhausen. Elemente der Naturwissenschaft, im Druck

Kromidas, S. (Hrsg.) (2000): Handbuch Validierung in der Analytik, Wiley-VCH, Weinheim

Morris, D.L. u. C.T. Morris (1939): Specific effects of certain tissue extracts on the crystallisation pattern of cupric chloride, J. Phys. Chem. 43, 623-629.

Pettersson, B.D. (1967): Beiträge zur Entwicklung der Kristallisationsmethode mit Kupferchlorid nach Pfeiffer, Lebendige Erde 18, 1, 15-31

### Bibliographische Angaben:

Busscher, Nicolaas und Kahl, Johannes und Mergardt, Gaby und Andersen, Jens-Otto und Huber, Machteld und Meier-Ploeger, Angelika (2003) - Vergleichbarkeit von Qualitätsuntersuchungen mit den Bildschaffenden Methoden (Kupferchlorid-Kristallisation). Beitrag präsentiert bei der Konferenz: 7. Wissenschaftstagung zum Ökologischen Landbau, Wien, Österreich, 24. - 26. Februar 2003; Veröffentlicht in Freyer, Bernd, (Hrsg.) Ökologischer Landbau der Zukunft - Beiträge zur 7. Wissenschaftstagung zum Ökologischen Landbau, Seite(n) 217-220. Universität für Bodenkultur Wien, Institut für Ökologischen Landbau.

Das Dokument ist im Internet unter  
<http://orgprints.org/00001027/> zu erreichen.